

Miniaturisierte Bioprozesstechnik

Mit Tropfenmikrofluidik zu Hochgeschwindigkeits-Biotechnologie

BIANKA KÄSTNER^{1, 2, 3}, SUNDAR HENGOJU¹, CARL-MAGNUS SVENSSON⁴,
MARC THILO FIGGE^{4, 5}, MIRIAM A. ROSENBAUM^{1, 5}

¹ BIOTECHNIKUM, LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG UND
INFEKTIONS BIOLOGIE E. V. – HANS-KNÖLL-INSTITUT (HKI), JENA

² BIOTECHNIKUM, BEUTH HOCHSCHULE FÜR TECHNIK, BERLIN

³ FAKULTÄT FÜR BIOTECHNOLOGIE, LEHRSTUHL FÜR BIOVERFAHRENSTECHNIK,
TU BERLIN

⁴ ANGEWANDTE SYSTEMBIOLOGIE, LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG
UND INFEKTIONS BIOLOGIE E. V. – HANS-KNÖLL-INSTITUT (HKI), JENA

⁵ INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, FAKULTÄT FÜR BIOWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT
JENA

In recent years, microfluidic technologies were introduced for massively parallel cultivation and screening approaches. Individual cells can easily be singularized, compartmentalized, and cultivated from mixed inocula using droplet microfluidics. The generation of millions of droplets in a high-throughput manner enables studying diverse samples and combining the evaluation of genetic and phenotypic variants. It is a powerful tool to explore and exploit natural metabolic diversity.

DOI: 10.1007/s12268-021-1575-7
© Die Autoren 2021

■ Alle bahnbrechenden mikrobiellen Produkte der Biotechnologie – wie Antibiotika, Enzyme oder Polymere – stammen aus nur einem Bruchteil der mikrobiellen Welt. Das Bestreben, die mikrobielle dunkle Materie zu erforschen, ist dringender denn je, um Herausforderungen wie steigende antimikrobielle Resistenzen [1] oder den Übergang von fossilen Ressourcen zu einer nachhaltigen Bioökonomie zu bewältigen. Metagenomische Analysen von Umweltproben offenba-

ren eine unbekannt Welt von Mikroorganismen mit einem beeindruckenden biosynthetischen Potenzial [2]. Doch wie kann die Vielzahl an Mikroorganismen, die im Verborgenen liegen, untersucht und im besten Fall kultiviert werden?

Mikrofluidische Tropfen für Hochdurchsatzanalysen

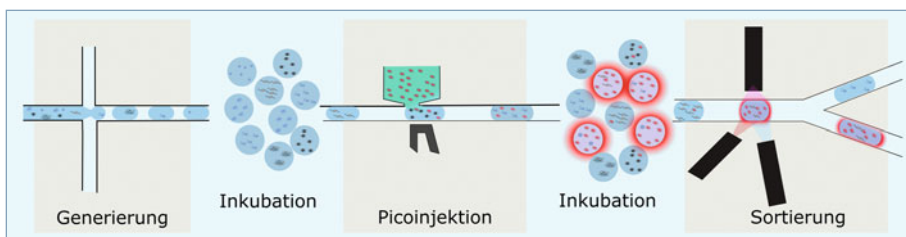
Die tropfenbasierte Mikrofluidik ist ein attraktives Werkzeug für miniaturisierte und

kostengünstige Hochdurchsatzanalysen. Die Tropfen in Piko- bis Mikrolitergröße stellen kleine Kompartimente dar, die durch eine nicht mischbare Trägerflüssigkeit voneinander getrennt sind. Durch den Einsatz der Tropfenmikrofluidik können sowohl Zeit als auch Ressourcen eingespart werden: Das Probenvolumen ist im Vergleich zu 96-Well-Platten um sechs Größenordnungen reduziert, und die Analyse erfolgt im Kilohertz-bereich.

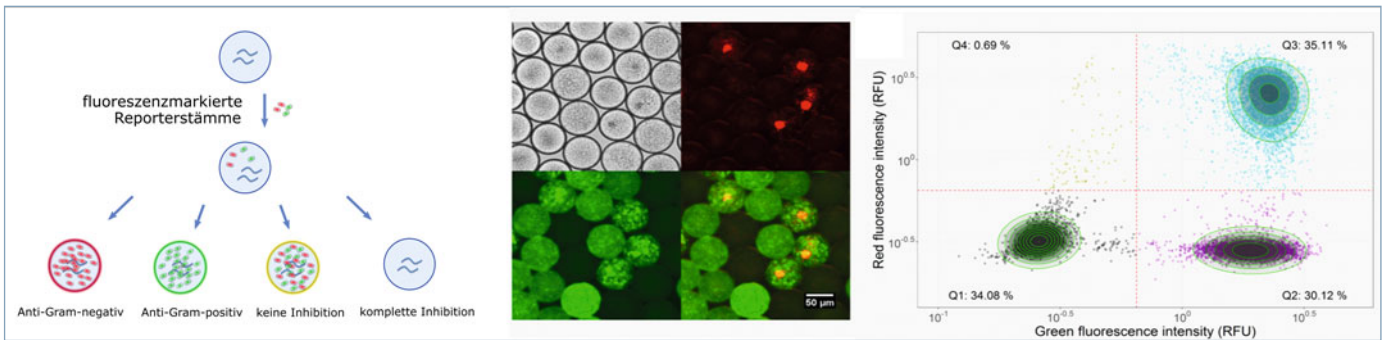
Bei der Herstellung von miniaturisierten Tropfen in Mikrokanälen eines mikrofluidischen Chips wird eine wässrige Phase (Kulturmedium) in einer kontinuierlichen Phase (meist ein Öl) dispergiert. Die mikrofluidischen Chips werden meist mithilfe der Softlithographie auf Polydimethylsiloxan (PDMS)-Basis durch Abformen eines Masters hergestellt. Neben der reinen Generierung von Tropfen können weitere fluidische Operationen zur Tröpfchenmanipulation leicht integriert werden, wie das Zusammenführen, Teilen, Injizieren und Sortieren (**Abb. 1**). Die Tropfen können mittels fluoreszenzaktivierter Tropfensortierung (FADS) mit Geschwindigkeiten von 100–30.000 Hertz sortiert werden [3]. Interessante Tropfen können schließlich in andere Kultivierungsformate – wie Agarplatten – überführt werden.

Miniaturisierte Bioreaktoren in Form von Tropfen

Die Kompartimentierung von Zellen in einzelne Tropfen ist einer der Hauptvorteile der Tropfenmikrofluidik. In Tropfen mit einem Durchmesser von 10–100 Mikrometer können Zellen eingeschlossen und kultiviert werden. Bezogen auf die Konzentration ist dies vergleichbar mit 10^7 bis 10^9 Zellen pro Milliliter, also dem Standardarbeitsbereich der Mikrobiologie. Die Separierung bis hin zum Einschluss einer einzelnen Zelle ermöglicht es, eine Vielzahl von Experimenten mit minimalem Aufwand an Ressourcen durchzuführen. Besonders im Hinblick auf die bisher unkultivierbare mikrobielle Diversität mitsamt ihres enormen metabolischen Potenzials bietet die tropfenbasierte Mikro-



▲ **Abb. 1:** Mikrofluidische Operationen zur Tröpfchenmanipulation. Die Generierung von Tropfen ermöglicht den Einschluss einer einzelnen Zelle. Nach einer Inkubationszeit außerhalb des Chips können mittels Picoinjektion weitere Reagenzien oder bakterielle Stämme in die Tropfen eingebracht werden. Anschließend können die Tropfen mittels Fluoreszenz separiert werden.



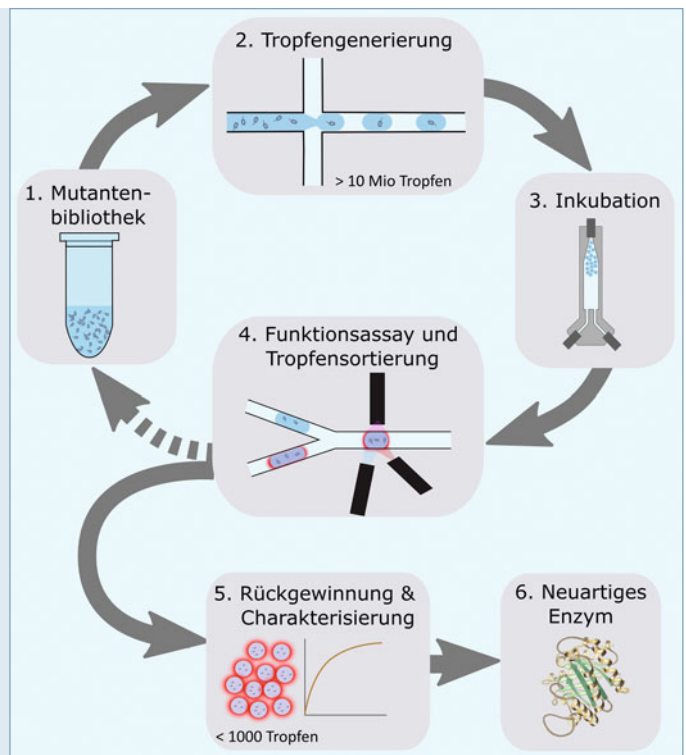
▲ **Abb. 2:** Wachstumsinhibitionstest mittels Reporterstämmen zur Testung auf antimikrobielle Substanzen. Das wachstumsabhängige Fluoreszenzsignal zeigt eine Produktion von antimikrobiellen Wirkstoffen entweder durch eine vollständige Hemmung (kein Signal) oder eine teilweise Inhibition an (rot fluoreszierend für anti-Gram-negative, grün fluoreszierend für anti-Gram-positive Zellen; schematisch: links, Realbild: Mitte). Über spektroskopische Methoden können die Tropfen klassifiziert werden (rechts) und mittels Fluoreszenz-aktivierter Tropfensortierung (FADS) die Tropfen, die eine Hemmung anzeigen, gezielt sortiert werden. Die vier Quadranten (rechts) zeigen, dass 34 % der sortierten Tropfen beide Reporterstämmen inhibieren (Q1), 30 % nur eine Inhibition des rot fluoreszierenden Gram-negativen Reporters (Q2), 35 % gar keine Inhibition (Q3) und unter 1 % nur eine Inhibition des grün fluoreszierenden Gram-negativen Reporters (Q4) aufweisen.

fluidik entscheidende Vorteile: Durch die Isolierung der einzelnen Mikroorganismen in separate Kompartimente können Stämme kultiviert werden, die normalerweise unter schneller wachsenden Gemeinschaften verborgen bleiben oder inhibiert werden. Das Zellwachstum in den Mikrotropfen ist schneller nachweisbar, womit die Inkubationszeit bis hin zur Analyse enorm verkürzt werden kann [4].

Die Bestimmung von Zellwachstum in Tropfen

Für die Analyse und Quantifizierung von mikrobiologischen Proben in der Tropfenmikrofluidik wurden verschiedene Nachweismethoden entwickelt, insbesondere optische, elektrische und massenspektrometrische Detektionen. Um Zellwachstum zu identifizieren, finden besonders optische Methoden mittels Fluoreszenz-, Absorptions-, Lichtstreuungs- und Raman-Signalen Anwendung. Die Analyse von Tropfen kann beispielsweise bildbasiert erfolgen. So können leere von bewachsenen Tropfen unterschieden und entsprechend sortiert werden. Um den Hochdurchsatzcharakter der Tropfenmikrofluidik zu erhalten, ist es von größter Bedeutung, dass die Bildanalyse mit hoher Recheneffizienz durchgeführt wird, ohne dabei an Genauigkeit bei der Wachstumserkennung zu verlieren. Der Bedarf an automatisierter Analyse im Allgemeinen und fortschrittlichen maschinellen Lernmethoden (*deep learning*) spielt hier eine entscheidende Rolle. Mittels Codierungsstrategien und modernen Bildanalysealgorithmen, die auf künstlicher Intelligenz (KI) beruhen, kann außerdem das Wachstum von Zellen bei unterschiedlichen experimentellen Bedin-

► **Abb. 3:** Screening komplexer Mutantenbibliotheken (1). Die Generierung von Tropfen auf Einzelzellebene erzeugt klonale Kolonien pro Tropfen (2). In Kombination mit einem Funktionsassay und FADS (4) wird eine direkte Korrelation zwischen Phäno- und Genotyp der jeweiligen Mutante möglich. So können pro Tag aus zehn Millionen analysierten Tropfen (Varianten) die aktivsten Mutanten selektiert und anschließend weiter charakterisiert werden (5), um zu neuen, verbesserten Biokatalysatoren zu gelangen (6).



gungen innerhalb der mikrofluidischen Tropfen unterschieden und bewertet werden [5].

Tropfen als Kultivierungs- und Screeningplattform für Antibiotika

Tropfenmikrofluidik ist bestens geeignet für den Nachweis mikrobieller Varianten, die neue Möglichkeiten in der industriellen Mikrobiologie eröffnen. Ein großer Vorteil ist hierbei die Verknüpfung zwischen einer Kultivierungs- und Screeningplattform. Der Kultivierung von Umweltproben in einzelnen kleinen Kompartimenten kann ein *in-droplet*-Screening angeschlossen werden. So können komplexe Umweltproben auf antimikrobielle

Wirksamkeit getestet werden. Im ultra-kleinen Maßstab werden fluoreszenzmarkierte Reporterzellen in einzelne, mit Umweltkeimen gefüllte Tropfen durch Pikoinjektion eingebracht. Ein wachstumsabhängiges Fluoreszenzsignal des Reporterstamms zeigt ungehemmtes Wachstum oder – im Fall einer möglichen Produktion von antimikrobiellen Wirkstoffen – Hemmung an (**Abb. 2**, [6]).

Gerichtete Evolution in Tropfen

Für die gerichtete Evolution steht die schnelle Optimierung eines Phänotyps unter selektiven Bedingungen im Vordergrund. Die Verkapselung einzelner Zellen in Tröpfchen

ermöglicht eine direkte Korrelation zwischen der Aktivität eines Stamms, also dem Phänotyp einer Zelle, mit dessen genetischer Information und macht somit das Screening komplexer Variantenbibliotheken möglich. Üblicherweise werden gequenchete fluorogene Substrate ko-verkapselt oder durch Pikoinjektion in die Tropfen eingebracht. Das Fluorophormolekül wird bei Aktivität eines Enzyms proportional freigesetzt. Anschließend können die aktivsten Varianten mit FADS (*fluorescence-activated droplet sorting*) bestimmt werden (**Abb. 3**). Mit mehr als zehn Millionen Varianten pro Tag kann rund 100-mal schneller getestet werden als bei gängigen *liquid handling*-Systemen.

Vom Bastelprojekt zu breiter Nutzung

Die Tropfenmikrofluidik hat sich als ein wertvolles Werkzeug mit hohem Potenzial für die mikrobielle Kultivierung im Ultrahochdurchsatz etabliert, mit Anwendungen in der Einzelzellanalyse, der Kultivierung seltener Mikroben, der Entdeckung neuer Naturstoffe und der Biokatalysatorentwicklung. Die Durchdringung der Technik in mikrobiologischen Laboren ist jedoch nach wie vor gering. Mit Fortschritten für einfachere Chipentwicklung, verbesserten Kultivierungsbedingungen sowie der Implementierung von Analysealgorithmen auf der Basis von KI, ist die Zeit reif für ein gesteigertes Interesse an dieser Technologie. Vor allem, um das immer größer werdende Problem der multiresistenten Erreger durch neue Wirkstoffe in den Griff zu bekommen.

Danksagung

Wir bedanken uns für finanzielle Unterstützung durch das Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitalisierung (Projektnr. 2014FE9037 und 2017FE9071), durch den Leibniz Wissenschaftscampus InfectoOptics (SAS-2015-HKI-LWC (Projekte FastDrop und VersaDrop)) der Leibniz Gemeinschaft und durch den vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Forschungscampus InfectoGnostics 2 (Projekt ADA Nr. 13GW0456B). ■

Literatur

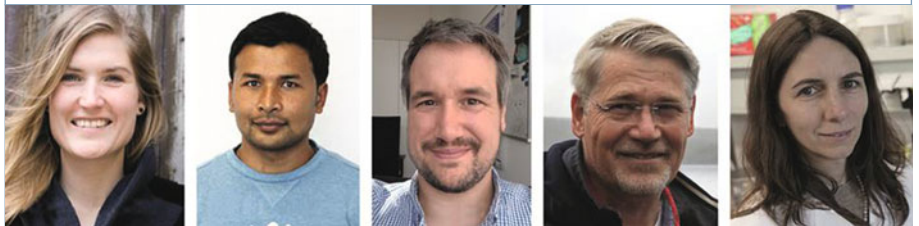
- [1] Willyard C (2017) The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature* 543: 15
- [2] Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E et al. (2016) Antibiotic drug discovery. *Microb Biotechnol* 9: 541–548
- [3] Schutz SS, Beneyton T, Baret JC et al. (2019) Rational design of a high-throughput droplet sorter. *Lab Chip* 19: 2220–2232
- [4] Mahler L, Tovar M, Weber T et al. (2015) Enhanced and homogeneous oxygen availability during incubation of microfluidic droplets. *RSC Adv* 5: 101871–101878
- [5] Svensson C-M, Shvydkiv O, Dietrich S et al. (2019) Coding of experimental conditions in microfluidic droplet assays using colored beads and machine learning supported image analysis. *Small* 1802384: 1–14
- [6] Tovar M, Hengoju S, Weber T et al. (2019) One sensor for multiple colors: fluorescence analysis of microdroplets in microbiological screenings by frequency-division multiplexing. *Anal Chem* 91: 3055–3061

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Miriam A. Rosenbaum
 Biotechnikum
 Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und
 Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI)
 Beutenbergstraße 11a
 D-07745 Jena
 miriam.rosenbaum@leibniz-hki.de

AUTOREN



Bianka Kästner, Sundar Hengoju, Carl-Magnus Svensson, Marc Thilo Figge und Miriam A. Rosenbaum (v. l. n. r.)

Bianka Kästner

2013 Bachelor und 2018 Masterabschluss in Technischem Umweltschutz, TU Berlin. Seit 2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion an der Beuth Hochschule für Technik in Kooperation mit der TU Berlin. Seit 2020 Gastforschungsaufenthalt am Leibniz-HKI im Bereich Tropfenmikrofluidik.

Sundar Hengoju

2013–2015 Biochemiestudium an der Chungbuk National University, Südkorea. 2016–2020 Promotion an der Universität Jena. Seit 2020 Postdoc am Leibniz-HKI, Jena für Tröpfchenbasierte Mikrofluidik.

Carl-Magnus Svensson

2005–2009 PhD in Angewandter Mathematik an der University of Nottingham, UK, dort 2009–2011 Postdoc. 2011–2012 Postdoc, Frankfurt Institute for Advanced Studies (FIAS). Seit 2012 Postdoc in der Gruppe Angewandte Systembiologie am Leibniz-HKI, Jena.

Marc Thilo Figge

1996–2000 PhD in Theoretischer Physik an der Rijksuniversiteit Groningen (RuG), Niederlande. 2000–2005 Postdoc, RuG. 2005–2010 Junior Fellow in Systemimmunologie, Frankfurt Institute for Advanced Studies (FIAS). Seit 2011 Professor für Angewandte Systembiologie am Leibniz-HKI, Jena.

Miriam A. Rosenbaum

1999–2004 Biochemiestudium an der Universität Greifswald, dort 2006 Promotion. 2007–2011 Postdoc, Washington University und Cornell University, USA. 2011–2017 Juniorprofessorin an der RWTH Aachen. Seit 2017 Professur für Synthetische Biotechnologie an der Universität Jena und Leiterin des Biotechnikums am Leibniz-HKI, Jena.