

Terrestrische Cyanobakterien als Quelle neuer antimikrobieller Substanzen

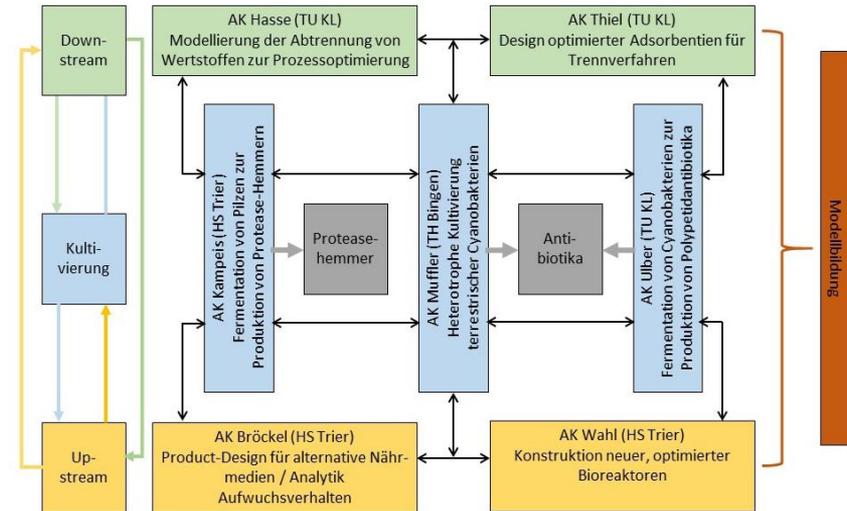
Marco Witthohn

Agenda

1. Forschungscluster *i*Process
2. Theoretischer Hintergrund
3. Antimikrobielles Screening
4. Kontinuierliche Produktion
5. Einfluss mixotropher Kultivierung
6. Einfluss von Nährstoffanpassungen

iProcess : Intelligente Prozessentwicklung – von der Modellierung bis zum Produkt

- FH-Uni-Forschungscluster
- Gefördert durch das Ministerium für Wissenschaft, Weiterbildung und Kultur des Landes Rheinland-Pfalz
- Modellprojekte:
 - Produktion von Proteasehemmern mit Pilzen
 - Produktion antimikrobieller Substanzen mit Cyanobakterien



Struktur von iProcess

Theoretischer Hintergrund: Terrestrische Cyanobakterien

- Kommen in den Ordnungen *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Pseudoanabaenales* und *Nostocales* vor
- Ordnungen mit größtem Anteil an Produzenten bioaktiver Substanzen
- Hohe Toleranz gegenüber schwankenden Kultivierungsbedingungen
- Noch wenig erforscht



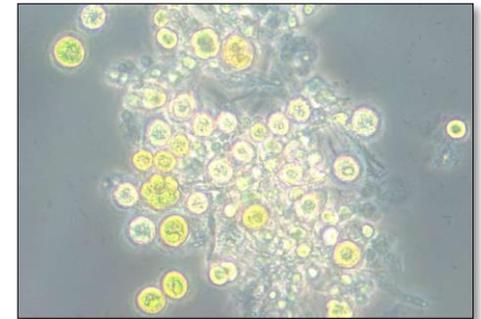
Stammsammlung terrestrischer Cyanobakterien an der THB

Antimikrobielles Screening

- Hemmhoftest
- 13 Cyanobakterien-Stämme
 - gegen 10 Indikatororganismen
- Hemmwirkung mit Überstand/Biomasse von *Croococidiopsis cubana*
- Wirkung gegen *Micrococcus luteus* und *Candida auris*



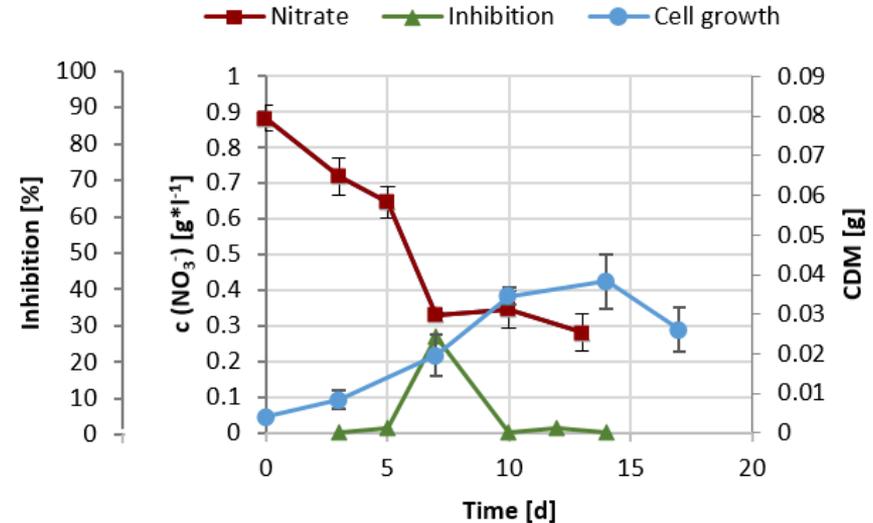
HHT mit *C. cubana*
Biomasse/Kulturüberstand
gegen *Micrococcus luteus*



Mikroskopische Aufnahme von *C. cubana*

Abhängigkeit der Antibiotikaproduktion

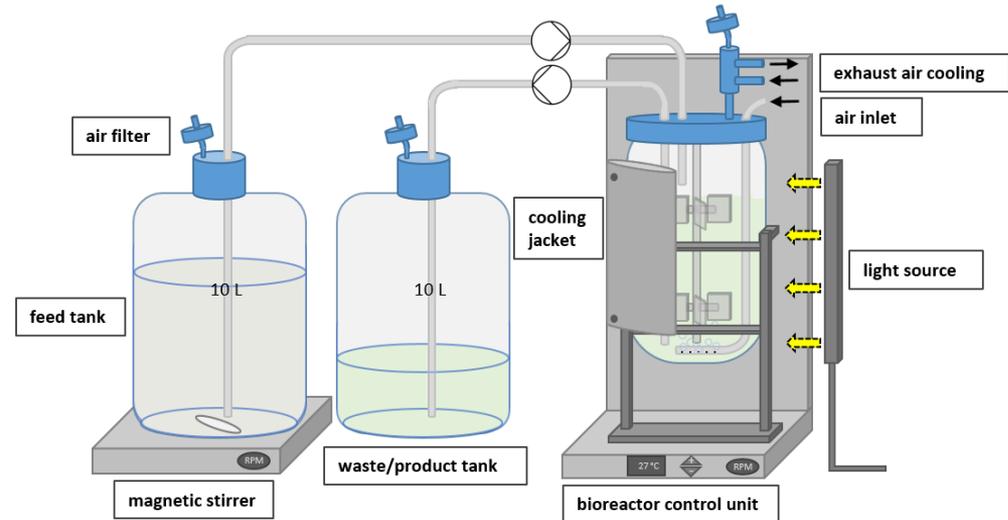
- Korrelation mit
 - Wachstumsphase?
 - Nitratkonzentration im Medium?
- Produktion in exp. Wachstumsphase
- N-Limitierung scheint Rolle zu spielen



Korrelation des Zellwachstums von *C. cubana* mit der Nitrat-Abnahme im Medium, sowie der antibiotischen Hemmwirkung gegen *M. luteus*

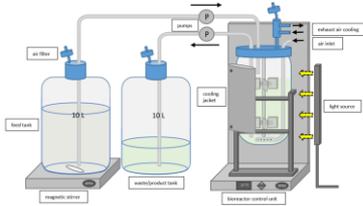
Abhängigkeit der Antibiotikaproduktion

- Aufbau eines kontinuierlichen Prozesses
 - limitierte Nitrat-Konzentration im Medium (BG-11)
 - ständiger Austausch des Mediums
 - $V_L = 1.6 \text{ l}$, $T = 27 \text{ °C}$, $D = 0.0375 \text{ h}^{-1}$,
 $F_{in} = F_{out} = 60 \text{ ml h}^{-1}$



Kontinuierliche Kultivierung von *C. cubana* in einem beleuchteten Bioreaktor.

Flowchart – Produktion bis Inhibitionstest



Phototrophe, kontinuierliche Kultivierung von *C. cubana*



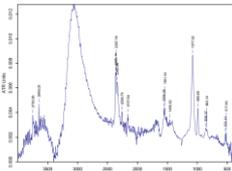
Aufreinigung der antibiotischen Substanz über *Reversed Phase Chromatographie*



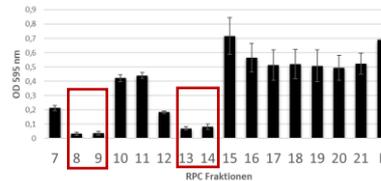
Eindampfen der Elutionsfraktionen bei 40°C, anschließend Resuspendierung in H₂O_{demin.}



Wachstumstest mit *Candida auris*, nach Zugabe der Elutions-Fractionen



Analysen oder weitere Aufreinigungsschritte

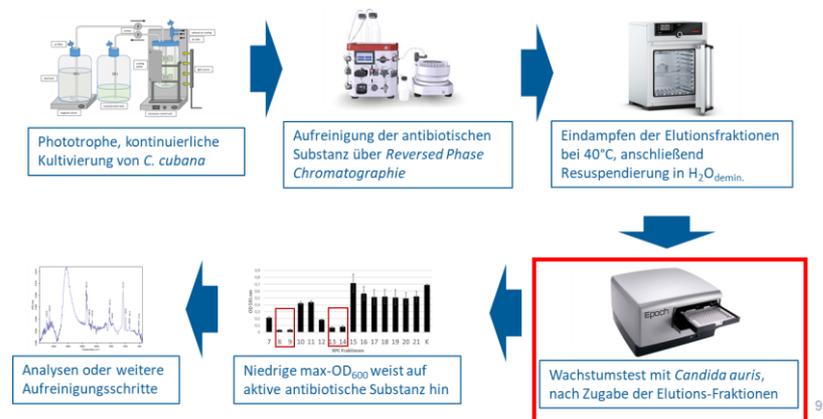


Niedrige max-OD₆₀₀ weist auf aktive antibiotische Substanz hin



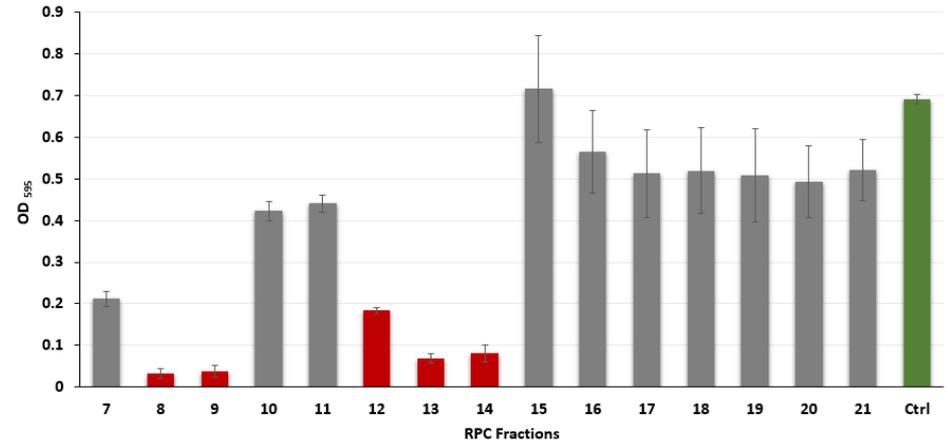
Inhibitionstest in 96-well Platten

- Kultivierung der Indikatororganismen bis exp. Wachstumsphase (30°C)
- Einstellen auf OD₆₀₀ 0,2 mit Medium
- Auftragung auf 96-well Platte (je 100 µL)
- Zugabe der Probe (je 100 µL)
- Messung der Start-OD
- Kultivierung für 15 h bei 30°C
- Messung der End-OD
- Niedrige End-OD = Hemmwirkung



Aufreinigung der bioaktiven Substanz

- Probenentnahme kont. Prozess
 - Aufreinigung der bioaktiven Substanz(en)
 - Reverse Phase Chromatographie (Diaion HP-20)
 - Elution mittels Acetonitril Gradienten
 - Abdampfen der Fraktionen
 - Inhibitionstest
- Erste Aufreinigung erfolgreich



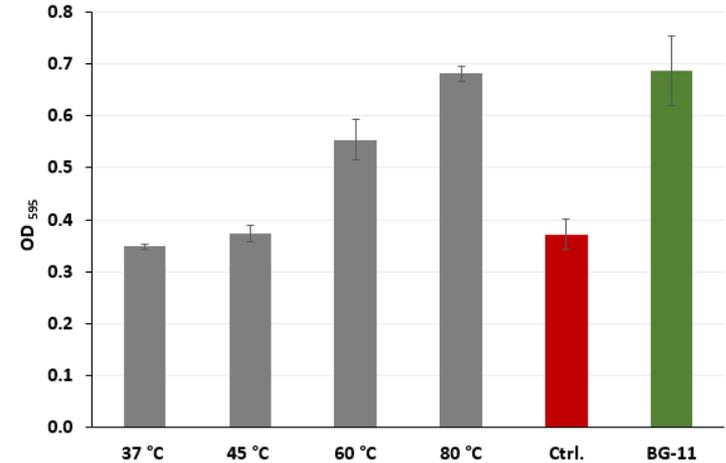
Wachstumshemmender Effekt der RPC Fraktionen gegen *C. auris*. Wachstumstest durchgeführt in Mikrotiterplatten (n=3). Die Balken repräsentieren die OD₅₉₅ von *C. auris* nach 15 h Wachstum bei 30°C.

Charakterisierung der bioaktiven Substanz

- Test der Temperaturstabilität

- Inkubation der Proben für 1 h
- Inhibitionstest gegen *C. auris*
- Kontrolle: Probe 1 h bei RT inkubiert

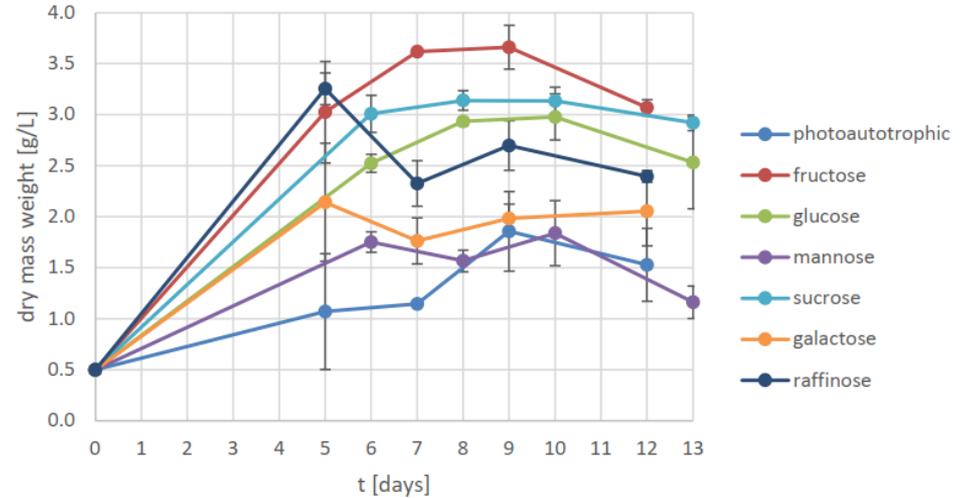
- Temperaturtest bestätigt Stabilität bis min. 45°C
- Weitere Charakterisierung noch ausstehend



Temperaturstabilitätstest der antibiotischen Substanz aus *C. cubana*. Die Proben wurden für 1 h bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Der Inhibitionstest erfolgte gegen *C. auris* in Mikrotiter-Platten. n = 4

Mixotrophes Wachstum von *C. cubana*

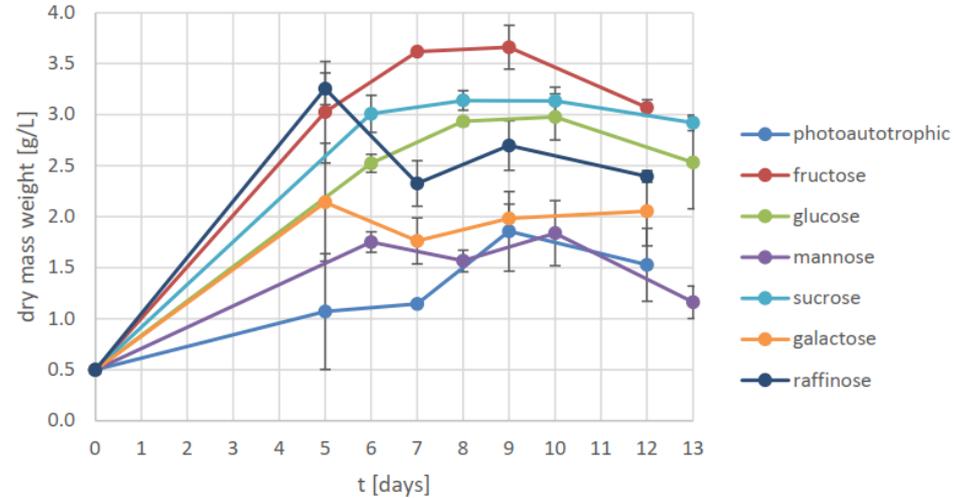
- Wachstumstest mit C-Quellen (0,5 %)
- Gemessen über Biotrockenmasse



Wachstumskurven von *C. cubana* unter Zugabe verschiedener C-Quellen (je 0,5 % w/v)

Mixotrophes Wachstum von *C. cubana*

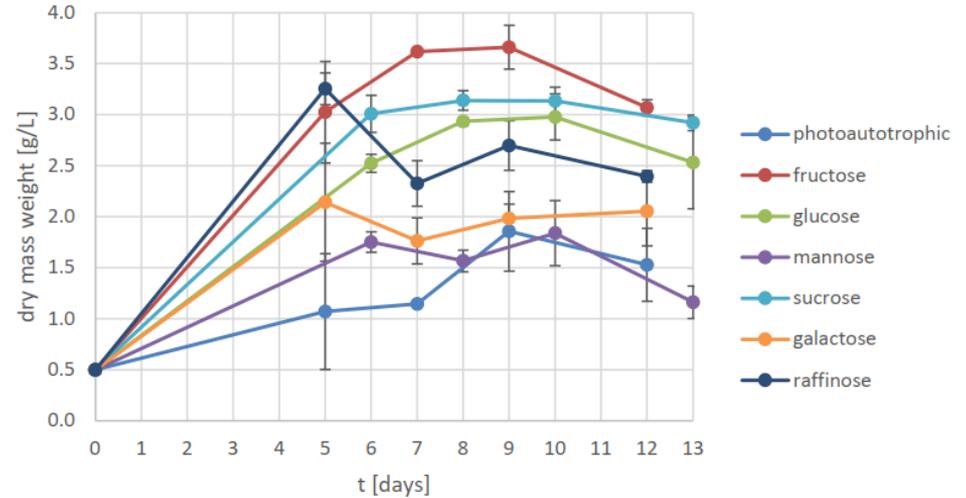
C-Quelle	μ [d ⁻¹]
/	0,152
Fructose	0,36
Glucose	0,324
Mannose	0,251
Saccharose	0,256
Galactose	0,291
Raffinose	0,375



Wachstumskurven von *C. cubana* unter Zugabe verschiedener C-Quellen (je 0,5 % w/v)

Mixotrophes Wachstum von *C. cubana*

- Wachstumstest mit C-Quellen (0,5 %)
- Gemessen über Biotrockenmasse
- Effekt auf Antibiotika-Produktion?

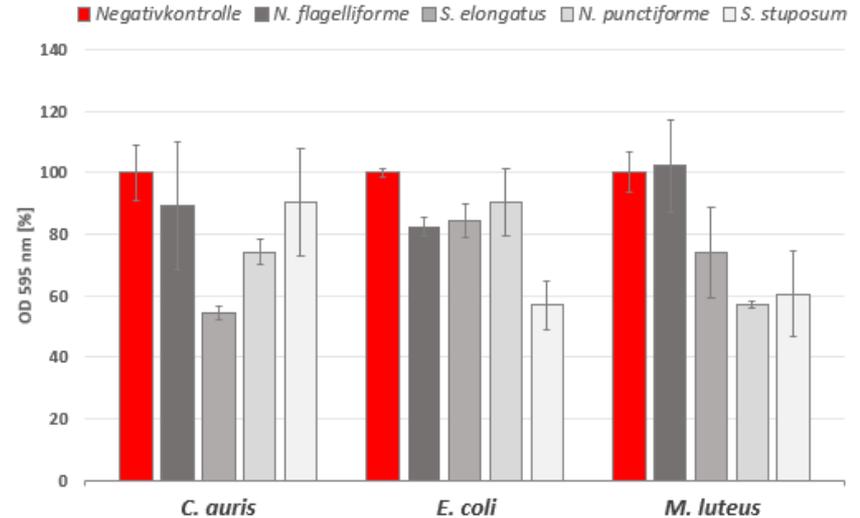


Wachstumskurven von *C. cubana* unter Zugabe verschiedener C-Quellen (je 0,5 % w/v)

Screening mittels Wachstumstest

- **Wachstums-Inhibitionstest**

- in 96-well Platten
- erhöhte Sensitivität gegenüber HHT
- auch bakteriostatische Substanzen werden detektiert

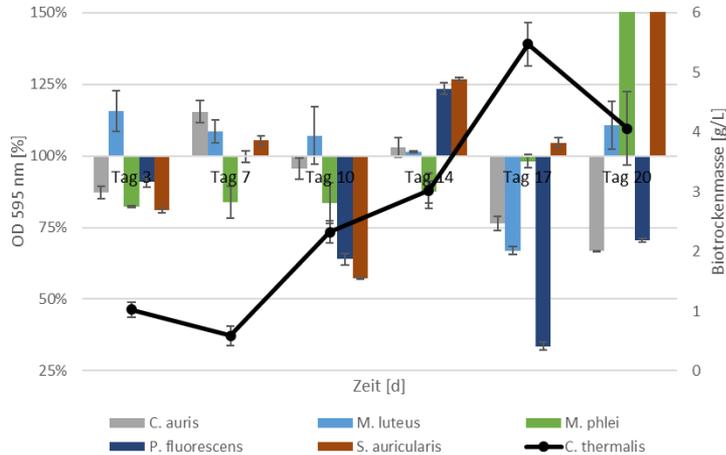


Erreichte Maximal-OD₅₉₅ der Indikatororganismen *C. auris*, *E. coli* und *M. luteus* nach Zugabe von Kulturüberständen der terrestrischen Cyanobakterien *Nostoc flagelliforme*, *Synechococcus elongatus*, *Nostoc punctiforme* und *Scytonema stiposum* (1:1). n = 4

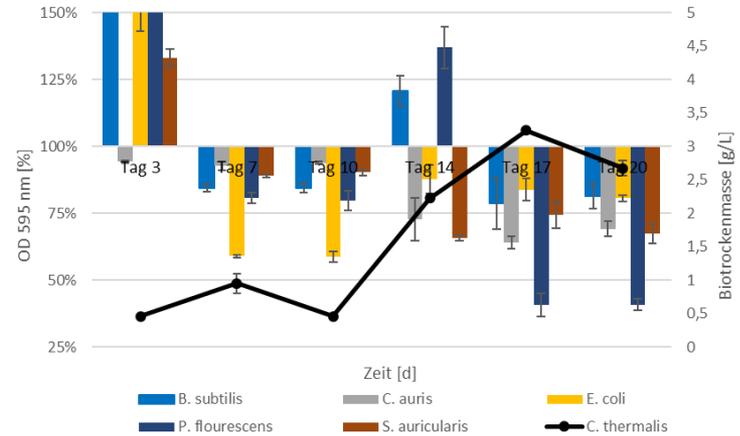
Effekte mixotropher Kultivierung

- Beispiel: *Chroococidiopsis thermalis*

Phototroph



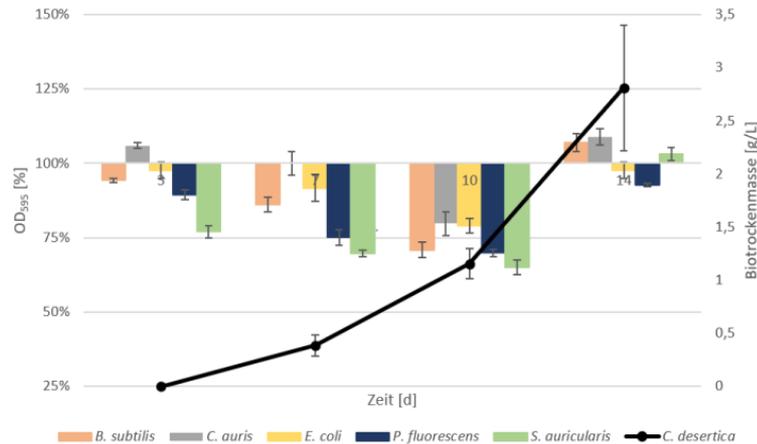
Mixotroph; 0,5 % Glucose



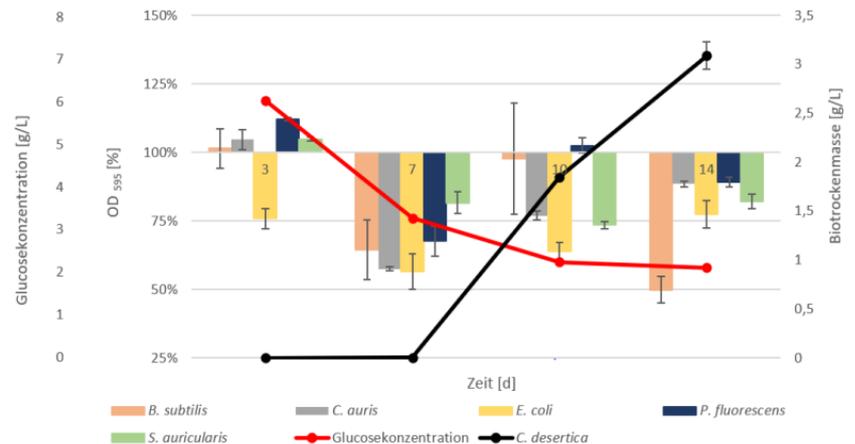
Effekte mixotropher Kultivierung

- Beispiel: *Calothrix desertica*

Phototroph



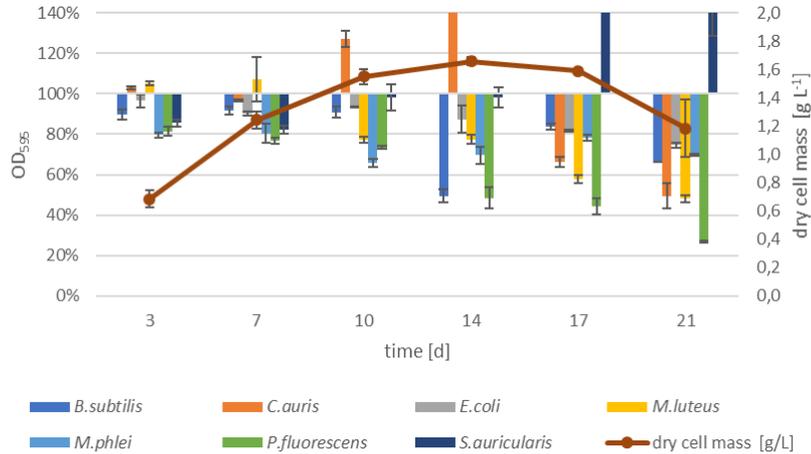
Mixotroph; 0,5 % Glucose



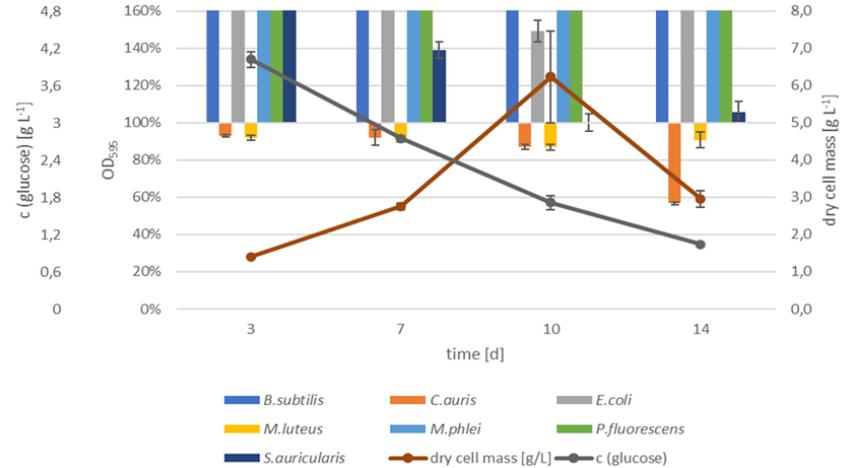
Effekte mixotropher Kultivierung

- Beispiel: *Scytonema stuposum*

Phototroph

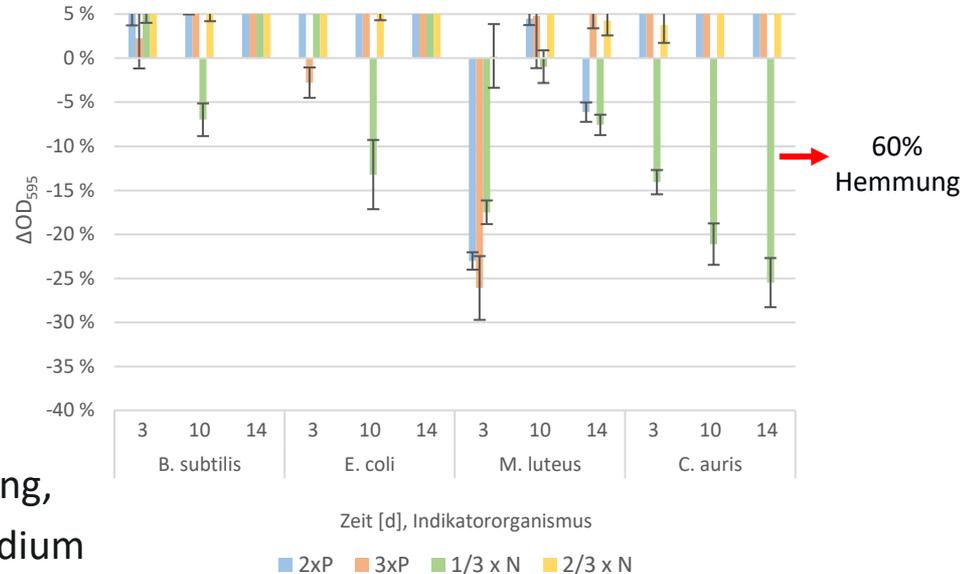


Mixotroph; 0,5 % Glucose



Effekte von Nährstoffanpassungen

- Beispiel: *Scytonema stuposum*
- Getestete BG-11 Modifikationen:
 - 2 x PO_4^{3-} -Konzentration
 - 3 x PO_4^{3-} -Konzentration
 - 1/3 x NO_3^- -Konzentration
 - 2/3 x NO_3^- -Konzentration
- Kulturüberstand nach 3, 10 und 14 Tagen auf Inhibition getestet
- Abgebildet: Hemmung nach P/N-Anpassung, abzüglich der Kontrolle mit Standard-Medium



Fazit & Ausblick

- Mixotrophes Wachstum für viele Cyanobakterien möglich
- Verschiedene C-Quellen einsetzbar
- Effekt auf Produktion antimikrobieller Substanzen
- Veränderte N/P-Konz. kann Produktion deutlich erhöhen
- Einfluss heterotropher Kontaminanten ist zu untersuchen
 - mittels qPCR-Methode (Walther *et al.*, 2020)



Stammsammlung terrestrischer Cyanobakterien an der THB

Danksagung



Prof. Dr.-Ing Kai Muffler



Land Rheinland-Pfalz

iProcess

DFG Deutsche
Forschungsgemeinschaft



Prof. Dr. Roland Ulber

Fragen?