

DISS. ETH NO. 30056

MICROFLUIDIC CELL ISOLATION FOR MICROBIAL ECOLOGY

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. Sc. ETH Zurich)

presented by

ROBERTO PIOLI

Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica, Politecnico di Milano
Politecnico di Milano

born on 02.10.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roman Stocker

Dr. Eleonora Secchi

Prof. Dr. Lucio Isa

Prof. Dr. Roberto Rusconi

Prof. Dr. Lars Behrendt

2024

Summary

Microbial communities consist of numerous species, each comprising distinct strains or individual cells with unique attributes and functions. Relying solely on population-level measurements often results in missing crucial information about the specific roles, interactions, and responses of individual microbial cells. Even within clonal populations of the same strain in a laboratory setting, individual cells may exhibit variability in physiological states, responses to environmental cues, or expression of certain genes, aspects that go undetected with traditional methodologies. Additionally, microbial interactions often rely on chemical exchange, a process greatly affected by the spatial distance between microbes—a factor frequently neglected in existing literature. Traditional approaches in microbial ecology generally examine the characteristics and behaviors of entire populations of microorganisms collectively. These approaches treat them as uniform entities and yield valuable insights into overall community dynamics. Nonetheless, these methods often fail to capture the inherent diversity and phenotypic heterogeneity within microbial communities.

To address these limitations, quantitative single-cell analysis has emerged as a powerful tool, allowing the investigation of microbial communities at the level of individual cells. This approach captures the intricate heterogeneity underlying collective behaviors by precisely measuring and characterizing various cellular properties for each individual cell. Parameters such as growth rate, gene expression, protein levels, metabolic activity, and other relevant cellular features are assessed individually, rather than relying on average values obtained from the entire population.

Microfluidics plays a crucial role in enabling quantitative single-cell analysis and provides optical access and imaging capabilities, enabling real-time observation of dynamic cellular processes. This technology offers a high-resolution view of gene expression, morphological changes, and responses to environmental cues, capturing phenotypic heterogeneity within cell populations. Moreover, microfluidic systems allow control over environmental conditions, such as flow rate, and chemical conditions, facilitating the emulation of real microscale ecosystems. This capability is instrumental in investigating complex phenomena like metabolic exchange and signaling interactions among microbial cells.

The integration of microfluidic systems with single-cell isolation techniques has proven to be a powerful tool for advancing our understanding of microbial interactions. Techniques that enable the isolation of individual cells with micrometric precision in spatially controlled environments within a microfluidic platform contribute significantly to unraveling nuanced relationships among microorganisms. This approach provides precise control over the number of cells, allowing the construction of well-defined microbial communities within experimental arenas. Importantly, the ability to regulate distances between isolated microbes becomes crucial, considering the significance of relative spatial locations on cell-cell interactions, especially in processes like chemical exchange.

Several techniques to isolate and pattern microbes with micrometric precision have been proposed in recent years, each with its benefits and drawbacks. This thesis seeks to advance the field of quantitative single-cell analysis in microbial ecology by developing novel techniques based on the combination of microfluidics and single-cell isolation and patterning techniques such as capillarity-assisted assembly and optical tweezers. The integration of these single-cell isolation techniques with microfluidic systems allows for a finer-scale exploration of microbial dynamics, offering valuable insights into the nuanced relationships among microorganisms.

The first part of the thesis focuses on developing a microfluidic technique to position micro-objects with micrometric precision. This technique is first applied to colloids through colloidal patterning—a technique crucial for arranging materials in specific spatial configurations for applications like micro- and nano-electronics, sensing, and plasmonics. Directed colloidal assembly methods, while powerful, are limited by their reliance on specialized equipment. To overcome these limitations, the study introduces a microfluidic platform, leveraging sequential capillarity-assisted particle assembly (sCAPA). This innovative approach deposits individual particles into traps on a polydimethylsiloxane (PDMS) substrate through controlled capillary forces in a microfluidic channel. The platform allows the creation of diverse colloidal patterns under microfluidics operating conditions, with advantages such as minimizing potential contamination and enabling post-functionalization of deposited particle patterns within a microfluidic channel.

The second part of this work explores the controlled patterning of microorganisms through capillarity-assisted assembly. The study introduces a microfluidic platform designed to create versatile patterns of microorganisms, allowing optical access for extended high-throughput monitoring. Successful application to microbial cells, specifically *Escherichia coli*, enables the patterning of thousands of individual cells on

the PDMS surface with monitored growth over time. This innovative approach, combining single-cell deposition and microfluidic technology, allows geometric patterning of microorganisms and precise control of environmental conditions, providing valuable insights into the physiology and ecology of single microbes. The study also investigates the effects of the technique on bacterial viability and physiology, demonstrating adverse effects on patterned cells of *E. coli* MG1655. Notably, the diatom *Thalassiosira pseudonana* and the coccolithophore *Emiliana huxleyi* show growth inhibition post-patterning, leading to the adoption of a different isolation technique for the capture and positioning of phytoplankton cells in the final chapter of the thesis.

In the last part of the thesis, we adapt an existing microfluidic technique using optical tweezers for single-cell isolation to investigate the phytoplankton-bacteria model system *Emiliana huxleyi* – *Phaeobacter inhibens* at a single-cell level. This technique provides full control over the number of *E. huxleyi* and *P. inhibens* cells in isolation chambers. The study highlights the crucial role of senescent algal cell density in shaping the relationship between *E. huxleyi* and *P. inhibens*. Additionally, we show that the loading step of the algae into the microfluidic chip adversely affects algal physiology due to the sensitivity of *E. huxleyi* to the shear rate experienced during the loading process. This finding emphasizes the need for further optimization of the microfluidic technique for studying phytoplankton – bacteria interactions systematically.

This research develops innovative tools to advance the field of quantitative single-cell analysis in microbial ecology. The developed microfluidic techniques based on capillarity-assisted assembly and optical tweezers establish platforms for rigorous single-cell patterning and isolation, offering comprehensive control over environmental conditions and providing optical access. However, the studies show the need for further optimization of these platforms to mitigate detrimental effects on cell physiology, enabling their systematic deployment for in-depth investigations of microbial interactions.

Zusammenfassung

Mikrobielle Gemeinschaften bestehen aus zahlreichen Arten, von denen jede verschiedene Stämme oder einzelne Zellen mit einzigartigen Merkmalen und Funktionen umfasst. Sich ausschließlich auf populationsbezogene Messungen zu verlassen, führt oft dazu, dass entscheidende Informationen über die spezifischen Rollen, Interaktionen und Reaktionen einzelner mikrobieller Zellen übersehen werden. Selbst in klonalen Populationen desselben Stammes in einem Laborumfeld können einzelne Zellen Unterschiede in physiologischen Zuständen, Reaktionen auf Umweltreize oder die Expression bestimmter Gene aufweisen, Aspekte, die mit traditionellen Methoden unbemerkt bleiben. Darüber hinaus basieren mikrobielle Interaktionen auf chemischem Austausch, einem Prozess, der stark von räumlichen Distanzen zwischen Mikroben beeinflusst wird - ein Faktor, der in bestehender Literatur häufig vernachlässigt wird. Traditionelle Ansätze in der mikrobiellen Ökologie untersuchen im Allgemeinen die Merkmale und Verhaltensweisen von gesamten Populationen von Mikroorganismen zusammen. Diese Ansätze behandeln sie als gleichartige Einheiten und liefern wertvolle Einblicke in die Gesamtdynamik der Gemeinschaft. Dennoch gelingt es diesen Methoden oft nicht, die inhärente Vielfalt und phänotypische Heterogenität innerhalb mikrobieller Gemeinschaften zu erfassen.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, hat sich die quantitative Einzelzellanalyse als leistungsstarkes Werkzeug herausgestellt, das es ermöglicht, mikrobielle Gemeinschaften auf der Ebene einzelner Zellen zu untersuchen. Dieser Ansatz erfasst die komplexe Heterogenität unterliegenden kollektiven Verhaltensweisen, indem er verschiedene zelluläre Eigenschaften für jede einzelne Zelle präzise misst und charakterisiert. Parameter wie Wachstumsrate, Genexpression, Proteinspiegel, Stoffwechselaktivität und andere relevante zelluläre Merkmale werden einzeln bewertet, anstatt sich auf Durchschnittswerte aus der gesamten Population zu verlassen.

Mikrofluidik spielt eine entscheidende Rolle bei der Ermöglichung quantitativer Einzelzellanalysen und bietet optischen Zugang sowie Möglichkeiten für die Bildanalyse von dynamischen zellulären Prozessen in Echtzeit. Diese Technologie bietet einen hochauflösenden Blick auf die Genexpression, morphologische Veränderungen und Reaktionen auf Umweltreize, wodurch die phänotypische Heterogenität innerhalb von

Zellpopulationen erfasst wird. Darüber hinaus ermöglichen Mikrofluidiksysteme die Kontrolle über Umweltbedingungen wie Flussrate und chemische Bedingungen, was die Emulation realer Mikroskalen-Ökosysteme erleichtert. Diese Fähigkeit ist entscheidend für die Erforschung komplexer Phänomene wie des Stoffaustauschs und der Signalinteraktionen zwischen mikrobiellen Zellen.

Die Integration von Mikrofluidiksystemen mit Techniken zur Einzelzellisolierung hat sich als leistungsstarkes Werkzeug zur Weiterentwicklung unseres Verständnisses mikrobieller Interaktionen erwiesen. Techniken, die die Isolierung einzelner Zellen mit mikrometrischer Präzision in räumlich kontrollierten Umgebungen innerhalb einer Mikrofluidikplattform ermöglichen, tragen erheblich dazu bei, nuancierte Beziehungen zwischen Mikroorganismen zu entschlüsseln. Dieser Ansatz bietet eine präzise Kontrolle über die Anzahl der Zellen, was die Konstruktion klar definierter mikrobieller Gemeinschaften innerhalb experimenteller Arenen ermöglicht. Insbesondere wird die Fähigkeit, Abstände zwischen isolierten Mikroben zu regulieren, entscheidend, wenn man die Bedeutung relativer räumlicher Positionen für Zell-Zell-Interaktionen berücksichtigt, insbesondere bei Prozessen wie dem chemischen Austausch.

In den letzten Jahren wurden mehrere Techniken zur Isolierung und Musterung von Mikroben mit mikrometrischer Präzision vorgeschlagen, jede mit ihren Vor- und Nachteilen. Diese Dissertation zielt darauf ab, das Gebiet der quantitativen Einzelzellanalyse in der mikrobiellen Ökologie voranzubringen, indem sie neuartige Techniken entwickelt, die auf der Kombination von Mikrofluidik und Einzelzellisolutions- und Musterungstechniken wie kapillarunterstützter Montage und optischer Pinzetten basieren. Die Integration dieser Einzelzellisolationstechniken mit Mikrofluidiksystemen ermöglicht eine feiner abgestimmte Erforschung mikrobieller Dynamiken und bietet wertvolle Einblicke in nuancierte Beziehungen zwischen Mikroorganismen.

Der erste Teil der Dissertation konzentriert sich auf die Entwicklung einer mikrofluidischen Technik zur Positionierung von Mikroobjekten mit mikrometrischer Präzision. Diese Technik wird zunächst auf Kolloide durch kolloidale Musterung angewendet - eine für Anwendungen wie Mikro- und Nanoelektronik, Sensorik und Plasmonik entscheidende Technik zur Anordnung von Materialien in spezifischen räumlichen Konfigurationen. Gerichtete kolloidale Montagetechniken, obwohl leistungsstark, sind auf ihre Abhängigkeit von spezialisierten Geräten beschränkt. Um diese Einschränkungen zu überwinden, führt die Studie eine mikrofluidische Plattform ein, die auf sequenzieller kapillarunterstützter Partikelmontage (sCAPA) basiert. Dieser innovative Ansatz setzt einzelne Partikel durch kontrollierte kapillare Kräfte in einer

mikrofluidischen Kammer auf einem Polydimethylsiloxan (PDMS)-Substrat ab. Die Plattform ermöglicht die Erstellung verschiedener kolloidaler Muster unter den Bedingungen der Mikrofluidik und bietet Vorteile wie die Minimierung möglicher Kontamination und die Ermöglichung der Nachfunktionalisierung von abgelagerten Partikelmustern innerhalb eines mikrofluidischen Kanals.

Der zweite Teil dieser Arbeit erforscht das kontrollierte Muster von Mikroorganismen durch kapillarunterstützte Montage. Die Studie führt eine mikrofluidische Plattform ein, die darauf abzielt, vielseitige Muster von Mikroorganismen zu erstellen und eine optische Zugänglichkeit für eine erweiterte Hochdurchsatzüberwachung zu ermöglichen. Die erfolgreiche Anwendung auf mikrobielle Zellen, insbesondere *Escherichia coli*, ermöglicht das Muster von Tausenden einzelner Zellen auf der PDMS-Oberfläche mit überwachtem Wachstum im Laufe der Zeit. Dieser innovative Ansatz, der Einzelzellablagerung und Mikrofluidik kombiniert, ermöglicht die geometrische Musterung von Mikroorganismen und die präzise Kontrolle der Umweltbedingungen, was wertvolle Einblicke in die Physiologie und Ökologie einzelner Mikroben ermöglicht. Die Studie untersucht auch die Auswirkungen der Technik auf die Lebensfähigkeit und Physiologie von Bakterien und zeigt nachteilige Effekte auf gemusterte Zellen von *E. coli* MG1655. Beachtenswert ist, dass die Diatomee *Thalassiosira pseudonana* und das Coccolithophor *Emiliania huxleyi* nach der Musterung eine Wachstumshemmung zeigen, was zur Anwendung einer anderen Isolationstechnik für den Fang und die Positionierung von Phytoplanktonzellen im letzten Kapitel der Dissertation führt.

Im letzten Teil der Dissertation passen wir eine bestehende mikrofluidische Technik unter Verwendung optischer Pinzetten zur Einzelzellisolierung an, um das Phytoplankton-Bakterien-Modellsystem *Emiliania huxleyi* - *Phaeobacter inhibens* auf Einzelzellebene zu untersuchen. Diese Technik ermöglicht die volle Kontrolle über die Anzahl der *E. huxleyi*- und *P. inhibens*-Zellen in Isolationskammern. Die Studie hebt die entscheidende Rolle der Dichte seneszenten Algenzellen bei der Gestaltung der Beziehung zwischen *E. huxleyi* und *P. inhibens* hervor. Außerdem zeigen wir, dass der Beladungsschritt der Algen in den mikrofluidischen Chip die Physiologie der Algen aufgrund der Empfindlichkeit von *E. huxleyi* gegenüber der Scherrate während des Beladungsvorgangs nachteilig beeinflusst. Diese Erkenntnis unterstreicht die Notwendigkeit einer weiteren Optimierung der mikrofluidischen Technik für systematische Studien der Wechselwirkungen zwischen Phytoplankton und Bakterien.

Diese Forschung entwickelt innovative Werkzeuge zur Weiterentwicklung des Gebiets der quantitativen Einzelzellanalyse in der mikrobiellen Ökologie. Die

entwickelten mikrofluidischen Techniken auf der Grundlage von kapillarunterstützter Montage und optischen Pinzetten schaffen Plattformen für eine rigorose Einzelzellmusterung und -isolierung, bieten umfassende Kontrolle über Umweltbedingungen und ermöglichen optischen Zugang. Die Studien zeigen jedoch die Notwendigkeit weiterer Optimierung dieser Plattformen auf, um schädliche Auswirkungen auf die Zellphysiologie zu minimieren und ihre systematische Anwendung für eingehende Untersuchungen mikrobieller Interaktionen zu ermöglichen.