

DISS. ETH NO. 30364

High-throughput cultivation: A tool to study taxonomic and metabolic responses of individuals' gut microbiota to diverse factors

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCE

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

JANINA NICOLE ZÜND

MSc Biomedical Engineering, ETH Zürich

born on 03.11.1993

accepted on the recommendation of:

Prof. em. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Dr. Benoit Pugin, co-examiner

Prof. Dr. Nicholas Bokulich, co-examiner

Prof. Dr. Thomas Clavel, co-examiner

2024

Summary

The human gut microbiota is highly diverse and unique to each individual. This diversity complicates our understanding of the gut microbiota's role in microbiota-associated diseases like inflammatory bowel disease (IBD). Enhancing our understanding requires examining how individual gut microbiota respond to diet, drugs, and host-related factors. In that context, high-throughput cultivation of fecal microbiota provides a valuable method to investigate the direct effects of different stimuli and their combinations on the community composition and metabolic activities of individuals' gut microbiota.

Ongoing efforts to develop multi-well setups in anaerobic chambers have resulted in protocols with increased throughput that overcome, to some extent, the laborious nature of traditional anaerobic tube-based techniques (e.g., Hungate tubes). In **Chapter 2**, we addressed gaps in cultivating healthy human fecal microbiota using 96-deepwell plates within an anaerobic chamber. We conducted a thorough analysis of how plate-based cultivation in the chamber affects medium chemistry and microbial physiology compared to the established anaerobic Hungate technique. Most importantly, we proposed a modular medium preparation strategy for customizable cultivation conditions. Additionally, we provided specific strategies to flexibly adjust the initial pH of the cultivation medium, maintain the community composition of healthy gut microbiota, and mitigate the commonly observed *in vitro* bloom of *Enterobacteriaceae*. Our findings indicated that plate-based cultivation is as effective as the Hungate technique for assessing condition-specific microbiota responses. Furthermore, the applicability of the protocol was demonstrated by showing that responses of fecal cultures to dietary fiber (resistant dextrin, soluble starch) and drugs (ciprofloxacin, 5-fluorouracil) were similar to those reported *in vivo*. Overall, we presented a simple cultivation-based approach for rapidly testing multiple conditions and their combinations on diverse fecal microbiota, all detailed in a comprehensive step-by-step protocol.

Having established a flexible high-throughput protocol, we deployed it in two additional studies aimed at enhancing our knowledge of gut microbial responses in both health and disease.

In **Chapter 3**, we sought to extend the developed high-throughput protocol to model oxidative stress, a relevant factor in inflammation-associated diseases that could lead to compositional shifts and altered functionality of the gut microbiota. We studied the effect of two relevant microbial oxidative stress mediators, H₂O₂ and O₂, in a taxonomically and metabolically representative collection of intestinal strains and diverse fecal microbiota cultures. Twelve different H₂O₂ and O₂ conditions were tested in pure strains (n=41), providing a comprehensive comparison of the oxidative stress tolerance of important gut anaerobes. Testing of selected

oxidative stress conditions (i.e., 0.71 mM H₂O₂ or aerobic incubation) in fecal cultures (n=7) resulted in physiologically relevant community shifts as typically observed in IBD, e.g., loss of sensitive anaerobes and a relative increase of facultative anaerobes (e.g., *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia-Shigella*). These oxidative stress conditions also enabled the identification of donor-specific stress patterns, such as the bloom of the [*Ruminococcus*] *gnavus* group, a common IBD feature. Finally, we found that O₂-stressed fecal cultures had a significantly lower capacity to produce butyrate, a microbial metabolite central to intestinal homeostasis. Altogether, such an *ex vivo* model platform has the potential to facilitate rapid screening of individual gut microbiota responses to inflammation-mediated oxidative stress.

Chapter 4 focused on deciphering the pathways of indolepropionate (IPA), a microbial metabolite of the tryptophan metabolism associated with host health and commonly found decreased in IBD. Despite its importance in microbiota-host communication, the specific human gut microbes responsible for IPA synthesis remain largely unknown until now. Characterization of IPA-producing taxa and strategies to promote IPA is essential for understanding their role in health and disease. By evaluating seven different dietary fibers in healthy human fecal microbiota (n=16) using the high-throughput cultivation platform developed in this thesis, we found that pectin specifically promoted the reductive tryptophan metabolism, leading to higher levels of IPA or its precursor indolelactate (ILA). Targeted screening of pure cultures after enrichment in tryptophan-rich medium led to the identification of *Lachnospira eligens* as a novel ILA producer and *Enterocloster aldenensis* as a novel IPA producer. Co-cultivation experiments with these species confirmed the potential for ILA cross-feeding between human gut strains. Our results suggest that pectin fiber is a strong promoter of IPA production via ILA cross-feeding mechanisms, underscoring the promise of dietary interventions to selectively enhance beneficial gut microbiota and promote gastrointestinal health.

In summary, this thesis highlights the potential of *ex vivo* high-throughput cultivation of human fecal microbiota to offer a donor-specific perspective on gut microbial responses to various stimuli and to characterize new metabolic activities. This approach paves the way for personalized microbiota-centered interventions.

Zusammenfassung

Im menschlichen Verdauungstrakt lebt eine Vielzahl von Mikroorganismen, dominiert von Bakterien. Die Zusammensetzung der menschlichen Darmmikrobiota ist bei jedem Menschen einzigartig. Diese Vielfalt erschwert unser Verständnis der Rolle der Darmflora bei Krankheiten wie entzündlichen Darmerkrankungen (IBD). Um besser zu verstehen, wie die Darmflora unsere Gesundheit beeinflusst, müssen wir besser verstehen, wie die individuelle Darmmikrobiota auf Ernährung, Medikamente und physiologische Veränderungen im Darm reagiert. Die Kultivierung von Stuhlproben ist dafür eine wertvolle Methode. Sie ermöglicht es, die direkten Auswirkungen verschiedener Stimuli und ihrer Kombinationen auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der Darmmikrobiota von Individuen zu untersuchen.

Die Entwicklung von High-throughput Protokollen (mit 96-well-Platten) zur effizienteren Kultivierung von Darmmikrobiota soll eine Alternative zu bestehenden, zeit- und kostenintensiven anaeroben Techniken (z.B. Hungate Technik) bieten. **In Kapitel 2** haben wir uns mit einigen Herausforderungen bei der Kultivierung in 96-well Platten und anaeroben Kammern beschäftigt. Wir analysierten, wie die High-throughput Kultivierung in 96-well-Platten im Vergleich zur etablierten anaeroben Hungate-Technik die Chemie des Nährmediums und die Physiologie der Bakterien beeinflusst. Darüber hinaus haben wir Strategien implementiert, die eine flexible Zusammensetzung des Nährmediums ermöglichen und die Diversität der Darmmikrobiota *in vitro* erhalten. Die Evaluierung der neuen Methode mit der Hungate Technik ergab vergleichbare Ergebnisse. Die Anwendung des Protokolls zeigte auch, dass Ballaststoffe (resistente Dextrine, lösliche Stärke) und Medikamente (Ciprofloxacin, 5-Fluorouracil) ähnliche Effekte auf die kultivierte Mikrobiota haben wie *in vivo*. Insgesamt haben wir einen einfachen Ansatz für die Kultivierung von Stuhlproben vorgestellt, mit dem verschiedene Bedingungen und deren Kombinationen an unterschiedlichen Darmmikrobiota effizient getestet werden können.

Nach der Etablierung des Protokolls für die flexible und schnelle Analyse von Stuhlproben haben wir es in zwei weiteren Studien eingesetzt, um unser Wissen über die Reaktionen der Darmmikrobiota bei Gesundheit und Krankheit zu erweitern.

In **Kapitel 3** erweiterten wir das entwickelte Protokoll zur Modellierung von oxidativem Stress, einem relevanten Entzündungsfaktor, der zu Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktionalität der Darmmikrobiota führen kann. Dazu untersuchten wir die Wirkung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Sauerstoff (O₂), zwei relevanten Oxidantien, sowohl auf eine Auswahl von 41 Darmbakterien als auch auf die Darmmikrobiota gesunder Erwachsener

(n=7). Wir testeten die Stresstoleranz der Darmbakterien unter zwölf verschiedenen H₂O₂- und O₂-Bedingungen. Ausgewählte Bedingungen (z.B. 0,71 mM H₂O₂ oder aerobe Inkubation) wurden dann auf komplexe Darmmikrobiomkulturen angewendet, was zu physiologisch relevanten Veränderungen in der Mikrobiomzusammensetzung führte, wie sie typischerweise bei IBD beobachtet werden. Beispielsweise beobachteten wir einen Verlust von empfindlichen anaeroben Bakterien und eine relative Zunahme von fakultativ anaeroben Bakterien (z.B. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia-Shigella*). Darüber hinaus ermöglichten die oxidativen Stressbedingungen die Evaluierung spezifischer Effekte auf die Mikrobiota, wie z.B. eine erhöhte Präsenz der [*Ruminococcus*] *gnavus* Gruppe, ein häufiges Merkmal von IBD. Wir stellten außerdem fest, dass die O₂-exponierten Kulturen eine signifikant verringerte Fähigkeit zur Produktion von Butyrat aufwiesen, einem Metaboliten, der für die Darmgesundheit von entscheidender Bedeutung ist.

In **Kapitel 4** wurde die Produktion von Indolepropionat (IPA) untersucht, einem Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels, der neben Butyrat ebenfalls mit der menschlichen Gesundheit in Verbindung gebracht wird. Die für die IPA-Produktion verantwortlichen Darmbakterien sind jedoch weitgehend unbekannt, und die Charakterisierung der IPA-produzierenden Darmbakterien ist entscheidend für das Verständnis ihrer Rolle bei Gesundheit und Krankheit. Für eine erste Charakterisierung testeten wir den Effekt von sieben verschiedenen Ballaststoffen auf die IPA-Produktion in kultivierten Stuhlproben (n=16). Wir fanden heraus, dass insbesondere Pektin den reduktiven Tryptophanstoffwechsel fördert, was zu höheren Mengen an IPA oder Indolelactat (ILA), einem intermediären Stoffwechselprodukt, führt. Durch gezieltes Screening von Bakterienkulturen konnten *Lachnospira eligens* als neuer ILA-Produzent und *Enterocloster aldenensis* als neuer IPA-Produzent identifiziert werden. Co-Kultivierungsexperimente zeigten auch den Austausch von ILA zwischen diesen beiden Bakterien. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass Pektin über ILA die Produktion von IPA fördert. Dies weist die Richtung für potentielle Nahrungsergänzungsmittel, die zur selektiven Stimulierung der IPA-Produktion durch Darmbakterien eingesetzt werden könnten.

Zusammenfassend unterstreicht diese Arbeit das Potential der *in vitro* Stuhltestung. Sie ermöglicht einen individuellen Blick auf die Reaktionen der Darmmikrobiota auf verschiedene Stimuli und neue Stoffwechselaktivitäten. Diese Erkenntnisse könnten zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen dem Darmmikrobiom und der menschlichen Gesundheit beitragen.