

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anamarija ALEGRO

**KONTINUIRNO GOJENJE BAKTERIOFAGOV V
BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anamarija ALEGRO

**KONTINUIRNO GOJENJE BAKTERIOFAGOV V
BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**CONTINUOUS PRODUCTION OF
BACTERIOPHAGES IN A BIOREACTOR**

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje - Biotehnologija. Opravljeno je bilo v podjetju Jafral d.o.o.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Aleša Podgornika, za somentorja prof. dr. Petra Rasporja in za recenzenta prof. dr. Marina Beroviča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Aleš PODGORNIK
 Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno
 kontrolu, Laboratorij za bioanalitiko, Ajdovščina

Član: prof. dr. Peter RASPOR
 Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju

Recenzent: prof. dr. Marin BEROVIČ
 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,
 Katedra za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Anamarija Alegro

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:602.3:578.347(043.2)=163.6
KG	bakteriofagi/ <i>Salmonella</i> /kemostat/kontinuirni sistem/ produkcija bakteriofagov/fagna terapija/bioprocessi/bioreaktorji
AV	ALEGRO Anamarija
SA	PODGORNIK, Aleš (mentor)/RASPOR, Peter (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2014
IN	KONTINUIRNO GOJENJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XI, 64 str., 13 pregl., 31 sl., 4 pril., 77 vir
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakteriofagi so virusi, ki okužijo in lizirajo bakterije. Njihova uporaba strmo narašča v proizvodnji živil, v kmetijstvu in diagnostiki. Potencialna uporaba se kaže tudi v medicini, kjer bi lahko s bakteriofagno terapijo zdravili okužbe z bakterijami, ki so odporne na antibiotike. Bakterije iz rodu <i>Salmonella</i> , so patogeni organizmi, ki pogosto povzročajo bolezni pri ljudeh in živalih. V magistrskem delu smo poskušali postaviti kontinuirni sistem za proizvodnjo fagov, ki so specifični za salmonele. Najprej smo postavili šaržni proces za gojenje bakterije v bioreaktorju. Določili smo maksimalno specifično hitrost rasti (μ_{max}) $1,24 \text{ h}^{-1}$. S spremeljanjem deleža raztopljenega kisika (% pO ₂), smo ugotovili, da je kisik limitni faktor pri gojenju bakterij v šaržnem procesu. Pri gojenju bakteriofaga v šaržnem procesu smo ugotovili, da ta potrebuje 45 min, da bakterijo inficira, se v njej namnoži in jo lizira. Optimalen trenutek infekcije bakterij, je ko te dosežejo vrednost absorbance 0,500, pri čemer jih okužimo s fagi v koncentraciji $5 \times 10^7 \text{ PFU/ml}$. Kontinuirni sistem smo sestavili iz dveh zaporedno vezanih bioreaktorskih posod. Prva je bila namenjena kontinuirnem gojenju bakterije. Kemostat smo vodili pri razredčevalnem času (D) $0,85 \text{ h}^{-1}$ in vzdrževali koncentracijo celic pri vrednosti absorbance 0,500. Kot limitni faktor smo uporabili kisik. Stacionarno stanje smo dosegli po dveh urah kontinuirnega gojenja. Druga posoda je bila namenjena kontinuirni proizvodnji bakteriofagov. Tudi v drugi bioreaktorski posodi se je stacionarno stanje vzpostavilo po dveh urah vodenja kontinuirnega procesa. Titer bakteriofagov v stacionarnem stanju je bil $1 \times 10^{10} \text{ PFU/ml}$. Postavljen kontinuirni proces je šestkrat bolj produktiven kot šaržni proces.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 606:602.3:578.347(043.2)=163.6
CX bacteriophages/*Salmonella*/chemostat/continuous process/ bacteriophages production/phage therapy/bioprocesses/bioreactors
AU ALEGRO Anamarija
AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)/RASPOR, Peter (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study in Biotechnology
PY 2014
TI CONTINUOUS PRODUCTION OF BACTERIOPHAGES IN A BIOREACTOR
DT M.Sc. thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)
NO XI, 64 p., 13 tab., 31 fig., 4 ann., 77 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacteriophages are viruses that infect and lyse bacteria. Their use is rising steeply in food production, agriculture and diagnostics. Potential application is in medicine, known as bacteriophage therapy, for healing infections caused by antibiotic resistant bacteria. *Salmonella* is a genus of pathogens bacteria causing human and animal illness. The purpose of the thesis was to establish continuous production of bacteriophages, specific for *Salmonella*. At the beginning bacteria were grown in batch culture. Maximal specific growth rate (μ_{\max}) in exponential growth phase was $1,24 \text{ h}^{-1}$. By monitoring the proportion of dissolved oxygen we found out that oxygen is a limiting factor in the batch process. Bacteriophages need 45 min to infect and lyse bacteria cells in the batch process. The optimum time of infection is at absorbance (600nm) 0,500 with phage titer $5 \times 10^7 \text{ PFU/ml}$. Our continuous system was composed of two bioreactor vessels. The first vessel was for bacteria production by chemostat process. The dilution rate (D) was constant at $0,85 \text{ h}^{-1}$. By using oxygen as the limitation factor, the cell concentration was maintained at absorbance (600nm) 0,500. In second vessel the continuous production of bacteriophages was carried out in chemostat. Steady state conditions were met two hours after the beginning of the continuous process. The highest titer achieved was $1 \times 10^{10} \text{ PFU/ml}$. Our continuous process is six times more productive then the batch process.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DELOVNI ORGANIZEM <i>Salmonella</i>	3
2.2 BAKTERIOFAGI	4
2.2.1 Klasifikacija in razmnoževanje bakteriofagov	5
2.2.2 Uporaba bakteriofagov	7
2.2.3 Proizvodnja bakteriofagov	10
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Bakterijski sev.....	14
3.1.2 Bakteriofag	14
3.1.3 Aparature in oprema	14
3.2 METODE	15
3.2.1 Priprava tekočega, mehkega in trdega gojišča	15
3.2.2 Priprava banke bakterijske kulture, vcepka in preverjanje čistosti kulture.....	16
3.2.3 Merjenje absorbance	17
3.2.4 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču	17
3.2.5 Gojenje bakterijske kulture v šaržnem in kontinuirnem procesu	17
3.2.6 Priprava vcepka bakteriofagov	19
3.2.7 Metoda plakov	19
3.2.8 Gojenje bakteriofaga v šaržnem procesu	20
3.2.9 Izračun števila pomnoženih fagov v eni celici	20
3.2.10 Določitve konstante adsorpcije.....	22
3.2.11 Merjenje parcialnega tlaka raztopljenega kisika	22
3.2.12 Postavitev kontinuirnega procesa	23
4 REZULTATI	25
4.1 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE NA STRESALNIKU.....	25
4.2 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE V BIOREAKTORJU.....	26
4.3 GOJENJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU V ŠARŽNEM PROCESU ...	30

4.4	KONTINUIRNO GOJENJE	39
4.4.1	Kemostat.....	39
4.4.2	Kontinuirno gojenje bakterije.....	41
4.4.3	Kontinuirno gojenje bakteriofagov.....	42
4.4.4	Poskus povišanja koncentracije fagov v iztoku iz kontinuirnega sistema....	46
4.4.5	Primerjava produktivnosti šaržnega in kontinuirnega procesa	48
5	RAZPRAVA	49
5.1	GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE NA STRESALNIKU.....	49
5.2	GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE V BIOREAKTORJU.....	49
5.3	ŠARŽNO GOJENJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU.....	50
5.4	KONTINUIRNO GOJENJE	53
5.4.1	Kemostat.....	53
5.4.2	Kontinuirno gojenje bakterije.....	54
5.4.3	Kontinuirno gojenje bakteriofagov.....	54
5.4.4	Poskus povišanja koncentracije fagov v iztoku iz kontinuirnega sistema....	55
5.4.5	Primerjava produktivnosti šaržnega in kontinuirnega procesa	55
6	SKLEPI	57
7	POVZETEK.....	58
8	VIRI.....	59
	ZAHVALA	
	PRILOGA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:Klasifikacija <i>Salmonella</i> (Bergey`s ..., 2001).....	4
Preglednica 2: Klasifikacija fagov specifičnih za salmonele (ICTV, 2013).	5
Preglednica 3: Sestava 1 X LB tekočega gojišča.	15
Preglednica 4: Sestava mehkega gojišča.	16
Preglednica 5: Sestava trdega gojišča.....	16
Preglednica 6: Procesni parametri in pogoji gojenja v šaržnem procesu	18
Preglednica 7: Odstotek neinficiranih celic in enkrat ali večkrat inficiranih celic pri različnih MOI vrednostih.....	21
Preglednica 8: Povprečno število nastalih fagov na celico, pri različnih MOI vrednostih, ki upošteva, da so bile celice inficirane enkrat ali večkrat.	21
Preglednica 9: k_{La} vrednosti pri različnih hitrostih mešanja in intenziteti prezračevanja.....	23
Preglednica 10: Primerjava produktivnosti proizvodnje bakteriofagov med poskusi A,B,C,D,E,F,G in H.....	36
Preglednica 11: Podatki za izračun konstante adsorpcije.....	38
Preglednica 12: Izračun števila liziranih celic in novo nastalih fagov na podlagi eksperimentalnih podatkov pridobljenih tekom poskusa kontinuirni proces 1.....	46
Preglednica 13: Podatki o začetni in ustaljeni koncentraciji bakteriofagov v kontinuirnih procesih 1,2,3,4,5 in 6, ter spremembe v gojenju, s katerimi smo poskušali povisati končno koncentracijo fagov.....	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Bakteriofagi iz družin Podoviridae, Siphoviridae in Myoviridae (Carey-Smith in sod., 2006; Mmolawa in sod., 2002).	5
Slika 2: Prikaz lizogenega in litičnega cikla razmnoževanja bakteriofagov (Matsuzaki in sod., 2005).	6
Slika 3: Rastna krivulja bakteriofagov (Hyman and Abedon, 2009; Jin in sod., 2012).	7
Slika 4: Potek eksperimentalnega dela.	13
Slika 5: Bioreaktorski sistem, ki smo ga uporabljali za gojenje bakterije in bakteriofagov v šaržnem in kontinuirnem procesu.	18
Slika 6: Določanje koeficiente prenosa kisika, k_{LA} , po razplinjevalni metodi.	23
Slika 7: Kontinuirni sistem.	24
Slika 8: Primerjava spremmljanja prirasta celične biomase z optično metodo (absorbanca (600nm)) in metodo štetja kolonij (CFU/ml) tekom 300 min gojenja na stresalniku pri 37 °C in 200 obr./min.	25
Slika 9: Določitev maksimalne specifične hitrosti (μ_{max}) rasti bakterije gojene na stresalniku.	26
Slika 10: Primerjava spremmljanja prirasta celične biomase z optično metodo (absorbanca) in metodo štetja kolonij (CFU/ml) tekom 300 min gojenja v bioreaktorju pri 37 °C in 400 obr./min.	27
Slika 11: Določitev maksimalne specifične hitrosti (μ_{max}) rasti bakterije gojene v bioreaktorju.	28
Slika 12: Odvisnost števila celic/ml (CFU/ml) od absorbance.	29
Slika 13: Spremljanje deleža parcialnega tlaka kisika in celične mase (absorbance) tekom gojenja bakterije v šaržnem procesu.	30
Slika 14: Poskus A. Gojenje bakteriofagov v šaržnem procesu v bioreaktorju, ki je zaključeno po enem ciklu pomnožitve fagov.	31
Slika 15: Spremljanje rasti celične biomase z metodo štetja kolonij (Število CFU/ml) in z merjenjem optične gostote (absorbanca) tekom gojenja bakteriofaga v šaržnem procesu.	32
Slika 16: Poskus B. Gojenje bakteriofagov v šaržnem procesu v bioreaktorju, ki je bilo zaključeno po dveh ciklih pomnožitve fagov.	33
Slika 17: Poskus C. Gojenje bakteriofagov v šaržnem procesu, ki je bilo zaključeno po treh ciklih pomnožitve fagov.	34
Slika 18: Primerjava gibanja koncentracije bakteriofagov (A) in celične mase (B) v poskusih A,B in C.	35
Slika 19: Primerjava gibanja koncentracije bakteriofagov (A) in celične mase (B) v poskusih D, E in F.	36
Slika 20: Primerjava gibanja koncentracije bakteriofagov v bioprosesni brozgi v poskusih F, G in H.	37

Slika 21: Število fagov, ki se namnoži v eni bakterijski celici v odvisnosti od števila fagov na bakterijsko celico ob infekciji.....	37
Slika 22: Spremljanje deleža parcialnega tlaka kisika in celične mase (absorbance) tekom gojenja v šaržnem procesu.....	38
Slika 23: Gjenje bakterijske kulture kemostatu.....	39
Slika 24: Prikazuje skladnost med številom celic v kemostatu, ki je bilo pridobljeno z metodo štetja kolonij in številom celic, ki smo jih na podlagi absorbance preračunali iz enačbe premice umeritvene krivulje.....	40
Slika 25: Povprečna vrednost gibanja celične mase tekom vodenja kemostata.....	40
Slika 26: Spremljanje deleža parcialnega tlaka kisika in celične mase (absorbance) tekom gojenja bakterije v kemostatu.....	41
Slika 27: Kapaciteta namnožitve biomase v dvostopenjskem kontinuirnem procesu.....	42
Slika 28: Gibanja celične biomase v dvostopenjskem kontinuirnem sistemu tekom gojenja bakteriofagov	43
Slika 29: Primerjava števila celic na ml v dvostopenjskem kontinuirnem sistemu tekom gojenja bakteriofagov in sicer v posodi 1 (A) in posodi 2 (B).	44
Slika 30: Gibanje koncentracije bakteriofagov v kontinuirnem procesu 1 (KP1) v posodi 2 ...	45
Slika 31: Primerjava gibanje koncentracije bakteriofagov v kontinuirnih procesih (KP) 2, 3, 4, 5 in 6 v katerih so bilo določeni parametri različni od parametrov gojenja v KP1 (glej pregl. 13).	47

KAZALO PRILOG

- Priloga 1: Podatki za vrednost absorbance, ki so bili pridobljeni tekom šaržnega gojenja bakterijske kulture na stresalniku.
- Priloga 2: Podatki za vrednost absorbance, ki so bili pridobljeni tekom šaržnega gojenja bakterijske kulture v bioreaktorju.
- Priloga 3: Prikaz podatkov o koncentraciji celic ob infekciji (absorbanca), začetno in končno koncentracijo fagov, MOI ter produktivnost za poskuse gojenja bakteriofagov v šaržnem procesu.
- Priloga 4: Prikaz podatkov števila celic v vtoku in iztoku iz posode 2 ter koncentracije fagov v iztoku iz kontinuirnega sistema pridobljenih tekom poskusa kontinuirni proces 1 (KP1).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a_w	aktivnost vode
CFU	število bakterij, ki tvorijo kolonijo na trdem gojišču (ang. Colonie forming units)
ICTV	mednarodni komite za taksonomijo virusov (ang. International Committee in Taxonomy of Viruses)
k_{La}	volumenski koeficient snovnega prestopa oziroma prenosa kisika
LB	Luira-Bertanijevo gojišče
MOI	število fagov na eno bakterijsko celico ob času infekcije. (ang. Multiplicity of infection)
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NaCl	natrijev klorid
OD	optična gostota (ang. Optical density)
PFU	število fagnih kolonij - plakov (ang. Phage forming unit)
$Y_{Glc/X}$	izkoristek glukoze za tvorbo biomase
$Y_{O_2/X}$	izkoristek kisika za tvorbo biomase
μ	specifična hitrost rasti
μ_{max}	maksimalna specifična hitrost rasti

1 UVOD

Bakteriofagi (fagi) so virusi, ki okužijo bakterijske celice. Za njih je značilno, da so vrstno specifični, saj lahko inficirajo samo bakterije določene vrste. V osnovi so fagi sestavljeni iz proteinske glave oz. kapside, ki vsebuje dedni material, vratu in nog (Hyman and Abedon, 2009). Bakteriofagi prepoznaajo gostujoč organizem, injicirajo vanj svoj dedni material in uporabijo bakterijske mehanizme za sintezno novih fagov. Po končani sintezi fagnih delcev in sestavljanju le-teh, se fagi sprostijo z lizo bakterijske celice sprostijo v okolje (Gadagkar in Gopinathan, 1980).

Dandanes se zaradi pretirane in nepravilne uporabe antibiotikov pojavlja vse več bakterij, ki postanejo odporne na antibiotike, zato se intenzivno iščejo nove metode zdravljenja bolezni, ki jih povzročajo bakterije. Bakteriofagna terapija je ena izmed možnih rešitev, ki bi omogočala zdravljenje nevarnih bakterijskih okužb (Bratkovič in Preželj, 2008). Uporaba fagov bi bila v primerjavi z uporabo antibiotikov bolj varna in specifična, saj ne bi imela vpliva na ostale bakterije v gastrointestinalnem traktu (Mizoguchi in sod., 2003). Fagi se že uspešno uporabljajo v raziskavah in diagnostiki za detekcijo bakterij (Lu in Koeris, 2011; McCoy, 2011). V prehrambni industriji se tekom proizvodnje živil kot so meso, sir, sadje in zelenjava uporablja fage za preprečitev okužb s patogenimi bakterijami (Listex, 2012). Za uporabo fagnih pripravkov v komercialne namene, morajo ti vsebovati bakteriofage v visokih koncentracijah. Za dosego tega cilja je poznavanje fiziologije gostujočega organizma in lastnosti fagov ključnega pomena. Da bi zadostili potrebe po fagih je potrebno razviti procese, ki so produktivni in enostavni za vodenje (Calsina in sod., 2011).

Bakteriofage se lahko goji na šaržni ali kontinuirni način v bioreaktorju. Šaržni proces je klasičen način proizvodnje fagov. Je robusten, enostaven za upravljanje in se običajno zaključi v nekaj urah. Končni produkt procesa so fagi v visoki koncentraciji (Sauvageau, 2010). Kontinuirni procesi proizvodnje fagov niso tako dobro raziskani, kot šaržni. V večini primerov se s kontinuirnimi procesi proizvaja rekombinantne proteine s pomočjo fagnih vektorjev (Park in Park, 2000; Oh in sod., 2005; Chen in Cen, 2005). S kontinuirno proizvodnjo fagov se lahko doseže večjo produktivnost kot pri šaržnem procesu. Pri slednjem procesu se veliko časa porabi za ponovno postavitev procesa. (Sauvageau, 2010).

Bakterije iz rodu *Salmonella* so patogene bakterije in so ene izmed glavnih povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano. Najpogostejši vir okužbe so meso perutnine, jajca, surovo mleko in voda. Salmoneloze so bolezni, ki jih povzročajo salmonele (Cox, 1999). Poznanih je več kot 2500 serotipov *S. enterica*, med katerimi večino okužb povzročita serotipa *S. enteritidis* in *S. typhimurium*. Tehnologije dekontaminacije temeljijo fizikalnih, kemičnih in bioloških obdelavah kontaminiranih živil. Uporaba bakteriofagov predstavlja alternativo klasičnim metodam za preprečitev okužb s salmonelami (Moreira, 2013).

1.1 CILJI DELA

Namen magistrskega dela je bil v prvi fazi postavitev šaržnega procesa za gojenje bakterije rodu *Salmonella* v bioreaktorju in določitev optimalnega trenutka infekcije z bakteriofagi. Poskušali smo tudi optimizirati titer bakteriofagov in določiti ustrezen MOI vrednost. V drugi fazi smo iz šaržnega procesa prešli na kontinuirni proces. Z upoštevanjem pridobljenih rezultatov iz šaržnega gojenja bakterije in bakteriofaga smo postavili dvofazni kontinuirni sistem. Najprej smo poskušali vzpostaviti kontinuirno gojenje bakterije v kemostatu. Bakterije, gojene v kemostatu, so substrat za fage v drugem delu kontinuirnega sistema. Na koncu smo poskusili postaviti še ustrezen matematični model za opis dvofaznega kontinuirnega gojenja bakteriofagov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo postavili naslednje hipoteze:

- Mogoče je postaviti dvofazni bioreaktorski sistem gojenja bakterij.
- V dvofaznem bioreaktorskem sistemu je mogoče gojiti bakteriofage.
- V dvofaznem bioreaktorskem sistemu s povratnim tokom je mogoče gojiti bakteriofage.
- Delovanje dvofaznega bioreaktorskoga sistema je mogoče opisati z matematičnim modelom.

2 PREGLED OBJAV

V poglavju pregled objav smo predstavili izsledke strokovne literature, ki pomenijo izhodišče za eksperimentalno delo.

2.1 DELOVNI ORGANIZEM *Salmonella*

Leta 1900 je bil rod bakterij znotraj reda enterobakterij poimenovan *Salmonella*. Rodu je ime dodelil francoski znanstvenik Dr. J. Lignieres v čast Danielu Elmerju Salmonu, ameriškemu veterinarju, ki je svoje življenje posvetil preučevanju bolezni živali (The *Salmonella* Subcommittee, 1934). Bakterije iz rodu salmonel so $0.7\text{--}1.5 \times 2.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$ velike, gibljive paličaste bakterije. Gibljivost jim omogočajo bički, ki so običajno enakomerno razporejeni po celotni površini (Popoff in Minor, 2005). So tudi fakultativno anaerobne, po gramu negativne bakterije, ki so oksidaza negativne in katalaza pozitivne. Salmonela lahko raste znotraj temperaturnega območja $2\text{ -- }54^\circ\text{C}$. Optimalna rastna temperatura je pri 37°C . To je temperatura njenega naravnega habitata, gastrointestinalnega trakta toplokrvnih živali. Za optimalno rast salmonel mora biti pH znotraj območja $6.5\text{--}7.5$ in a_w med 0,999 in 0,945 (Cox, 1999). Salmonele so patogene bakterije, ki povzročajo bolezni pri ljudeh in živalih. Zato je največ raziskav narejenih na serotipu *Typhimurium* (*S. typhimurium*), ki povzroča gastroenteritis, vnetje črevesne sluznice (Popoff in Minor, 2005). V preglednici 1 je prikazana klasifikacija bakterij iz rodu salmonel po Bergerjevem priročniku (2001). Rod *Salmonella* delimo na tri vrste, in sicer *S. enterica*, ki se deli na šest podvrst, *S. bongori* in *S. subterranea*. Podvrste *S. enterica*, ki se med seboj razlikujejo po genetskih in biokemijskih lastnostih, se delijo naprej na serotipe na osnovi antigenskih razlik v lipopolisahariu, flagelinu in kapsuli (Cox, 1999; Shelobolina in sod., 2004). Vrsta *S. enterica* obsega več kot 99 % vseh salmonel (Garity in sod., 2004; Yan in sod., 2003).

Bakterije iz rodu salmonel niso poznane kot industrijske bakterije, ki bi jih uporabljali za proizvodnjo farmacevtsko in živilsko pomembnih snovi. Salmonele so tiste bakterije, katerih rast se običajno želi preprečiti. V proizvodnji, distribuciji in pripravi živil se poskuša onemogočiti rast patogenih bakterij, ki se prenašajo s hrano. Zato je potrebno poznati parametre, ki vplivajo na rast salmonel. Wilson in sod. (2003) so določili izkoristek glukoze in kisika za tvorbo biomaso. *S. typhimurium*, ki raste na soja tripton gojišču, z dodanim kvasnim ekstraktom in glukozo, pri pH 7 in temperaturi 37°C , porabi približno $1,1 \times 10^{-14}$ mol glukoze/celico in $1,9 \times 10^{-14}$ mol kisika/celico. Maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{\max}) je, pri optimalni temperaturi in optimalnem pH, $1,5 \text{ h}^{-1}$. Pri nižjih oz. višjih temperaturah se μ_{\max} hitro znižuje, tako je pri 25°C maksimalna specifična hitrost rasti samo še $0,4 \text{ h}^{-1}$. Tudi s spremembou pH vrednosti vplivamo na hitrost rasti bakterije, s tem da je odvisna od snovi s katero spremenjamo pH. Pri isti pH vrednosti bo rast bakterije bolj inhibirana, če gojišče zakisamo z ocetno kislino, s tem ko bo klorovodikova kislina

imela manjši vpliv na hitrost rasti. Šibke organske kisline, v nasprotju z anorganskimi, prodrejo v celico preko membranskih kanalčkov, znižajo pH citoplazme in tako vplivajo na metabolizem celice (Alvarez-Ordoñez in sod., 2010). Viabilnost bakterijskih celic se ohrani nekaj let, če jo shranimo v pepton agarju, v tesno zamašenih vialih (Popoff in Minor, 2005).

Preglednica 1: Klasifikacija *Salmonella* (Bergery's ..., 2001).

Taksonomska shema	
Domena	Bacteria
Kraljestvo	Bacteria
Deblo	Proteobacteria
Razred	Proteobacteria
Podrazred	Gammaproteobacteria
Red	Enterobacteriales
Družina	Enterobacteriaceae
Rod	<i>Salmonella</i>
vrsta	<i>enterica, bongori in subterranea</i>

2.2 BAKTERIOFAGI

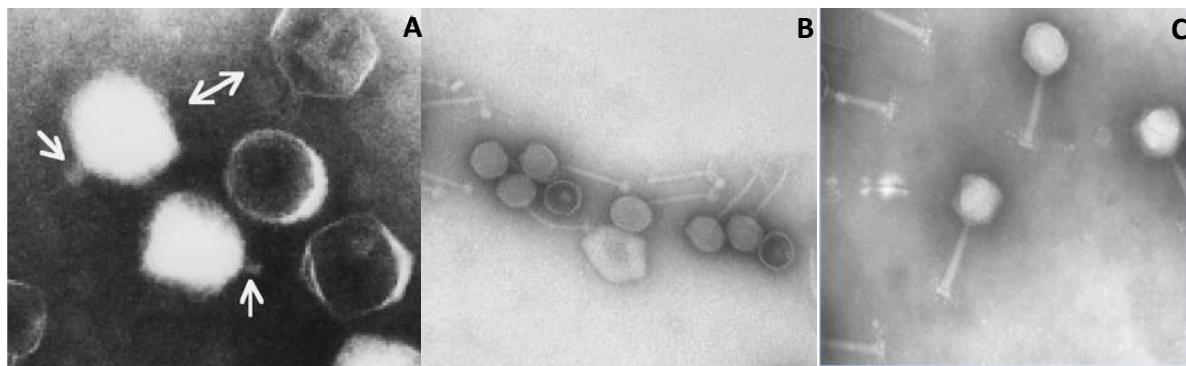
Bakteriofagi so bakterijski virusi, ki se razmnožujejo izključno v bakterijskih celicah. V začetku 20. stoletja sta jih prva neodvisno opazila francosko-kanadski mikrobiolog Félix d'Herelle in angleški bakteriolog Frederick Twort. Slednji je sklepal, da bakterije uniči proteinski dejavnik, medtem ko je d'Herelle kot vzrok navedel mikroorganizem, ki se hrani z bakterijami. Tako so bakteriofagi tudi dobili ime, saj beseda fag izhaja iz grščine in pomeni požreti (Sulakvelidze in sod., 2001; Stone, 2002). V naravi lahko fage najdemo skoraj povsod. Prisotni so v slanih in sladkih vodah, v prsti, v hrani in tudi v pitni vodi. V prebavnem traktu človeka in živali predstavljajo pomemben del normalne gastrointestinalne flore. Ocenjujejo, da je njihovo celokupno število reda velikosti 10^{31} , kar je približno desetkrat več, kot je velikost celokupne bakterijske populacije (Skurnik in sod., 2007; Birge 2006). Bakteriofagi so sestavljeni najmanj iz dveh komponent in sicer nukleinske kisline in iz proteinov sestavljen kapsida. Kapsida ima vlogo varovanja nukleinske kisline pred razgradnjijo z DNAzami, sodeluje pri adsorpciji na specifično bakterijsko celico in sprostitvi fagnega genoma v celico. Fagna nukleinska kislina je lahko enoverižna oz. dvoverižna DNA oz. RNA molekula. Nekateri fagi imajo zelo majhen genom, tako ima fag R17, ki je specifičen za *E. coli*, samo štiri gene, fag PB51 pa kar 240 genov (Brovko in sod., 2012).

2.2.1 Klasifikacija in razmnoževanje bakteriofagov

Mednarodni odbor za klasifikacijo virusov (ICTV), razvršča bakteriofage v red Caudovirales, ki se nato razdeli na tri družine *Myoviridae*, *Podoviridae* in *Siphoviridae*, ki se nato še naprej razvrščajo na poddružine, rodove in vrste (ICTV, 2013). Razvrščanje fagov temelji na njihovi fiziologiji in življenjskem slogu. *Myoviridae* imajo kontraktilne repke, ki so sestavljeni iz plašča in osrednje cevi. Vrat jih ločuje od kapside. *Siphoviridae* imajo dolge ne kontraktilne repke, *Podoviridae* pa kratke. Fagom, ki imajo repke, pravimo, da so binarno simetrični. Poznamo še helikalne, kubične, filamentozne in polimorfne fage (Slika 1) (Ackermann, 2009).

Preglednica 2: Klasifikacija fagov specifičnih za salmonele (ICTV, 2013).

Red	Družina	Poddružina	Rod	Vrsta
Caudovirales	Myoviridae	<i>Peduovirinae</i>	<i>P2likevirus</i>	<i>Salmonella Fels</i>
Caudovirales	Myoviridae	<i>Peduovirinae</i>	<i>P2likevirus</i>	<i>Salmonella SopEphi</i>
Caudovirales	Myoviridae	<i>Felixounalikevirus</i>		<i>Salmonella phage FelixO1</i>
Caudovirales	Myoviridae	<i>Viunalikevirus</i>		<i>Salmonella phage Sfp10</i>
Caudovirales	Myoviridae	<i>Viunalikevirus</i>		<i>Salmonella phage Sh19</i>
Caudovirales	Myoviridae	<i>Viunalikevirus</i>		<i>Salmonella phage ViI</i>
Caudovirales	Podoviridae	<i>Epsilon15likevirus</i>		<i>Salmonella phage epsilon15</i>
Caudovirales	Podoviridae	<i>P22likevirus</i>		<i>Salmonella phage HK620</i>
Caudovirales	Podoviridae	<i>P22likevirus</i>		<i>Salmonella phage ST64T</i>
Caudovirales	Siphoviridae	<i>T5likevirus</i>		<i>Salmonella phage Spc35</i>

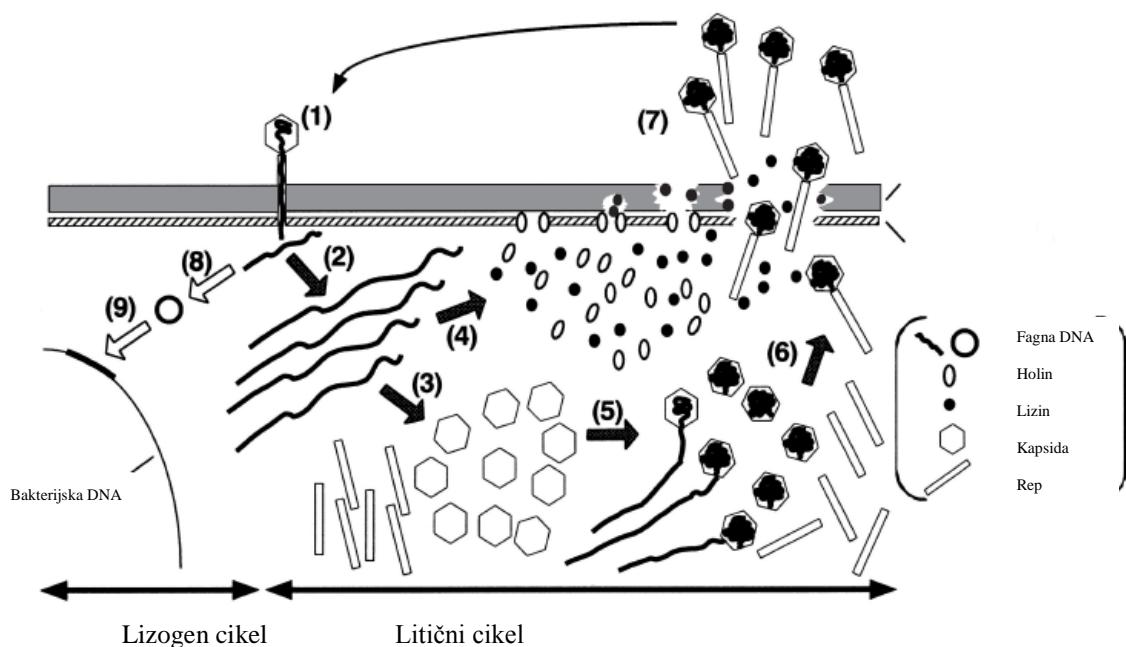


Slika 1: Bakteriofagi iz družin Podoviridae, Siphoviridae in Myoviridae (Carey-Smith in sod., 2006; Mmolawa in sod., 2002).

Slika A prikazuje fage iz družine Podoviridae. Enostranska puščica nakazuje na fagni rep, obojestranska pa na ikozaedrično¹ obliko glave. Slika B prikazuje fage iz družine Siphoviridae, ki imajo fleksibilen rep in izometrično glavo. Na koncu vratu lahko imajo skupek kratkih vlaken. Fagi na sliki C spadajo med Myoviridae, imajo izometrično glavo, rigiden kontraktilen vrat s podaljški v obliki vlaken za iztiskanje dednega materiala.

¹ Ikozaedričen pomeni, da je sestavljen iz 20 ploskev, izmed katerih so vse enakostraničen trikotnik

Prvi korak v fagnem ciklu je pritrjevanje bakteriofaga na bakterijsko celico, kar imenujemo adsorpcija. Fag se s celico poveže preko receptorja, ki je običajno proteinske ali sladkorne narave (Matsuzaki in sod., 2005). Sledi injiciranje fagne DNA v bakterijsko citoplazmo kar povzroči, da virusa ne vidimo več niti z elektronskim mikroskopom. Pojav imenujemo tudi virusni mrk ali eklipsa. Injicirana fagna DNA se po vstopu v celico lahko vgradi v bakterijsko DNA. Tako vezani fagni nukleinski kislini pravimo profag. Pomnožuje se z delitvijo bakterij in čaka na trenutek, ko bo postala zopet aktivna. Ponovno aktivnost virusov povzročijo okoljski dejavniki. Fagi se bodo namnožili in sprostili iz celice. Takšnem ciklu pravimo lizogen cikel (Drinovec, 1996). Pri litičnem ciklu se fagna DNA prične in pakirati v kapside. Sledi povezovanje kapside z repom in novo nastali bakteriofagi se ob pomoči holina in lizina sprostijo iz celice. Holin naredi luknjo v celično membrano in tako omogoči lizinu, petidoglikan hidrolazi, da začne razgrajevati peptidoglikan v celični steni (Slika 2) (Matsuzaki in sod., 2005).

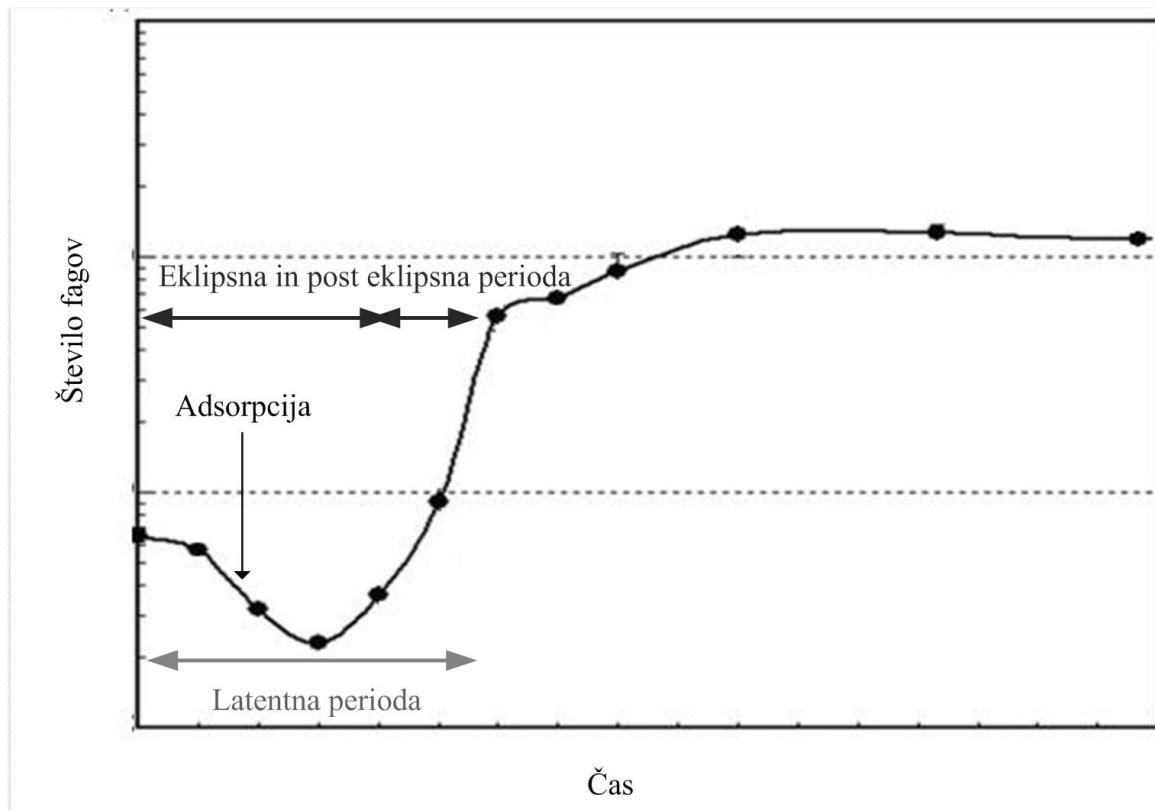


Slika 2: Prikaz lizogenega in litičnega cikla razmnoževanja bakteriofagov (Matsuzaki in sod., 2005).

Na začetku, ob času infekcije, je v suspenziji z bakterijami določeno število bakteriofagov. Rastna krivulja lahko na začetku pada, zaradi adsorpcije fagov na bakterijske celice, kar povzroči manjše število prostih fagov. Leta 1931 je Krueger definiral adsorpcijsko konstanto:

$$k = \frac{2.3}{x_t} \log \frac{P_0}{P} \quad (1)$$

kjer k predstavlja adsorpcijsko konstanto, X koncentracijo biomase, t čas v katerem koncentracija fagov pade iz začetne koncentracije P_0 na končno koncentracijo P (Kropinski, 2009). Čas od adsorpcije faga na celico do sprostitve fagov iz celice imenujemo tudi latentna perioda. Ta zajema eklipso, kjer poteka sinteza fagnih proteinov in nukleinskih kislin, in čas po eklipsi, ko se fagi sestavljajo. Sledi sprostitev fagov iz bakterijske celice. Število novo nastalih fagov na celico se v angleščini imenuje burst size (Slika 3) (Hyman and Abedon, 2009; Birge, 2006).



Slika 3: Rastna krivulja bakteriofagov (Hyman and Abedon, 2009; Jin in sod., 2012).

2.2.2 Uporaba bakteriofagov

Dandanes uporaba bakteriofagov strmo narašča, saj lahko z njihovo pomočjo preprečimo in ozdravimo okužbe z bakterijami.

Bakteriofagna terapija je terapija, pri kateri uporabljamo fage ali njihove sestavne dele za zdravljenje bakterijskih okužb. Predstavlja alternativo antibiotikom in kaže potenciale zdravljenja smrtnih boleznih, ki jih povzročajo po gramu negativne bakterije. Začetki fagne terapije segajo v dvajseta leta 19. stoletja. Takrat je fagna terapija predstavljala možnost zdravljenja bakterijskih okužb in se je tudi uporabljala v Vzhodni Evropi. Z odkritjem penicilina, katerem je sledila doba antibiotikov, se je bakteriofagno zdravljenje opustilo (Housby in Mann, 2009). Zdravljenje s fagi se je nadaljevalo v Vzhodni Evropi tudi po odkritju antibiotikov. Vojska sovjetske zveze naj bi bila eden izmed največjih

potrošnikov, saj so bili fagni pripravki relativno poceni v primerjavi z dragimi antibiotiki (Stone, 2002). Bakteriofagna terapija se je uporabljala vse do 90ih let prejšnjega stoletja (Sulakvelidze in sod., 2001). Dandanes z večanjem odpornosti bakterij na antibiotike in počasnim razvojem novih antibiotikov, fagna terapija znova pridobiva na pomenu (Housby in Mann, 2009; Lu in Koeris, 2011). Prednost uporabe bakteriofagov je tudi v njihovi specifičnosti za določeno vrsto bakterije, saj ne morejo okužiti evkariontskih celic in ostalih mikroorganizmov v okolini. Tako lahko na primer uničijo patogeno bakterijo v črevesju, ne da bi pri tem vplivali na črevesno floro. Razvoj bakteriofagnega sistema, ki bi ga uporabljali za zdravljenje na antibiotike odporne bakterije, je hitrejši in cenejši v primerjavi z razvojem konvencionalnih zdravil. Ob pojavi rezistentnih mutant, ki bi postale odporne, lahko tudi fag mutira. Fagne lizine bi lahko uporabljali kot terapevtska sredstva za zatiranje bakterijskih okužb (Matsuzaki in sod., 2005), vendar se pojavi problem alergijskih reakcij, saj Cheng in sod., (2005) poročajo o pojavi protiteles proti bakteriofagnim lizinom v krvi miši. Problem je rešljiv z razvojem lizina, ki ima zmanjšano imunogenost. Poleg imunogenosti lizina je potrebno še omeniti prenos genov za bakterijske toksine in rezistenco na antibiotike. Pri sestavljanju novih bakteriofagov v bakterijski celic, se lahko v kapsido zapakirajo tudi bakterijski geni (Matsuzaki in sod., 2005). Vsekakor se zanimanje za bakteriofagno terapijo povečuje in tako se že opravlja klinične študije, v katerih testirajo pripravke fagnih lizatov predvsem proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *E.coli* (Lu in Koeris, 2011). Za uporabo fagnih lizatov v kliničnih študijah potrebujemo pripravke, ki so stabilni, sterilni, ne vsebujejo endotoksinov, imajo nizko stopnjo pirogenosti² in so specifični za vezavo s tarčno bakterijo. Bakteriofagni koktail, ki je dosegal navedene lastnosti in je vseboval fage proti *P. aeruginosa* ter *S. aureus*, so v klinični študiji uporabili za preprečitev okužb pri opeklkah. Ni bilo opaženih nezaželenih stranskih učinkov (Merabishvili in sod., 2009). Endotoksični predstavlja problem tudi pri zdravljenju okužb. Čeprav bi za zdravljenje uporabili fagni pripravek, ki ne vsebuje endotoksinov, se ti lahko sprostijo pri lizi celic v telesu. Tako raziskave potekajo v smeri razvoja fagov, ki uničijo bakterijsko celico, vendar je ne lizirajo (Hagens in Blasi, 2003).

Bakteriofagna terapija je primerna tudi za živali. Narejeno je bilo že veliko raziskav, ki potrjujejo uspešno zaviranje bakterijskih okužb s *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Vibrio vulnificus* (Housby in Mann, 2009).

Razvoj bakteriofagnih zdravil se sooča z dolgo dobo razvoja produkta in odobritvenimi postopki. Posledično se je razvoj produktov na osnovi fagov usmeril v prehrambno industrijo, kmetijstvo in diagnostiko v medicini. Razvili so kar nekaj produktov, ki so bili odobreni s strani Environmental Protection Agency (EPA), United States Department of Agriculture (USDA) in Food and Drug Administration (FDA) (Lu in Koeris, 2011; Monk

² Pirogenost je sposobnost snovi, da povzroči dvig telesne temperature

in sod., 20010). Dandanes je, kljub kontroli, nadzoru hrane in ozaveščanju ljudi, še vedno velik problem zastrupitev s hrano. Človek se s salmonelo okuži večinoma z zaužijem perutnine. Za preprečitev razvoja salmonele na perutnini se uporablajo razpršila iz različnih raztopin soli in protibakterijskih sredstev, kot je na primer trinatrijev fosfat³. Uporablja se tudi mehanska obdelava živil, kot je na primer UV svetloba. Litični bakteriofagi predstavljajo alternativo klasičnim postopkom zatiranja salmonele na živilih, ki lahko poslabšajo organoleptične lastnosti. Razpršitev fagov po površini perutnine kaže na učinkovito znižanje števila patogenih bakterij. Z večanjem števila virusnih delcev (MOI $> 10^5$) je mogoče popolnoma odstraniti okužbo (Goode in sod., 2003). Bakteriofagi specifični za *S.enteritidis* preprečijo rast in zmanjšajo število živih bakterijskih celic tudi na svežem sadju (Leverentz in sod., 2001). Tako se lahko bakteriofagi uporabljo kot sterilizacijska sredstva v proizvodnji hrane. Nizozemsko podjetje Mircos Food Safety, se ukvarja z razvojem naravnih fagnih produktov proti nevarnim bakterijam, ki povzročajo probleme v prehrambeni industriji. LISTEXTM je njihov produkt, ki vsebuje bakteriofage proti *Listeria monocitogenes*. Uporablja se za preprečevanje rasti *L. monocitogenes* v proizvodnji mesa, sira, rib, sadja in zelenjave. LISTEXTM je bil prvi bakteriofagni produkt, ki je bil priznan kot varen s strani FDA in USDA, ter ima oznako GRAS (generally recognized as safe). Produkt je v uporabi že od leta 2006 in se v Evropi lahko uporablja tudi v pridelavi eko hrane. Nima vpliva na organoleptične lastnosti živil. V obdobju testiranj je produkt SALMONELEXTM, ki vsebuje fage proti salmonelam (LISTEX, 2012; Housby in Mann, 2009; Monk in sod., 2010). V ZDA je od leta 2005 poljedelcem na voljo pesticid za preprečevanje in zatiranje bakterijskih bolezni paradižnika in paprike (Bratkovič in Preželj, 2008). Bakteriofage bi lahko uporabljali tudi pri procesih čiščenja odpadnih vod (Withey in sod., 2005).

Bakteriofage ne uporabljamamo samo za ubijanje bakterij, ampak tudi za njihovo detekcijo (Lu in Koeris, 2011). Okužba s salmonelo je med najpogostejšimi okužbami s patogeni, ki se prenašajo s hrano in povzročajo izbruh bolezni. Za preprečitev okužb je potrebno z živili v proizvodnji, distribuciji in predelavi, ravnati v skladu s predpisi. Testi za preverjanje okužb s salmonelo morajo biti hitri, občutljivi in zanesljivi. Tipične infekcijske doze so v rangu med 10^6 - 10^8 CFU, vendar je lahko za infekcijo dovolj že nekaj patogenih celic. Tako se lahko okužimo že, če zaužijemo manj kot 10 celic *S. typhimurium* in nekje med 25 in 50 celic *S. enteritidis* (Cox, 1999). Za hitro in zanesljivo detekcijo salmonel, lahko uporabljamamo bakteriofage. Z imunomagnetno separacijo (IMS) lahko v 20. urah detektiramo že 3 CFU na 25 g živila. Najprej se protitelesa, ki so specifična za salmonele in označena z magnetnimi delci, izolira in skoncentrira bakterijske celice iz živila ter doda bakteriofage specifične za salmonele. S postopkom spiranja se odstrani nevezane fage. Sledi pomnoževanje in za tem dodatek signalnih celic. Če je bilo živilo okuženo, se fagi v postopku spiranja niso sprali, saj so bili vezani na kompleks protitelo – bakterija, in so se

³ Trinatrijev fosfat je čistilno sredstvo, mazivo, aditiv za živila, odstranjevalec madežev in razmaščevalec. Je bela snov topna v vodi, ki tvori alkalno raztopino.

lahko namnožili ter lizirali signalne celice. Padec absorbance v končnem vzorcu kaže na pozitiven rezultat (Favrin in sod., 2003). FDA je leta 2011 odobrila uporabo fagov za detekcijo proti meticilinu odpornih *Staphylococcus aureus* (MRSA) v krvi (McCoy, 2011).

Bakteriofage lahko uporabljamo kot dostavne sisteme za proteine, DNA cepiva in za gensko zdravljenje. Fag (običajno M13 fag *E.coli*) lahko nosi antigen cepiva na površini, t.i. fagni prikaz, ali pa vsebuje DNA zapis za cepivo, ki je vstavljen v genom faga (Cegnar in sod., 2007).

2.2.3 Proizvodnja bakteriofagov

Bioprocес proizvodnje fagov poteka v bioreaktorjih. Poznamo šaržni proces (oz. bioprocес z enkratnim polnjenjem), šaržni proces z napajanjem in kontinuirni bioprocес. Bioprocес je v stacionarnem stanju, ko se parametri, kot so koncentracija biomase, substrata, temperatura, volumen, ne spreminja po času. Če se parametri spreminja po času je proces v nestacionarnem stanju (Pavko, 1996).

Šaržni proces je proces pri katerem v bioreaktor na začetku dodamo reaktante in na koncu odvzamemo iz njega produkte. Je klasičen primer nestacionarnega procesa, saj se tekom procesa zmanjšuje koncentracija substrata in povečuje koncentracija produkta. Volumen bioprocесne brozge se tekom procesa ne spreminja. Produktivnost šaržnega bioprocесa je zaradi postopkov čiščenja, sterilizacije, polnjenja in praznjenja, slabša v primerjavi s kontinuirnim bioprocесom. Zaradi krajšega časa obratovanja je v šaržnem procesu manjša možnost kontaminacije in pojava mutacij (Pavko, 1996). Med vodenjem šaržnega procesa lahko spremiamo nastanjanje biomase z merjenjem optične gostote in z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Sprememba hitrosti nastajanja biomase po času je enaka produktu specifične hitrosti rasti in biomasi (Monod, 1949):

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \dots(2)$$

iz tega sledi, da je specifična hitrost rasti enaka (Paš in Raspor 2010):

$$\mu = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{t} \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad \dots(3)$$

Generacijski čas bakterijske kulture izračunamo po enačbi:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \text{ (h)} \quad \dots(4)$$

Kontinuirni proces ali proces z neprestanim polnjenjem imenujemo tudi CSTR (ang. *Continuous stirred-tank reactor*). Proses se navadno začne kot šaržni proces in ob dosegu želene koncentracije biomase, se prične kontinuirno obratovanje. Po določenem času, ki je

odvisen od zadrževalnega časa, dosežemo stacionarno stanje, v katerem se nobena lastnost sistema s časom ne spreminja, torej ni spremembe mase v sistemu (Villadsen in sod., 2011).

$$\frac{dm}{dt} = 0 \quad \dots(5)$$

Masna bilanca za biomaso za kontinuirni sistem:

$$\frac{d(VX)}{dt} = F_V \times S_v - F_{iz} \times S_{iz} + r_x \times V \quad \dots(6)$$

Če predpostavimo za kontinuirne procese, da je $F_v=F_{iz}=F$, F je konstanta in da je V konstanten lahko enačbo preuredimo:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V} X_{iz} - X_v + r_x \quad \dots(7)$$

Stacionarno stanje se lahko doseže na več načinov. V pH akustostatu nastavimo vrednost pH parametra. Nato se glede na nastavljenou vrednost spreminja vtok in iztok, tako da hitrost razredčevanja (D) ni konstanta. Eden izmed možnih kontinuirnih sistemov je tudi turbidostat, v katerem je koncentracija biomase konstantna. V turbidostatu ohranjamo konstanten volumen v bioreaktorju, tako da je pretok na vtoku in iztoku enak, ni pa konstanten. Tako se spreminja hitrost razredčevanja glede na nastavljenou koncentracijo biomase. Kemostat je sistem s stalnim dotokom, kjer sta vstopni tok in izstopni tok enaka. V turbidostatu se hitrost razredčevanja spreminja v odvisnosti od prosojnosti bioprocесне brozge. Turbidostat vzdržuje konstantno motnost v sistemu. Hitrost nadomeščanja porabljenega substrata s svežim je enaka specifični hitrosti rasti (Formula 12). Kemostat je limitiran z eno od substratnih komponent. Običajno je to vir C, lahko pa so limitni tudi drugi nutrienti. Limitacija je dosežena, ko koncentracija limitnega substrata v vtoku ne presega maksimalno stopnjo porabo substrata. Če ni določene limitacije s substratom, se bo rast nadaljevala z maksimalno specifično hitrostjo rasti (μ_{max}), dokler ne bo limitacije z eno od substratnih komponent. Torej po dosegu stacionarnega stanja v kemostatu je sprememba biomase po času enaka nič (Enfors, 2003).

$$\frac{dX}{dt} = 0 \text{ in } \frac{ds}{dt} = 0 \quad \dots(8)$$

Če to enačbo upoštevamo pri enačbi (7) dobimo:

$$\frac{F}{V} \times (-X) = -r_x \quad \dots(9)$$

Če upoštevamo, da je pretok ulomljeno z volumnom enak razredčevalni hitrosti D

$$\frac{F}{V} = D \quad \dots(10)$$

in da je hitrost nastajanja produkta r_x enaka produktu specifične hitrosti rasi in biomase,

$$r_x = \mu \times X \quad \dots(11)$$

lahko iz enačbe izpeljemo, da je specifična hitrost rasti v kemostatu enaka razredčevalni hitrosti.

$$\mu = D \quad \dots(12)$$

Enačbo (12) vstavimo v Monod-jev izraz, ki opisuje odvisnost specifične hitrosti rasti mikroorganizmov od koncentracije limitnega substrata

$$\mu = \frac{\mu_{max} \times S}{K_s + S} \quad \dots(13)$$

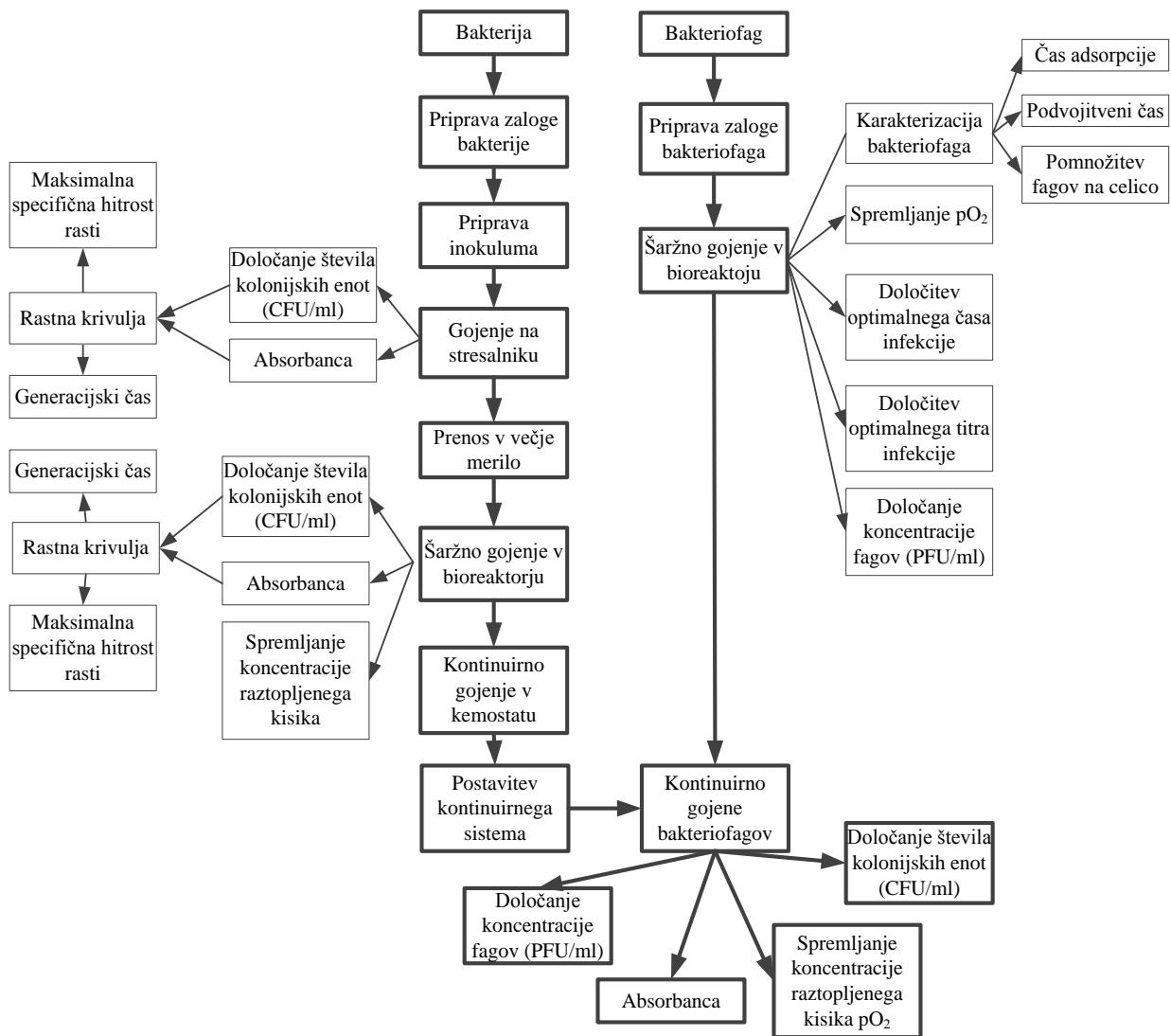
in dobimo

$$S = \frac{K_s \times D}{\mu_{max} - D} \quad \dots(14)$$

Kjer je μ konstanta hitrosti rasti, μ_{max} konstanta hitrosti rasti pri nasičenosti s substratom, S koncentracija substrata v gojišču in K_s konstanta nasičenosti s substratom, ki je enaka koncentraciji S kjer je $\mu=1/2\mu_{max}$. Kemostat mora biti voden pri razredčevalni hitrosti, ki je nekoliko nižja od maksimalne specifične hitrosti rasti mikroorganizma. Če presežemo kritično razredčevalno hitrost, pride do izpiranja biomase iz sistema (Haefner, 1996; Wittrup, 2007; Villadsen in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

Shema na sliki 4 prikazuje potek eksperimentalnega dela.



Slika 4: Potek eksperimentalnega dela.

3.1 MATERIALI

V tem podoglavlju so opredeljeni bakterijski sev, bakteriofag, aparature in oprema, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu.

3.1.1 Bakterijski sev

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabljali sev bakterije rodu *Salmonella* iz zbirke podjetja JAFRAL d.o.o.

3.1.2 Bakteriofag

Uporabili smo litični bakteriofag SF28 specifičen za bakterije rodu *Salmonella* iz zbirke podjetja JAFRAL d.o.o.

3.1.3 Aparature in oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje aparature in opremo:

- tehnicka (Kern);
- stresalnik (Benchmark);
- brezprašna komora (Iskra PIO);
- gorilnik (Avogadros);
- inkubator (Kambič);
- avtoklav (Anjue Medical);
- spektrofotometer (Tsingtao);
- vrtinčnik (Scilogex);
- centrifuga (Huan Suncheng);
- vodna kopel (Kambič);
- hladilnik (Gorenje);
- zamrzovalnik (Gorenje);
- laboratorijski bioreaktor domače izdelave sestavljen iz 2 l steklenice (Duran), mešala, mesta za inokulacijo in mesta za vzorčenje (Jafral d.o.o);
- večkanalni merilnik pH in kisika s programsko opremo MSHAKER (model: Monitshaker);
- plinska jeklenka plina N₂ (Istrabenz);
- PVC cev.

Pri izvedbi poizkusov smo uporabljali tudi klasične laboratorijske pripomočke, kot so:

- erlenmajerice (100 ml);
- petrijeve plošče (Golias);
- rokavice (Kimtech);
- pipete (Brand, Transferpette);
- nastavki za pipete (Ratiolab);
- centrifugirke (1,5 ml; 2 ml; 15 ml; 50 ml;) (Isolab);
- steklenice (1 L; 5 L) (Duran).

3.2 METODE

V sledečih podpoglavljih predstavljamo metode, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu.

3.2.1 Priprava tekočega, mehkega in trdega gojišča

Za gojenje bakterije in bakteriofagov smo uporabljali tekoče gojišče Luira Bertani (LB) in sicer 1 X LB gojišče. Za kvantifikacijo bakterije in bakteriofagov smo uporabili mehko in trdo gojišče, ki je v osnovi LB gojišče z dodatkom agarja (Dunkley in sod. 2009; Mmolawa in sod., 2002).

Tekoče gojišče smo pripravili iz triptona, kvasnega ekstrakta, NaCl in destilirane vode. Pripravljeno gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 1,2 kPa in 121 °C in do uporabe hranili na 4 °C (Dunkley in sod. 2009; Mmolawa in sod., 2002).

Preglednica 3: Sestava 1 X LB tekočega gojišča.

Sestavina	Količina
tripton	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	10 g
destilirana H ₂ O	do 1000 ml

Mehko gojišče smo pripravili iz triptona, kvasnega ekstrakta, NaCl in destilirane vode. Pripravljeno gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 1,2 kPa in 121 °C. Gojišče, ohlajeno na 50 °C, smo razlili na petrijeve plošče (70 mm) in shranili na 4 °C do uporabe agarja (Panec in Katz, 2006).

Preglednica 4: Sestava mehkega gojišča.

Sestavina	Količina
tripton	5 g
kvasni ekstrakt	2,5 g
NaCl	5 g
agar	3,5 g
destilirana H ₂ O	do 500 ml

Trdo gojišče smo pripravili iz triptona, kvasnega ekstrakta, NaCl in destilirane vode. Pripravljeno gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 1,2 kPa in 121 °C in do uporabe hranili na 4 °C (Sanders, 2011).

Preglednica 5: Sestava trdega gojišča.

Sestavina	Količina
tripton	5 g
kvasni ekstrakt	2,5 g
NaCl	5 g
agar	7,5 g
destilirana H ₂ O	do 500 ml

3.2.2 Priprava banke bakterijske kulture, vcepka in preverjanje čistosti kulture

Bakterijsko kulturo, ki je bila shranjena v 20 % glicerolu, smo s cepilno zanko razmazali do posamezne kolonije na plošče s trdim agarjem. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37 °C. Po inkubaciji smo s cepilno zanko prenesli eno kolonijo s plošče v 50 ml LB gojišče in gojili na stresalniku čez noč na 200 obr/min pri 37 °C. Po inkubaciji smo preverili čistost kulture. Bakterijsko kulturo smo alikovtirali v sterilne 2 ml mikrocentrifugirke in do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C (Fortirer in Moineau, 2009).

Čistost bakterijske kulture smo preverjali tako, da smo en mililiter kulture dodali k sedmim mililitrom mehkega agarja, pretresli na vrtinčniku in ulili na ploščo s trdim agarjem. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37 °C.

Vcepek smo pripravili v sterilnih 300 ml erlenmajericah. K 150 ml 1 X LB gojišča smo dodali 2 ml pripravljene bakterijske kulture. Gojili smo čez noč na stresalniku na 200 obr/min pri 37 °C. Naslednji dan smo preverili čistost kulture in zmerili optično gostoto (OD).

3.2.3 Merjenje absorbance

Absorbanco smo merili s spektrofotometrom pri absorbanci 600nm, pri čemer smo na vrednost nič umerili z gojiščem. Spektrofotometer ima linearen odziv v območju med 0,1 in 1. Pri absorbanci bioprocесne brozge višje od 1 smo vzorec redčili z gojiščem, tako da smo ostali v linearinem območju in nato dobljeno vrednost pomnožili s faktorjem redčitve.

3.2.4 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču

Tako po vsakem vzorčenju smo število bakterij določili z testom štetja kolonij na trdem gojišču. Najprej je bilo potrebno pripraviti primerne razredčitve vzorca in sicer nekje med 10^{-3} do 10^{-7} . V tem razponu so bile kolonije dobro vidne in števne. Nato smo na ploščo s trdim agarjem nanašali 10 µl kapljice v treh ponovitvah. Sledila je inkubacija čez noč v inkubatorju pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli kolonije, ki so zrastle. Ena kolonija predstavlja eno bakterijsko celico. Izračunali smo dejansko število bakterij v prvotnem vzorcu (ISO 4883, 1991).

$$\frac{\text{št.bakterij}}{\text{ml}} = \text{št.kolonij} \times 100 \times \text{rečitev} \quad \dots(15)$$

3.2.5 Gojenje bakterijske kulture v šaržnem in kontinuirnem procesu

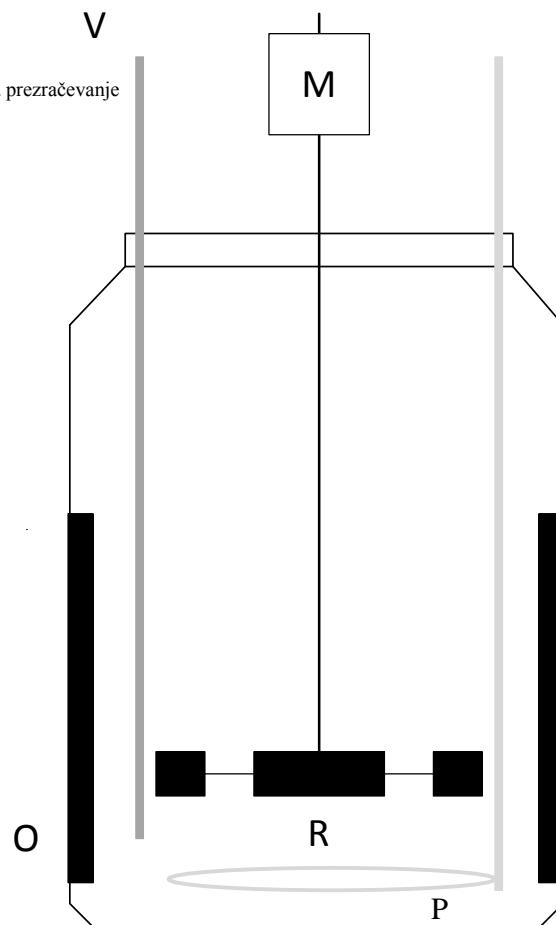
Bakterije smo najprej gojili na stresalniku v erlenmajerih in nato v bioreaktorju. V 150 ml erlenmajerice smo dodali 50 ml 1 X LB gojišča in 5 % vcepek. Pogoji gojenja na stresalniku so bili: 200 obr/min, 37 °C. Hitrosti rasti smo spremljali z merjenjem absorbance pri 600 nm. Z metodo štetja kolonij na trdem gojišču, smo določili dejansko število celic pri določeni absorbanci.

Za gojenje v šaržnem procesu, smo uporabljali steklene bioreaktorske posode z volumenom 2000 ml, ki ima na vrhu priključke za motor, vpihanje zraka in vzorčenje. Za mešalo smo uporabljali Rushtonovo turbino. Bioreaktor je vseboval tudi pregrade za ustvarjanje turbulence v tekoči fazi. Zrak se je vpihal skozi perforiran prstan pod mešalom (Slika 5). Za doseganje želene temperature bioprocесne brozge smo uporabljali vodno kopel, v katero smo postavili bioreaktorski sistem. Celoten bioreaktorski sistem se je pred uporabo steriliziral v avtoklavu. Procesni parametri in pogoji gojenja so predstavljeni v preglednici 6.

Preglednica 6: Procesni parametri in pogoji gojenja v šaržnem procesu

Procesni parametri in pogoji gojenja	Količina
Volumen bioreaktorja	2000 ml
Delovni volumen	350 ml
Temperatura	37 °C
Prezračevanje	1 L/min
Mešanje	400 obr/min
Gojišče	1 X LB
Vcepek	5 % (15 ml)
Protipenilec	5 µl

LEGENDA:
M – motor
O – odbijači
P – perforiran prstan za prezračevanje
R – rushtonova turbina
V – vzorčno mesto



Slika 5: Bioreaktorski sistem, ki smo ga uporabljali za gojenje bakterije in bakteriofagov v šaržnem in kontinuirnem procesu.

Kemostat je način vodenja kontinuirnega procesa. Za vodenje kemostata smo uporabljali enako bioreaktorsko posodo kot v šaržnem procesu (Slika 5). Posodi smo dodali vstopno in izstopno cev premera 1cm, ki je bila namenjena vtoku gojišča in izzoku bioprocесne brozge. Cevi so bile vpete v peristaltične črpalke, ki so omogočale pretok. Proses smo vedno začeli kot šaržen, s 350 ml gojišča h kateremu smo dodali 5 % vcepek bakterijske

kulture. Pri določeni vrednosti absorbance smo začeli voditi kemostat, tako da smo vključili črpalke. Pretok je bil nastavljen na 5 ml/min, kar pomeni da smo kemostat vodili pri D nekje med $0,85 \text{ h}^{-1}$. Limitni faktor pri vodenju kemostata je bil kisik.

$$F = D_{opt} \times V \quad \dots(16)$$

F (ml/min) je pretok in predstavlja hitrost vtoka ter iztoka iz bioreaktorske posode.

V (ml) je volumen bioprosesne brozge.

$$P = X * D \text{ (celic/ml/min)} \quad \dots(17)$$

P (št. celic/ml/min) je optimalna produktivnost

Teoretični zadrževalni čas (τ) v bioreaktorski posodi je:

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V}{F} \quad \dots(18)$$

Pomembno je, da pri vodenju kemostata ne presežemo kritične razredčevalne hitrosti (D_{kr}), ker vodi v izpiranje biomase iz sistema (Wittrup, 2007; Villadsen in sod., 2011).

3.2.6 Priprava vcepka bakteriofagov

Pripravili smo 50 ml 1X LB gojišča v treh paralelkah in dodali 5 % vcepek bakterije. Gojili smo na stresalniku na 200 obr/min pri 37°C . Spremljali smo absorbanco in ko je dosegla vrednost 0,1 smo dodali različne količine bakteriofagov in sicer 100 μl , 500 μl in 1000 μl . Gojenje je potekalo do ustalitve absorbance. Nato smo naredili plak test in tako določili število bakteriofagov na ml (PFU/ml). Paralelko z najvišjim titrom fagov smo sterilno filtrirali skozi 0,22 filter in alikvotirali v 2 ml mikrocentrifugirke ter shranili pri 4°C (Fortirer in Moineau, 2009).

3.2.7 Metoda plakov

Metoda plakov je test, s katerim lahko določimo število bakteriofagov v suspenziji ob predpostavki, da je en bakteriofag okužil eno bakterijsko celico. Najprej je potrebno nareediti ustrezone razredčitve suspenzije fagov. Nato dodamo 50 μl razredčine v mehek agar in dodamo 50 μl bakterijske kulture. Premešamo in zlijemo na ploščo s trdim agarjem. Inkubiramo čez noč pri 37°C . Naslednji dan se pojavijo t.i. plaki. To so svetlejša mesta, kjer so fagi lizirali bakterijsko celico. Iz števila plakov, ki nam dejansko pove, koliko fagov je inficiralo bakterijske celice, lahko nato izračunamo število fagov v prvotni suspenziji (Dulbecco R. 1952; Panec in Katz, 2006).

$$\frac{\text{št.fagov}}{\text{ml}} = \text{št. plakov} \times \text{rečitev} \times 20 \quad \dots(19)$$

3.2.8 Gojenje bakteriofaga v šaržnem procesu

Gojenje bakteriofaga smo začeli z gojenjem bakterije v šaržnem procesu, pri katerem smo ohranili pogoje gojenja, ki so navedeni v preglednici 6. Ko je absorbanca dosegla želeno vrednost, smo dodali določeno količino bakteriofagov. Poskus smo spremljali tako dolgo, dokler se ni absorbanca ustalila. Vzorčili smo na 15 min in s plak testom določili koncentracijo fagov ob določenem času.

3.2.9 Izračun števila pomnoženih fagov v eni celici

Za izračun potrebujemo podatek o število inficiranih celicah, ki je odvisen od koncentracije fagov ob infekciji (Hyman in Abedon, 2009). MOI definira število fagov na eno bakterijsko celico in ga preprosto izračunamo, kot:

$$MOI = \frac{\text{št. fagov}}{\text{št. celic}} \quad \dots(20)$$

Dejansko število inficiranih celic pri določenem MOI je funkcija statistike. Delež celic, ki bodo inficirane z določenim številom fagov, izračunamo s pomočjo Poissonove porazdelitve. Na splošno Poissonova porazdelitev poda verjetnost ($P(n)$), da se bo določeno število dogodkov (n), ki se pojavljajo z znano pogostnostjo (m), zgodilo v določenem časovnem obdobju, lahko tudi v volumnu, površini ali razdalji (Enačba 21). Tako lahko na osnovi iste enačbe izračunamo verjetnost okužbe celic z n številom fagov pri različnih MOI vrednostih (Clarson K, 2005; Hyman in Abedon, 2009; Košmelj, 2007).

$$P(n) = \frac{m^n \times e^{-m}}{n!} \quad \dots(21)$$

$P(n)$ je verjetnost okužbe ene bakterijske celice z n fagov,
 m je MOI,
 n je število fagov, ki inficirajo bakterijo.

V pregl. 7 smo prikazali deleže inficiranih in neinficiranih bakterij pri različnih MOI vrednostih. Pri MOI vrednostih nižjih od 1, se na velik delež bakterij ne bo adsorbiral noben fag. Pri MOI vrednosti 1, kjer je koncentracija fagov enaka koncentraciji bakterij in bi se lahko teoretično 1 fag adsorbiral na eno bakterijsko celico je kar 36,76 % celic neinficiranih. Z višjimi MOI vrednostnimi lahko dosežemo infekcijo skoraj vseh bakterijskih celic v gojišču, vendar bomo s tem tudi povečali delež bakterij, na katerih bo adsorbiran več kot en fag. Pri MOI 6 bomo inficirali 99,75 % bakterijskih celic vendar bo na 16,1 % bakterij vezanih 6 fagov.

Preglednica 7: Odstotek neinficiranih celic in enkrat ali večkrat inficiranih celic pri različnih MOI vrednostih.

MOI	Neinficirane celice (%)	Inficirane celice (%)								Celice inficirane 1x ali večkrat (%)
		1x	2x	3x	4x	5x	6x	7x	8x	
0,001	99,9	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
0,100	90,5	9,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,5
1	36,8	36,8	18,4	6,1	1,5	0,3	0,1	0,0	0,0	63,2
2	13,5	27,1	27,1	18,0	9,0	3,6	1,2	0,3	0,1	86,5
3	5,0	14,9	22,4	22,4	16,8	10,1	5,0	2,2	0,8	95,0
4	1,8	7,3	14,7	19,5	19,5	15,6	10,4	6,0	3,0	98,2
5	0,7	3,4	8,4	14,0	17,5	17,5	14,6	10,4	6,5	99,3
6	0,2	1,5	4,5	8,9	13,4	16,1	16,1	13,8	10,3	99,8
7	0,1	0,6	2,2	5,2	9,1	12,8	14,9	14,9	13,0	99,9
8	0,0	0,3	1,1	2,9	5,7	9,2	12,2	14,0	14,0	100,0

Z večanjem MOI vrednosti povzročimo, več fagov adsorbirajo na eno bakterijsko celico, vendar je vsi ne inficirajo, kar pomeni, da niso vsi fagi izkoriščeni za namnožitev novih fagov. Pri sami proizvodnji želimo imeti visoke izkoristke, zato poskušamo preprečiti, da bi fagi ostali neizkoriščeni. Na primer, da lahko ena bakterijska celica naredi 100 novih fagov. Če se nanjo vežejo širje fagi to pomeni, da so se porabili širje fagi za namnožitev 100 novih fagov oz. da je na en fag nastalo 25 novih fagov. Ker vsi fagi niso bili izkoriščeni je število novo nastalih fagov širikrat manjše. Podatke o večkrat inficiranih celicah iz preg. 7 uporabimo za izračun povprečnega števila pomnoženih fagov na eno celico, ki bo nižji od dejanskega, ker se je na eno bakterijsko celico vezalo več fagov. Na primer pri MOI 5 bo povprečno število pomnoženih fagov na celico 24, kar pomeni da so se povprečno širje fagi vezali na eno bakterijsko celico in se je na en fag naredilo približno 24 novih fagov (Pegl. 8).

Preglednica 8: Povprečno število nastalih fagov na celico, pri različnih MOI vrednostih, ki upošteva, da so bile celice inficirane enkrat ali večkrat.

MOI	Povprečno število nastalih fagov na celico
1	48
2	50
3	41
4	32
5	24
6	19
7	14
8	10

3.2.10 Določitve konstante adsorpcije

Za določitev konstante adsorpcije, je bilo potrebno vzorec takoj po vzorčenju centrifugirati, s čimer smo dosegli, da so se fagi vezani na bakterijske celice zbrali v pleetu, v supernatantu pa so ostali ne vezani fagi. Supernatant smo nato analizirali s plak testom. Tako smo ugotovili, koliko je prostih fagov v bioprosesni brozgi ob infekciji in ob določenih časih po infekciji. Iz pridobljenih rezultatov smo nato po enačbi 1 izračunali konstanto adsorpcije (Wong in sod., 2014).

3.2.11 Merjenje parcialnega tlaka raztopljenega kisika

S pomočjo kisikove elektrode smo merili parcialni tlak kisika tekom bioprosesa. Kisikova elektroda je bila nameščena v bioreaktor in povezana z računalnikom, kjer smo s pomočjo programa MSHAKER lahko in-line spremljali parcialni tlak kisika.

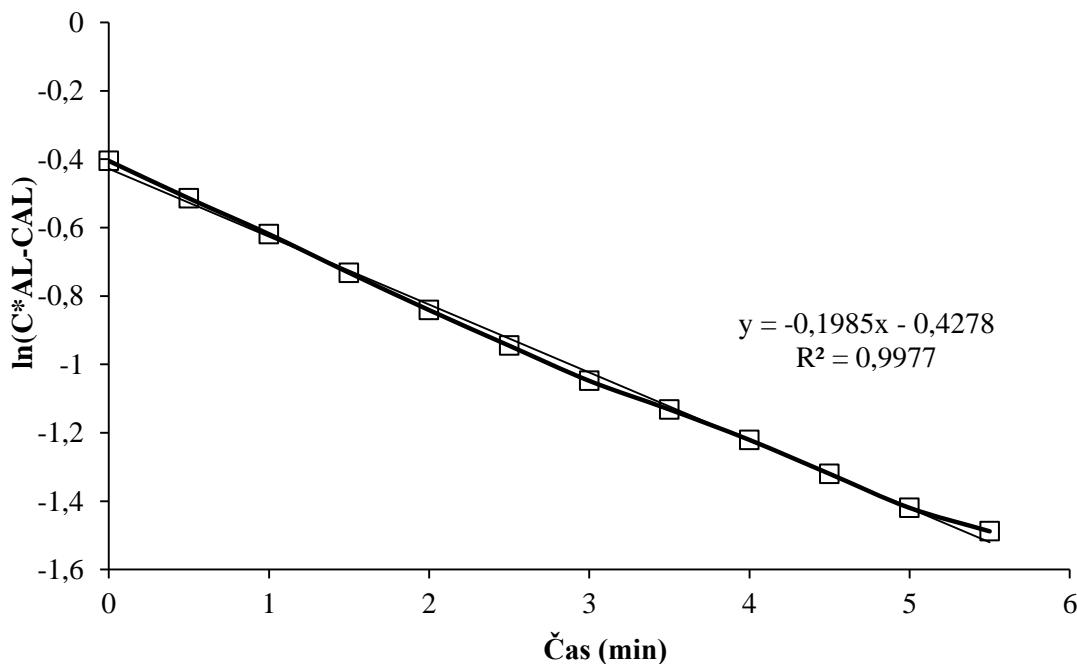
Kalibracijo pO_2 elektrode smo izvedli s pomočjo 100 % N_2 in prezračevanja s zrakom. Najprej smo gojišče s temperaturo 37 °C prepigli z dušikom, tako da smo izpodrinili ves kisik. Ko se je vrednost ustalila smo elektrodo kalibrirali na vrednost 0 %. Nato smo gojišče prepighovali s zrakom (21 % O_2) in po ustalitvi smo elektrodo kalibrirali na vrednost 100 %.

Vrednost $k_L a$ lahko določimo s pomočjo razplinjevalne metode, pri kateri parcialni tlak v tekočini znižamo s prepighovanjem tekočine z dušikom in tako izpodrinemo kisik. Tekočino nato prepighujemo z zrakom in merimo spremjanje parcialnega tlaka (Wise, 1951).

Najprej smo gojišče prepighovali z dušikom, da se je vrednost kisika ustalila pri 0 %, nato smo pri različnih hitrostih mešanja in intenziteti zračenja prepighovali še z zrakom, do ustalitve vrednosti. Želeli smo določiti $k_L a$ vrednost pri pogojih, ki smo jih uporabljali v poskusih. Pri gojenju bakterije in bakteriofagov v šaržnem procesu ter kontinuirnem gojenju v drugi posodi, smo gojišče mešali s 400 obr./min in prepighovali z 1 L/min. Za doseganje limitacije s kisikom v posodi 1 ni bilo prezračevanja, mešanje pa je bilo nastavljeno na 60 obr./min. Dobljene vrednosti smo vstavili v enačbo (20).

$$\ln C_{AL}^* - C_{AL} = -k_L a t \quad \dots(22)$$

C_{AL}^* je ravnotežna koncentracija kisika v tekoči fazi na fazni meji zrak-tekočina (topnost kisika v tekočini), C_{AL} je povprečna koncentracija kisika v tekočini (mol m^{-3}) (Raspor in Smole-Možina, 1993). Razlika med maksimalno možno in dejansko koncentracijo kisika v tekočini ($C_{AL}^* - C_{AL}$) je gonilna sila za prenos kisika (Paš in Raspor, 2010; Doran, 1995). Za C_{AL}^* smo privzeli vrednost 100. Vrednost $k_L a$ smo določili iz naklona premice (Slika 6).

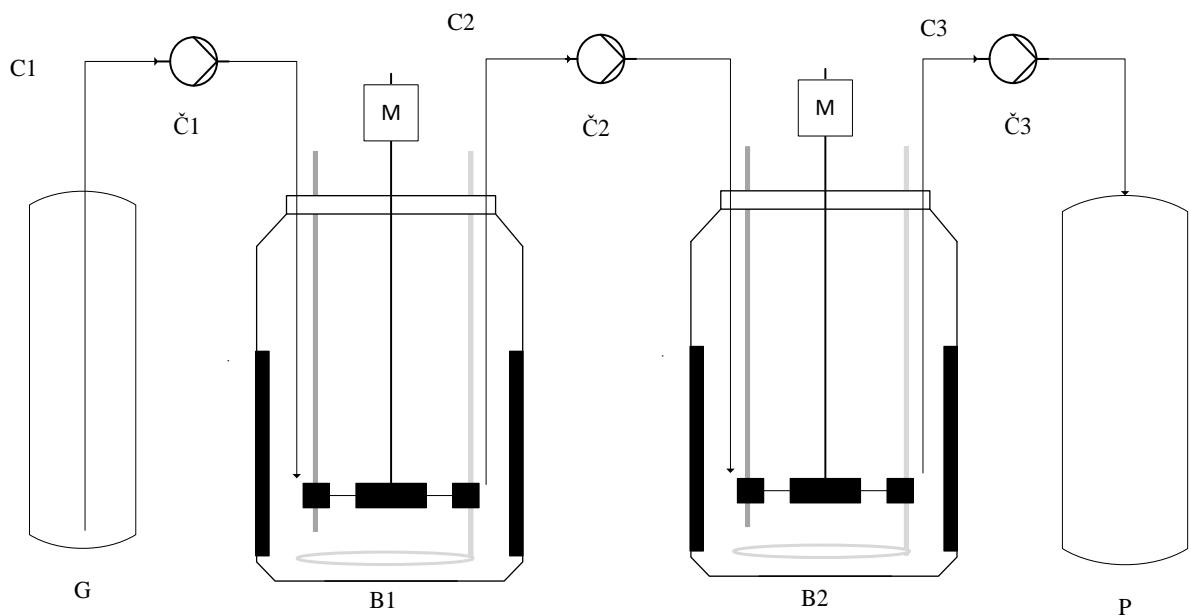
Slika 6: Določanje koeficiente prenosa kisika, $k_L a$, po razplinjevalni metodi.Iz naklona krivulje razberemo $k_L a$ vrednost.Preglednica 9: $k_L a$ vrednosti pri različnih hitrostih mešanja in intenziteti prezračevanja

Volumen gojišča (ml)	Hitrost mešanja (obr./min)	Prezračevanje (L/min)	$k_L a$ (min^{-1})
350	400	1	0,383
350	60	Površinsko prezračevanje	0,198

3.2.12 Postavitev kontinuirnega procesa

Kontinuirni sistem smo sestavili iz dveh bioreaktorskih posod, ki sta enaki bioreaktorski posodi, ki smo jo uporabljali za šaržno gojenje. Prvi bioreaktor je namenjen gojenju bakterij, drugi pa pomnoževanju bakteriofagov. V sistem smo povezali še dve posodi. Prva je bila namenjena svežemu gojišču, ki smo ga črpali v prvi bioreaktor. Druga posoda pa je bila na koncu sistema in je bila namenjena zbiranju produkta, v našem primeru bakteriofaga. Vse posode so bile med seboj povezane s cevko premera 1 cm. Te so bile vezane v črpalke, ki so omogočale pretok. Cevke so bile na mestu vstopa v posode dobro zatesnjene, da se je preprečila okužba od zunaj. Pripravljen bioreaktorski sistem se je pred uporabo steriliziral v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Bioreaktorski posodi sta bili v vodni kopeli, s katero smo temperaturo bioprosesne brozge vzdrževali pri 37 °C. Volumen

gojišča v obeh bioreaktorskih posodah je bil 350 ml (Slika 7) (Husimi in sod., 1981; Sauvageau in Cooper, 2010).



LEGENDA:

- B1 – bioreaktorska posoda 1
- B2 – bioreaktorska posoda 2
- C1 – dotok gojišča
- C2 – iztok iz kemostata in vtok v posodo
- C3 – iztok iz posode in zbiranje produkta
- Č1, Č2, Č3 - črpalka
- G – posoda s svežim gojiščem
- K – kemostat
- P – posoda za zbiranje produkta

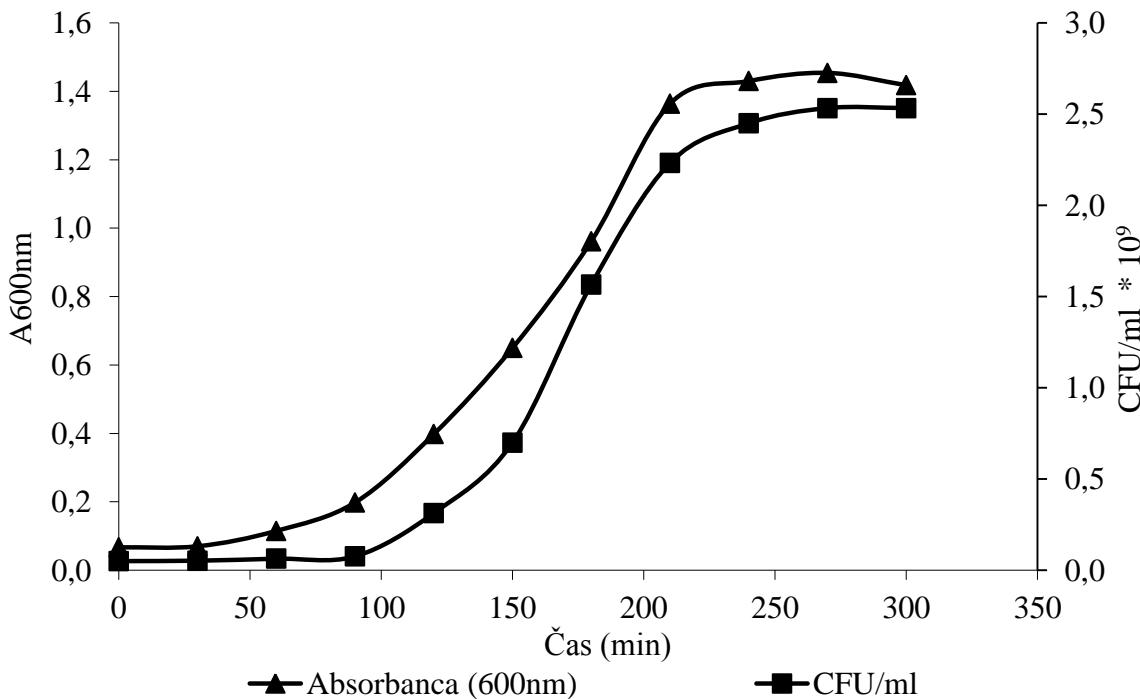
Slika 7: Kontinuirni sistem

4 REZULTATI

V tem poglavju smo predstavili rezultate, ki smo jih pridobili z eksperimentalnim delom. Najprej smo postavili šaržni proces za gojenje bakterijske kulture. Rast celične biomase smo spremljali z metodo štetja kolonij, merjenjem vrednosti absorbance pri 600nm ter spremeljanjem koncentracije raztopljenega kisika v bioprocесni brozgi. Nato smo postavili šaržni proces za gojene bakteriofagov. Število fagov tekom procesa smo spremljali z metodo plakov. Sledila je postavitev procesa z neprestanim polnjenjem, ki je bil sestavljen iz dveh bioreaktorskih posod. Prva je bila namenjena gojenju bakterije, druga pa gojenju bakteriofagov. Število celic smo spremljali z metodo štetja kolonij in merjenjem absorbance, število bakteriofagov smo spremljali z metodo štetja plakov.

4.1 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE NA STRESALNIKU

Praktični del magistrske naloge smo začeli v majhnem merilu, in sicer z gojenjem bakterije na stresalniku v 50 ml gojišča. Na sliki 8 opazimo, da prilagoditvena faza celic traja približno 100 minut, nato pa celice preidejo v eksponentno fazo rasti. Rast bakterijske kulture in posledično tudi absorbanca se po 200 min ustavi pri absorbanci nekje med 1,4 in 1,5. Takrat so celice že v stacionarni fazi rasti. V stacionarno fazo rasti so prešle zaradi pomanjkanja limitnega substrata.

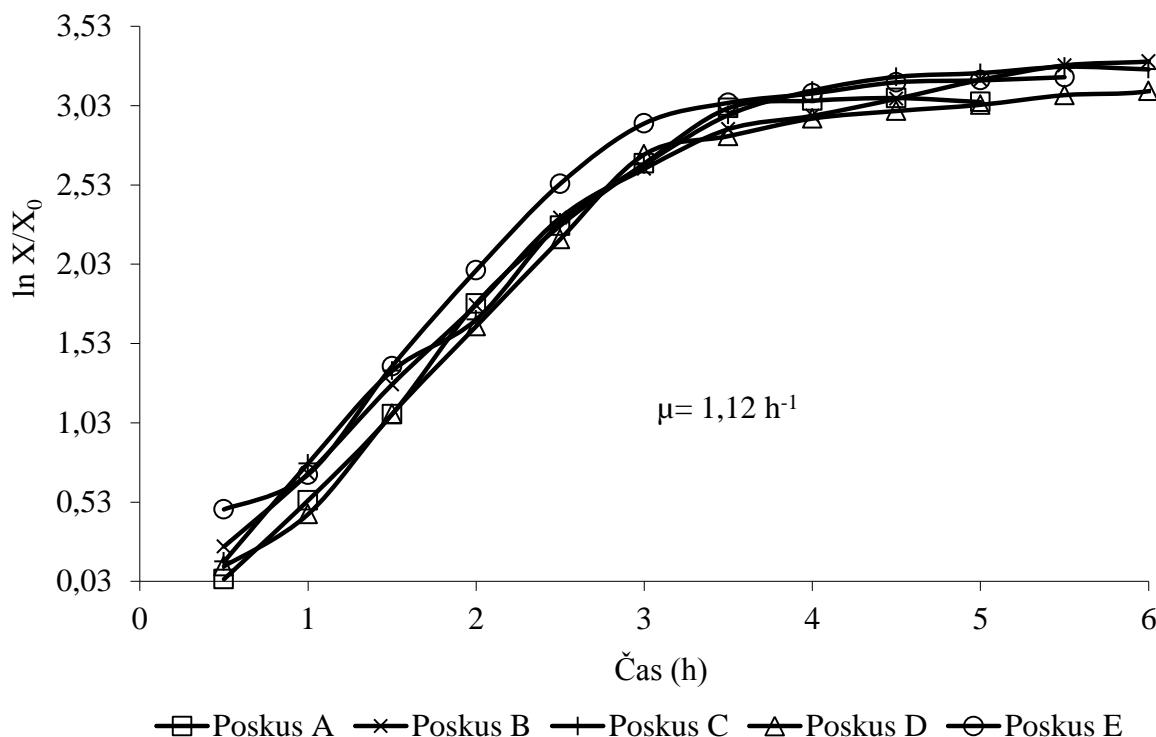


Slika 8: Primerjava spremeljanja prirasta celične biomase z optično metodo (absorbanca (600nm)) in metodo štetja kolonij (CFU/ml) tekom 300 min gojenja na stresalniku pri 37 °C in 200 obr./min.

Pri gojenju na stresalniku je limitni faktor velikokrat kisik, saj mešanje in prezračevanje ni dovolj intenzivno, da bi lahko zadovoljilo potrebe gojene kulture po kisiku. S

spremljanjem števila živih celic ob določenem času, smo potrdili, da je povišanje absorbance posledica povišanja koncentracije celic. Krivulji sta vzporedni, saj ko se začnejo celice eksponentno pomnoževati, se začne eksponentno višati tudi vrednost absorbance. Tako lahko uporabljamo absorbanco kot parameter za posredno določanje števila živih celic v bioprocесni brozgi. Število celic se je v stacionarni fazi ustalilo pri $2,5 \times 10^9$ CFU/ml.

Poskus gojenja bakterijske kulture na stresalniku smo nato ponovili še štirikrat (Poskusi B,C,D in E). Pri vseh poskusih so bili pogojci gojenja enaki in sicer je bila kultura gojena v 50 ml LB gojišča pri 200 obr./min in 37 °C. Na sliki 9 je prikazan logaritem razmerja med končnim in začetnim številom celic v odvisnosti od časa. Iz naklona krivulj smo določili, da je maksimalna specifična hitrost rasti $1,12 \text{ h}^{-1}$. S pomočjo enačbe 4 lahko izračunamo generacijski čas, ki znaša približno 37 min.

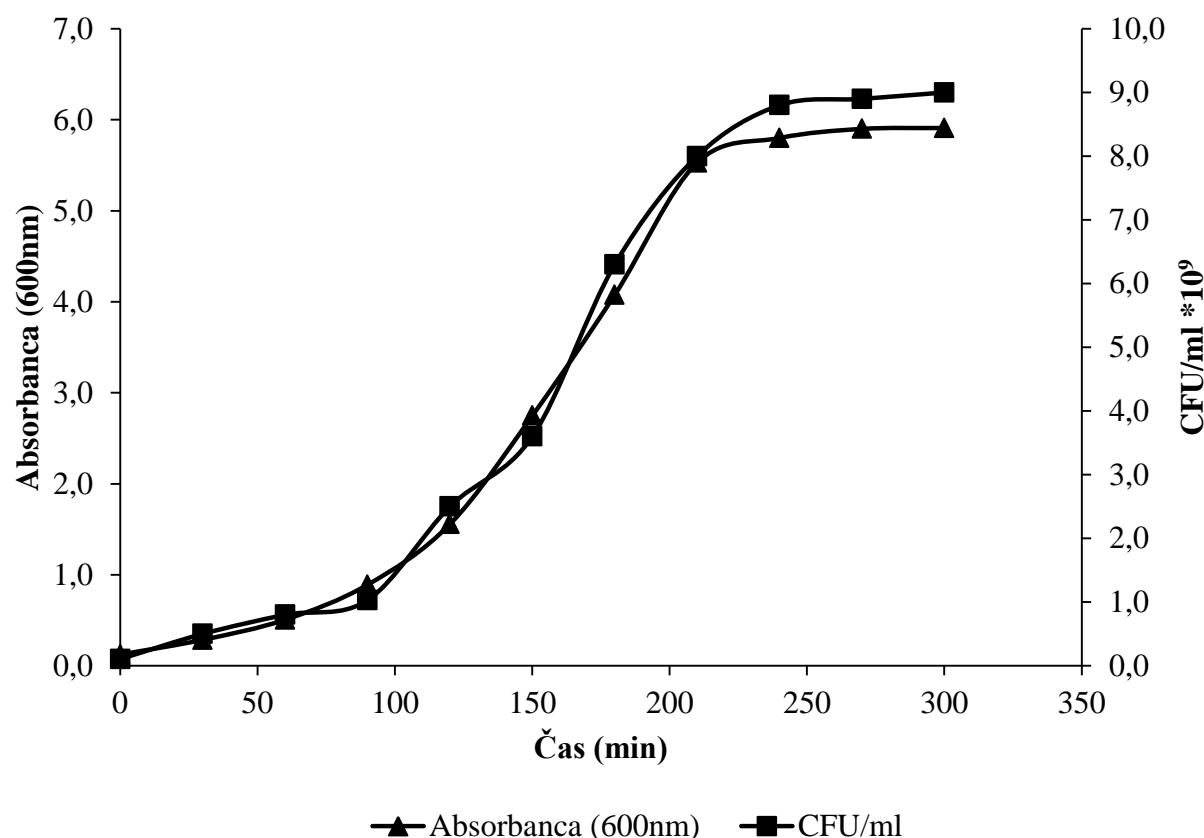


Slika 9: Določitev maksimalne specifične hitrosti (μ_{\max}) rasti bakterije gojene na stresalniku. μ_{\max} smo določili iz naklona krivulj. Pogoji gojenja bakterije na stresalniku so bili v poskusih A,B,C,D in E so bili enaki: 6 h, 37 °C, 200 obr./min.

4.2 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE V BIOREAKTORJU

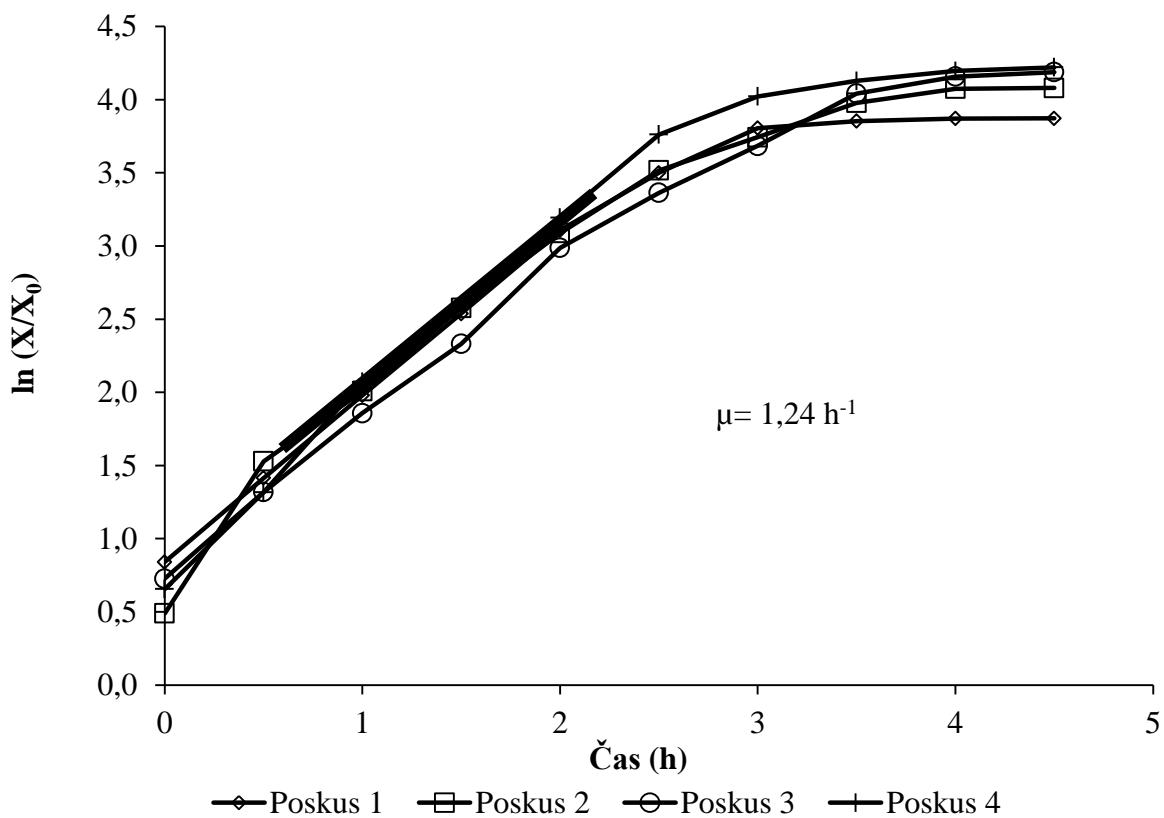
Po gojenju bakterijske kulture na stresalniku je sledilo gojenje v bioreaktorju. Naredili smo prenos v večje merilo. Volumen gojišča se je povečal iz 50 ml na 350 ml. Z razliko od erlenmajerice je v bioreaktorski posodi, zaradi motornega mešala in prezračevalnega

sistema, omogočeno boljše pomešanje in prezračevanje. Tako imajo celice boljše pogoje za rast. Pri gojenju bakterijske kulture v bioreaktorju smo dosegli znatno višje koncentracije celic. Tekom prvega poskusa je že absorbanca nakazovala na to, da so pogoji za rast bakterije v bioreaktorju boljši, kot na stresalniku, saj je absorbanca dosegla vrednost 6. Z vzorčenjem in s spremeljanjem števila CFU/ml smo dokazali, da je bila višja absorbanca posledica višje koncentracije celic v bioprosesni brozgi. Celice potrebujejo 100 min, da se prilagodijo in po 200 min gojenja že preidejo v stacionarno fazo rasti. Število celic je bilo v stacionarni fazi kar štirikrat višje, kot pri gojenju na stresalniku in je doseglo vrednost 9×10^9 CFU/ml (Slika 10).



Slika 10: Primerjava spremljanja prirasta celične biomase z optično metodo (absorbanca) in metodo štetja kolonij (CFU/ml) tekomo 300 min gojenja v bioreaktorju pri 37 °C in 400 obr./min.

Poskus gojenja bakterijske kulture v bioreaktorju smo nato ponovili še trikrat (Poskusi 2,3 in 4). Pri vseh poskusih so bili pogoji gojenja enaki in sicer je bila kultura gojena v 350 ml LB gojišča pri 400 obr./min in 37 °C. Na sliki 11 je prikazan logaritem razmerja med končnim in začetnim številom celic v odvisnosti od časa. Iz naklona krivulj smo določili, da je maksimalna specifična hitrost rasti $1,24 \text{ h}^{-1}$. S pomočjo enačbe 4 lahko izračunamo generacijski čas, ki znaša približno 33 min.



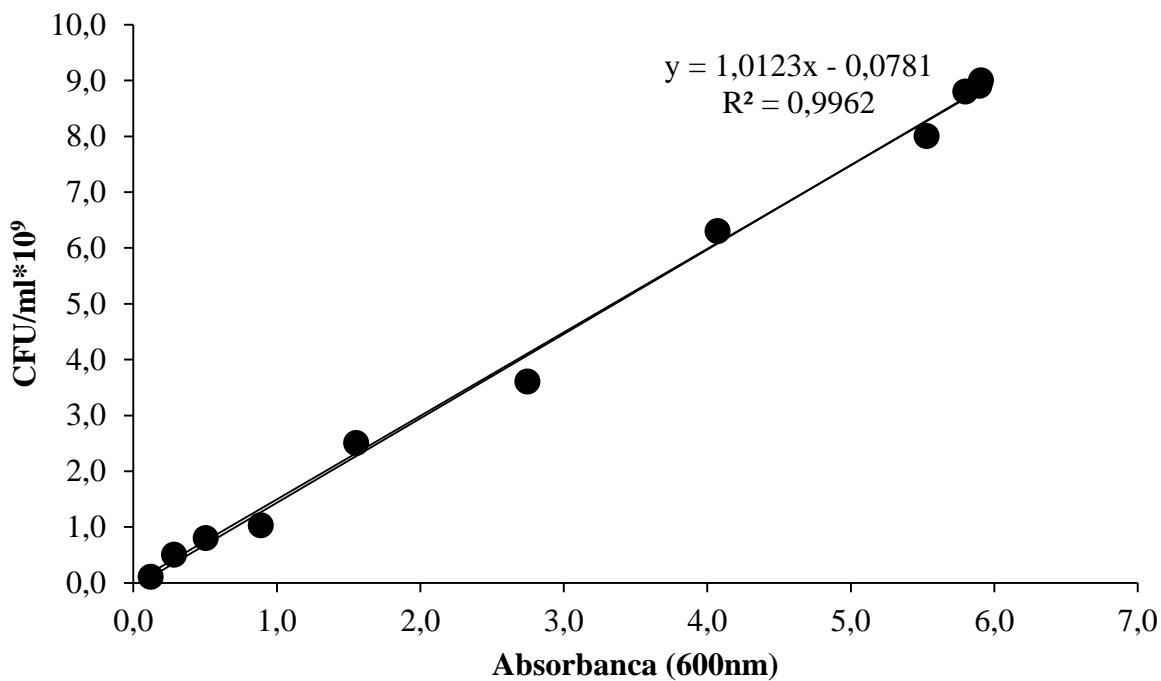
Slika 11: Določitev maksimalne specifične hitrosti (μ_{\max}) rasti bakterije gojene v bioreaktorju.

μ_{\max} smo določili iz naklona krivulj. Pogoji gojenja bakterije v bioreaktorju so bili v poskusih 1,2,3 in 4: 5 h, 37 °C, 400 obr./min.

Spremljanje prirasta celične biomase z metodo štetja kolonij in optično metodo je pokazalo, da sta metodi primerljivi. Spremljanje rasti celične mase z merjenjem absorbance je enostavnejše, zato smo naredili umeritveno krivuljo, ki prikazuje odvisnost števila celic (CFU/ml) od vrednost absorbance (Slika 12). S pomočjo enačbe premice smo lahko določali število celic v bioprosesni brozgi na podlagi absorbance. S tem smo se izognili spremeljanju CFU/ml pri vsakem poskusu.

Enačba premice:

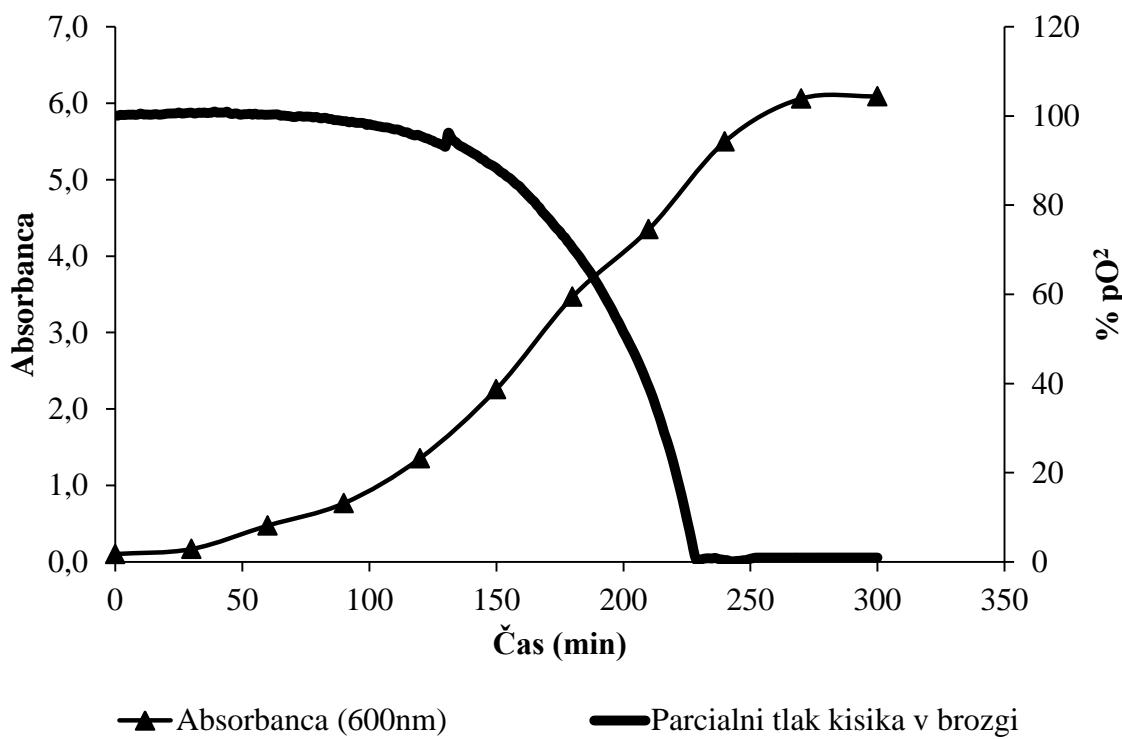
$$y = 1 \times 10^9 \times X \quad \dots(23)$$



Slika 12: Odvisnost števila celic/ml (CFU/ml) od absorbance.

S pomočjo enačbe premice smo lahko samo s spremjanjem absorbance določili število celic v bioprosesni brozgi in se tako izognili metodi štetja kolonij pri vsakem poskusu

Za potrebe merjenje parcialnega tlaka raztopljenega kisika v bioprosesni brozgi, smo v bioreaktorsko posodo namestili v pO₂ elektrodo. Najprej smo elektrodo kalibrirali tako, da smo prepričevali z N₂ in določili vrednost 0 %, kalibracija na vrednost 100 % pa je potekala z zrakom. Po polarizaciji smo v gojišče dodali delovno kulturo in spremljali rast z merjenjem absorbance ter porabo kisika. Na začetku poskusa, ko so bile celice še v prilagoditveni fazni (lag fazi) rasti, je bioprosesna brozga nasičena s kisikom. Po prehodu iz prilagoditvene faze v eksponentno fazu rasti, začne koncentracija raztopljenega kisika strmo padati in se ustavi okoli vrednosti 0 %. Po ustalitvi koncentracije raztopljenega kisika, se ustavi tudi koncentracija živih celic v bioprosesni brozgi in sicer pri vrednosti absorbance 6, kar po izračunu s pomočjo enačbe premice pomeni, da je končne koncentracija živih celic v stacionarni fazni $2,9 \times 10^{10}$ celic/ml (Slika 13).



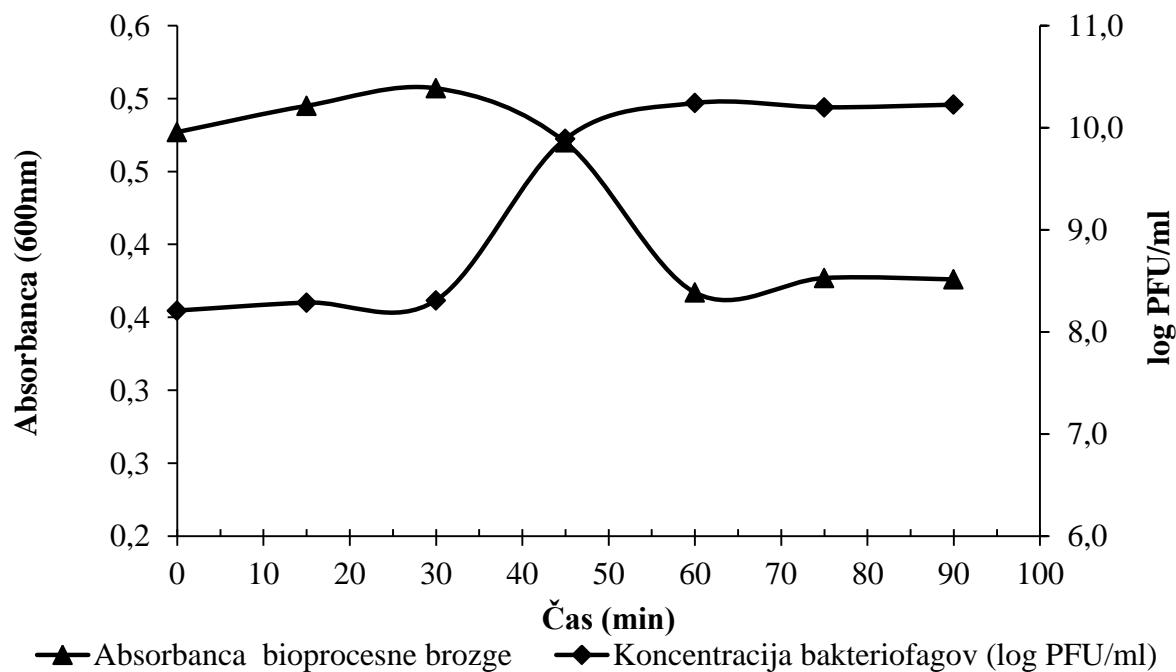
Slika 13: Spremljanje deleža parcialnega tlaka kisika in celične mase (absorbance) tekom gojenja bakterije v šaržnem procesu.

Z višanjem koncentracije celične mase se parcialni tlak kisika v brozgi zmanjšuje.

4.3 GOJENJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU V ŠARŽNEM PROCESU

Z gojenjem bakteriofagov v šaržnem procesu smo poskušali okarakterizirati fag, ki ga bomo uporabljali. Najprej smo določili čas, ki poteče od infekcije do sprostitev fagov iz celice (*ang. Latent period*). Bakterijsko kulturo smo gojili do absorbance približno 0,5 kar je približno 5×10^8 celic/ml in nato dodali fage v koncentraciji $5,0 \times 10^8$ PFU/ml, kar pomeni, da je bila MOI vrednost 1. Tako bi lahko teoretično en fag inficiral eno bakterijsko celico. Na sliki 14 čas 0 min pomeni čas infekcije in ne začetek gojenja bakterije. Rast bakterije do absorbance 0,5 je podobna rasti pri šaržnem gojenju bakterije in ni prikazana zaradi preglednosti rezultatov. Ko se začne koncentracija fagov v bioprosesni brozgi večati, se absorbanca znižuje, kar pomeni, da so se fagi začeli z lizo bakterijskih celic sproščati v bioprosesno brozgo. Ugotovili smo, da bakteriofag potrebuje približno 45 minut, da celico inficira, se v njej namnoži in jo lizira. Absorbanca v bioreaktorju se je ob sprostitvi fagov znižala, saj so le-ti celice lizirali. Še vedno je ostala motnost, ki bi lahko bila posledica rezistentnih bakterij, kar pa pomeni, da bi morala absorbanca naraščati, saj bi se te bakterije razmnoževale naprej. Ker se absorbanca ustali, pomeni da motnost ni posledica rezistentnih bakterij. Druga možnost je, da bakterijska celica razpade na večje dele, kar pa onemogoči zbistritev bioprosesne brozge po lizi celic.

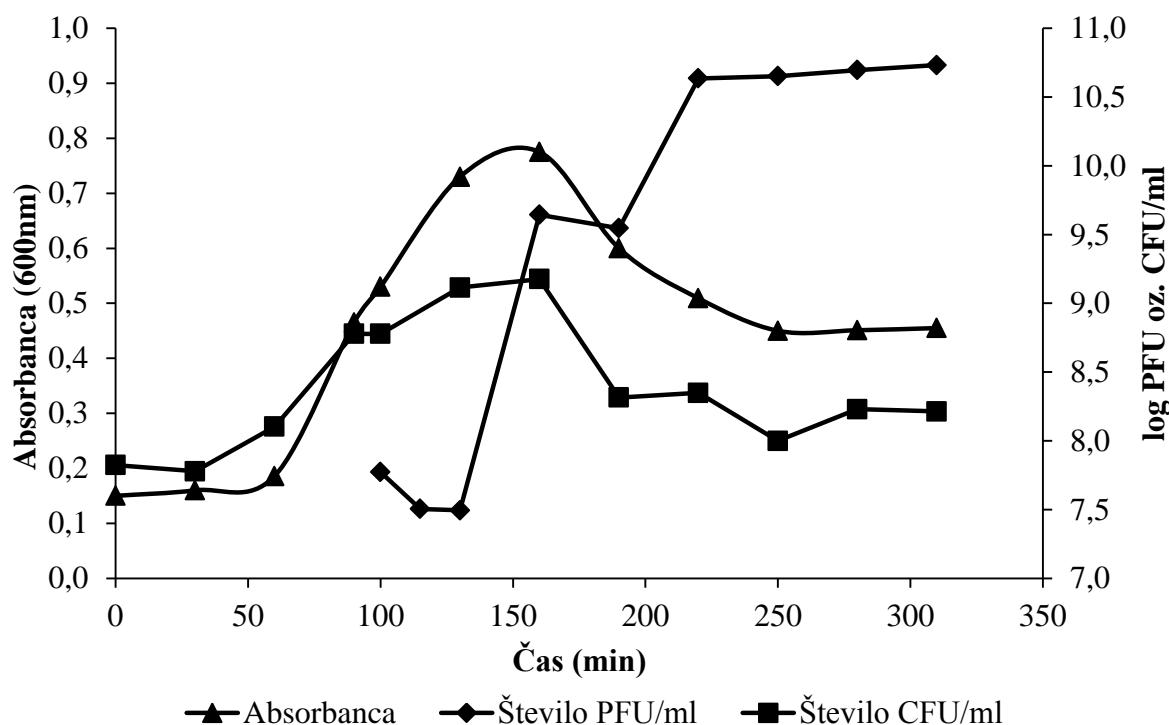
Število novo nastalih fagov na eno celico smo določili tako, da smo število fagov, ki so nastali v enem ciklu delili s številom bakterij, ki so bile inficirane. Pri tem smo uporabili Poissonovo porazdelitev, po kateri je pri MOI 1 inficiranih 63,2 % bakterij (Pregl. 7). Absorbanca je pred začetkom lize znašala 0,500, kar pomeni, da je bilo v bioprosesni brozgi 5×10^8 celic/ml od katerih je bilo inficiranih $3,15 \times 10^8$ CFU/ml. Končno število fagov je 1×10^{10} PFU/ml. Iz danih podatkov lahko izračunamo število pomnoženih fagov na celico, ki znaša 32. Gibanje krivulje absorbance na sliki 14 nakazuje na to, da so bakteriofagi v enem ciklu uničili vse bakterije, ki so bile dovetne za okužbo, saj se sprostivijo fagov absorbanca bioprosesne brozge zniža in ustavi.



Slika 14: Poskus A. Gojenje bakteriofagov v šaržnem procesu v bioreaktorju, ki je zaključeno po enem ciklu pomnožitve fagov.

Z začetkom sproščanja bakteriofagov iz bakterijskih celic se celična masa (absorbanca) začne zmanjševati, kar je posledica lize bakterij. Celice smo inficirali pri absorbanci 0,50 z MOI 1.

Z naslednjim poskusom smo poskušali ugotoviti, ali so po lizi bakterijskih celic v gojišču še vedno prisotne žive bakterijske celice. Slika 15 prikazuje spremeljanje CFU/ml tekom gojenja fagov v šaržnem procesu.



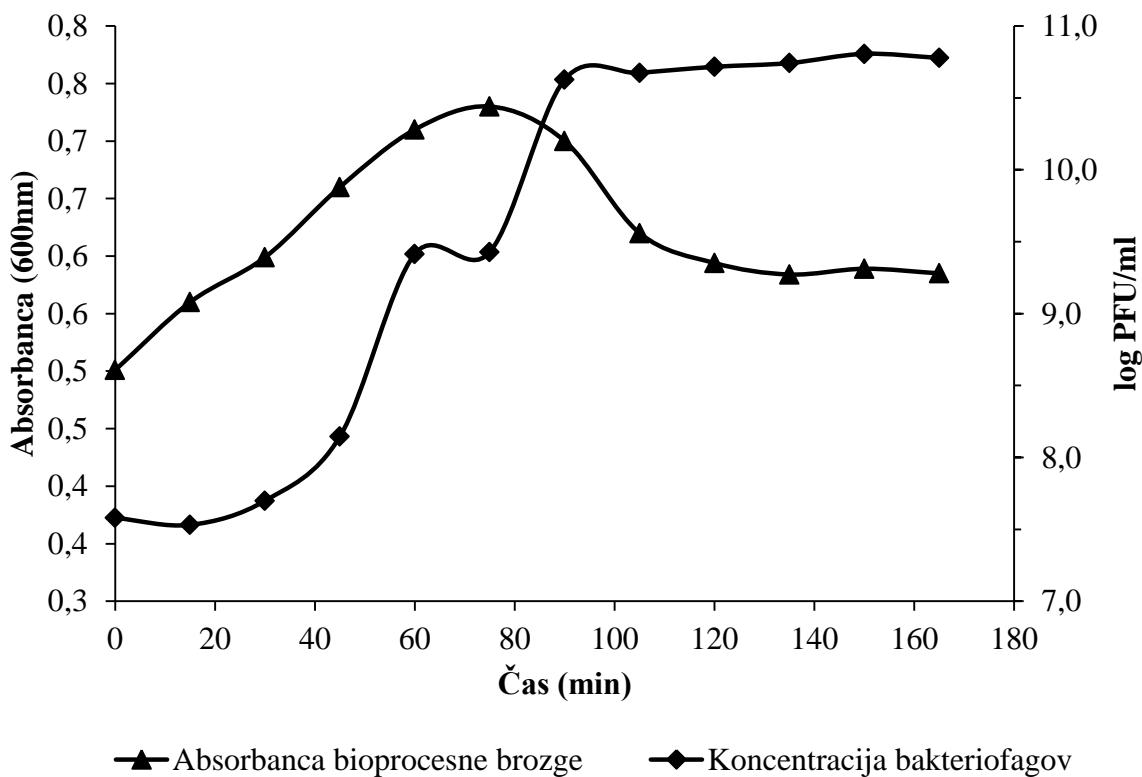
Slika 15: Spremljanje rasti celične biomase z metodo štetja kolonij (Število CFU/ml) in z merjenjem optične gostote (absorbance) tekom gojenja bakteriofaga v šaržnem procesu.

Celice smo inficirali pri absorbanci 0,500 (100 min) z MOI vrednostjo 0,1. Potekla sta dva cikla pomnoževanja fagov.

Proces predstavljen na sliki 15 smo začeli s koncentracijo celične mase 7,8 log CFU/ml, jo gojili do koncentracije 8,7 log CFU/ml (absorbanca 0,500; 100 min) ter jo inficirali s koncentracijo fagov 7,7 log PFU/ml. Koncentracija celic po infekciji še naraste na 9,1 log CFU/ml nato pa pade in se ustali na 8,1 log CFU/ml. Krivulji absorbance in števila CFU/ml si sledita, kar pomeni, da padec absorbance pomeni lizo bakterijskih celic. Na koncu poskusa se absorbanca ustali pri 0,450. Pri tej absorbanci imamo v bioprosesni brozgi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml živih celic in $1,4 \times 10^9$ CFU/ml liziranih celic. Podatek o liziranih celic smo dobili tako, da smo od števila celic pred lizo (pri času 160min; slika 15), odšeli število živih celic po lizi. Glede na enačbo premice (Enačba 23) ima $1,5 \times 10^8$ živih celic/ml absorbanco 0,100. Preostala absorbanca je posledica celičnih ostankov liziranih celic. Glede na to, da je bilo liziranih $1,4 \times 10^9$ CFU/ml, lahko sklepamo, da je preostanek absorbance 0,350 posledica celičnih ostankov. Ta vrsta fagov očitno ne razgradi popolnoma bakterijske celice, saj po lizi še vedno ostanejo večji delci, ki sipljejo svetlobo pri 600nm. Tako smo dokazali, da je del motnosti po lizi bakterijskih celic posledica celičnih ostankov. MOI je bila 0,1 saj je ob času infekcije 5×10^7 PFU/ml na 5×10^8 CFU/ml ($t=100$ min). Po Poissonovi porazdelitvi to pomeni, da je inficiranih 9,52% bakterij, kar je $4,76 \times 10^7$ CFU/ml. Po prvem ciklu št. fagov naraste na $3,7 \times 10^9$ PFU/ml. Iz danih podatkov lahko izračunamo število pomnoženih fagov na celico, ki zanaša 84. V 160 min imamo v gojišču $1,5 \times 10^9$ CFU/ml. MOI vrednost je narastla iz 0,1 na 2,5. Tako

je bilo inficiranih $1,38 \times 10^9$ CFU/ml. Končna koncentracija fagov je $2,6 \times 10^{10}$ PFU/ml, kar pomeni, da je število pomnoženih fagov na celico 19 (Slika 15).

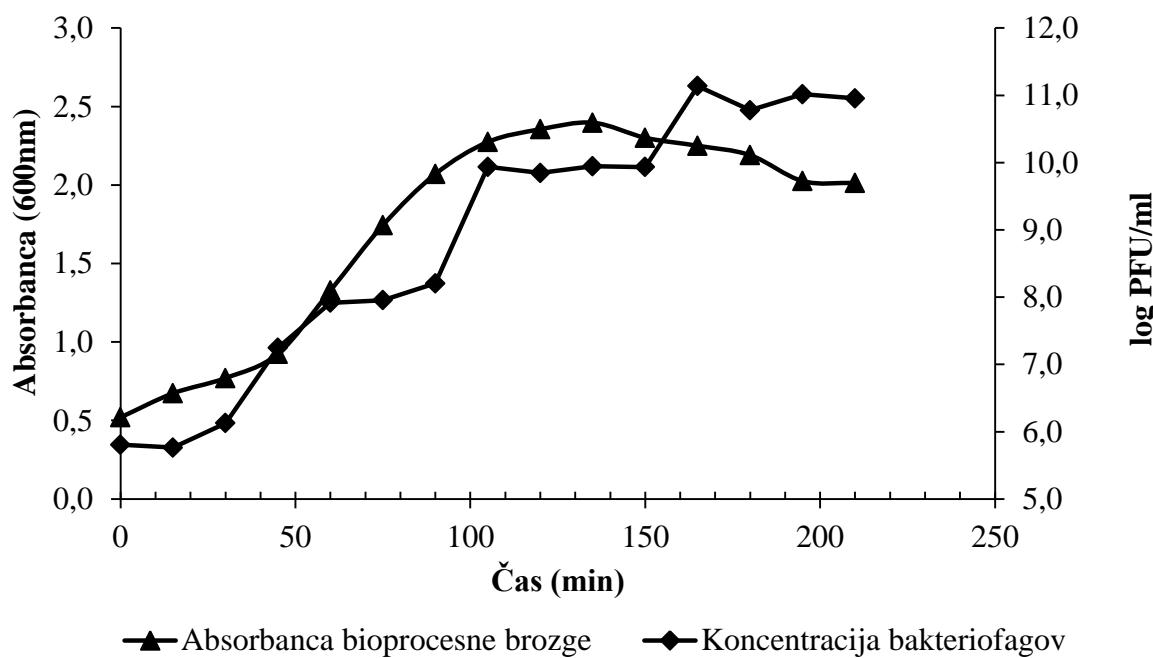
Z nižjimi MOI vrednosti lahko dosežemo več ciklov pomnoževanja fagov. Graf na sliki 16 prikazuje dva cikla pomnoževanja fagov. Tudi v tem primeru je bil MOI 0,1. V prvem koraku je bilo število pomnoženih fagov na celico približno 52. Fagi so številčno prerastli bakterije, saj je na začetku drugega cikla MOI narastel na 3. Tako so v naslednjem ciklu bile inficirane vse za okužbo dovetne bakterije. Absorbanca po sprostitvi fagov iz bakterij pade in se ustali. Število novo nastalih fagov na celico je bilo približno 19.



Slika 16: Poskus B. Gojenje bakteriofagov v šaržnem procesu v bioreaktorju, ki je bilo zaključeno po dveh ciklih pomnožitve fagov.

Celična masa (absorbanca) se začne zmanjševati šele po začetku sproščanja fagov iz bakterijskih celic na koncu drugega cikla pomnoževanja bakteriofagov. Celice smo inficirali pri absorbanci 0,500 z MOI 0,1.

Na sliki 17 lahko opazimo tri cikle pomnoževanja fagov, saj smo pri absorbanci 0,500 inficirali s fagi v takšni koncentraciji, da je bila MOI vrednost samo že 0,001. V poskusu C fagi številčno prerastejo bakterije šele po drugem ciklu, kjer je MOI vrednost že 2,5. Število novo nastalih fagov na bakterijsko celico v posameznem ciklu je 100, 79, 25.

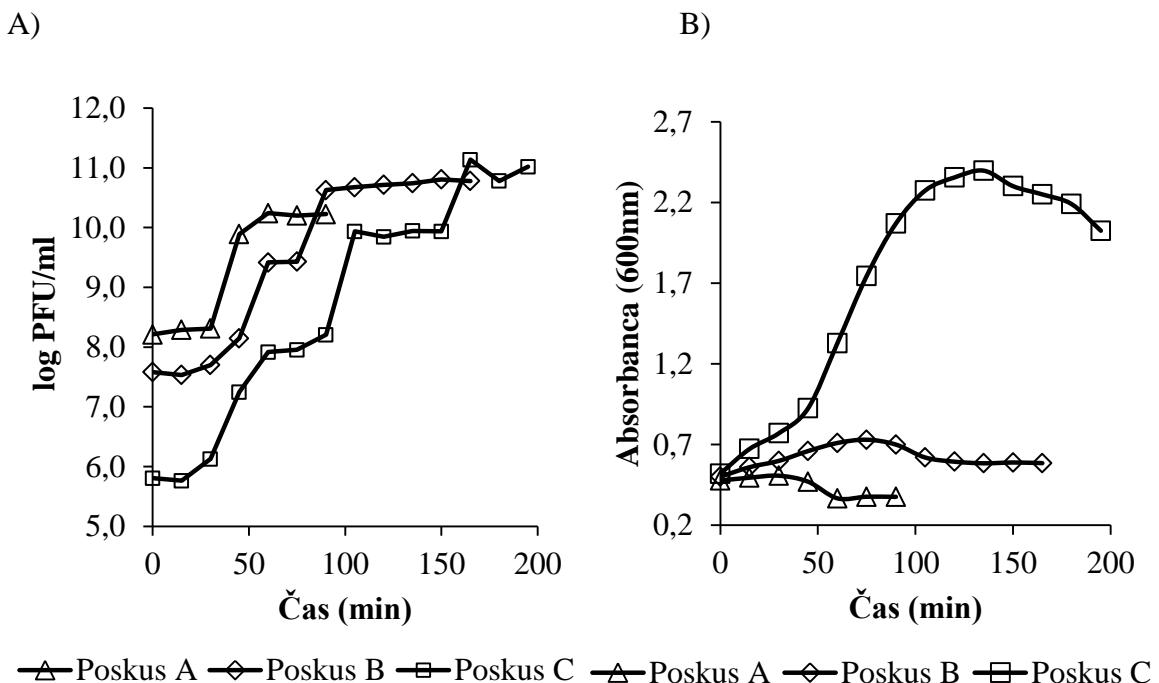


Slika 17: Poskus C. Gojenje bakteriofagov v šaržnem procesu, ki je bilo zaključeno po treh ciklih pomnožitve fagov.

Celična masa (absorbanca) se začne zmanjševati šele po začetku sproščanja fagov iz bakterijskih celic na koncu tretjega cikla pomnoževanja bakteriofagov. Celice smo inficirali pri absorbanci 0,500 z MOI 0,001.

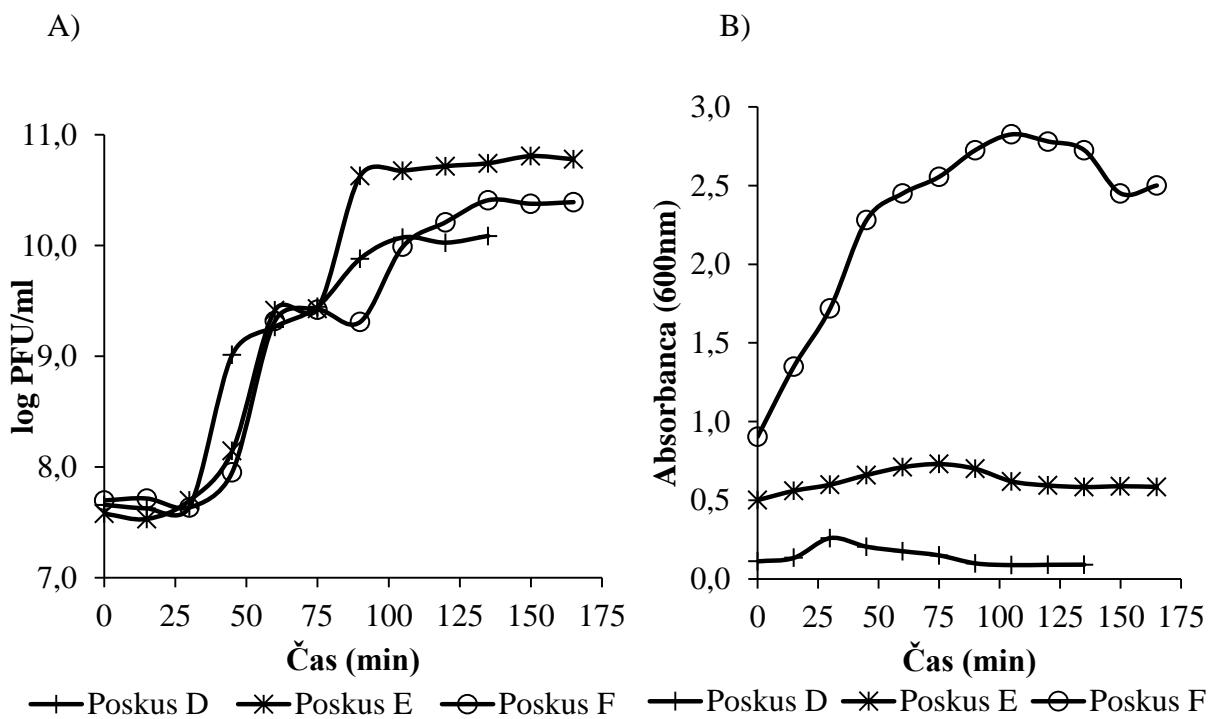
Pri gojenju bakteriofagov v šaržnem procesu smo želeli določiti optimalen čas infekcije, oziroma določiti pri kolikšni koncentraciji celic dodati optimalno količino fagov, da bo končni titer bakteriofagov čim višji. Tako smo v treh poskusih zajeli infekcijo z različnimi začetnimi titri fagov, pri enaki začetni koncentraciji bakterij in s tem določiti optimalno začetno koncentracijo fagov pri absorbanci 0,5.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je optimalen trenutek infekcije bakterijskih celic, kot te dosežejo koncentracijo 5×10^8 CFU/ml, in sicer s tolikšno količino fagov, da je njihova koncentracija nekje med 5×10^5 PFU/ml in 5×10^7 PFU/ml. Kar pomeni, da je MOI vrednost med 0,001 in 0,1. Pri poskusu C dosežemo nekoliko višjo koncentracijo fagov, vendar pa proces traja dlje časa, saj zaradi nizkega MOI potečejo trije cikli pomnoževanja fagov in dosežemo končni titer šele po 175 min, medtem ko pri poskusu B dosežemo končno koncentracijo bakteriofagov že po 90 min gojenja (Slika 18A). V poskusu C absorbanca močno naraste, ker je ob infekciji nizka koncentracija fagov in se lahko neinficirane celice naprej razmnožujejo (Slika 18B).



Slika 18: Primerjava gibanja koncentracije bakteriofagov (A) in celične mase (B) v poskusih A,B in C. Celice smo v poskusih A,B in C inficirali, ko so dosegle vrednost absorbance 0,5 in sicer je bilo v poskusu A število fagov na bakterijsko celico 1, v poskusu B je bilo 0,1 in v poskusu C še samo 0,001.

V naslednjem koraku smo poskušali določiti optimalen trenutek infekcije tako, da smo bakterijske celice pri različnih optičnih gostotah inficirali z enako koncentracijo fagov. Glede na rezultate je optimalen trenutek infekcije, ko absorbanca doseže vrednost 0,5, saj je v tem poskusu bil dosežen najvišji končni titer bakteriofagov. Pri poskusu D, kjer je bila najvišja vrednost MOI, so bile dosežene najnižje koncentracije celic. Razlog je v prenizki koncentraciji bakterijskih celic ob infekciji, katere bi fagi lahko okužili in se namnožili. V prvem ciklu so bakteriofagi okužili skoraj vse celice. Na sliki 19B lahko opazimo, da je tudi absorbanca začela padati že po prvem ciklu pomnoževanja fagov. V poskusih E in F pa sta vidna dva cikla pomnoževanja (Slika 19A). V obeh primerih je bilo na voljo dovolj celic za infekcijo. Število novonastalih fagov je primerljivo in sicer je okoli 25 fagov na celico. V primeru F je bil še nižji MOI, kar je lahko eden izmed razlogov za nižji končni titer bakteriofagov. Drug razlog pa je lahko, da je bakterijska kultura dosegla že stacionarno fazo, saj je absorbanca že presegla vrednost 3 (Slika 19B). Celice v prehodu v stacionarno fazo so že manj dovetne za okužbo in v slabši fiziološki kondiciji, kar vodi tudi v nižje sprostivitveno število v drugem koraku (Asami in sod, 1997). Tako je lahko ustalitev absorbance v primeru F posledica prehoda v stacionarno fazo.

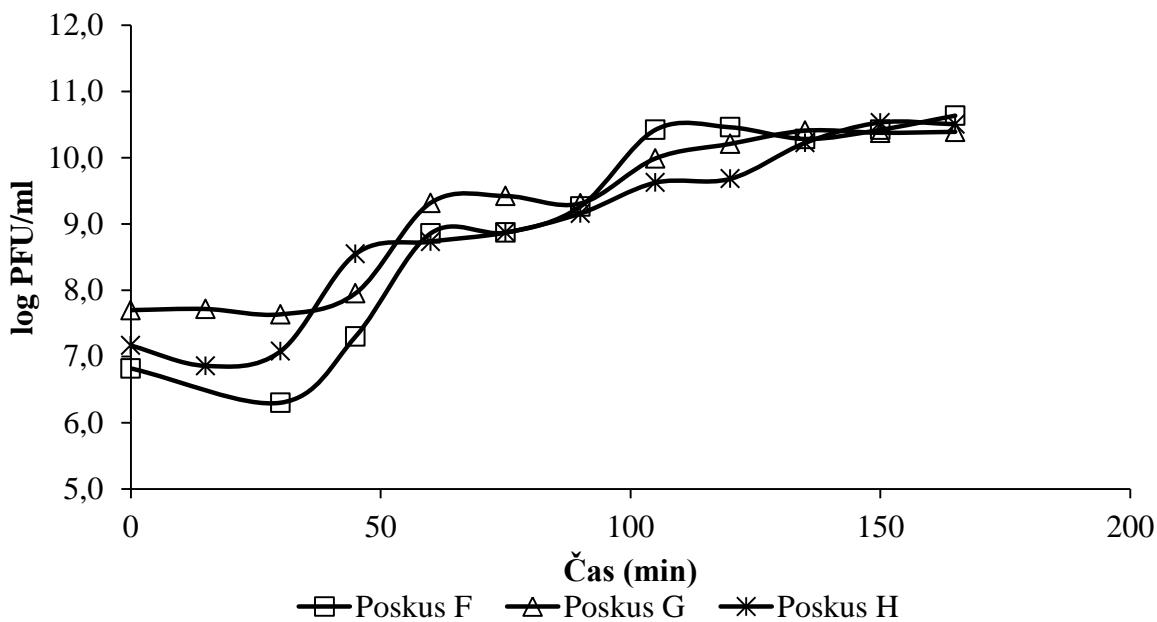


Slika 19: Primerjava gibanja koncentracije bakteriofagov (A) in celične mase (B) v poskusih D, E in F. Celice smo v poskusih D, E in F inficirali pri različnih vrednostih absorbance z enako koncentracijo bakteriofagov: Poskus D: 0,100; Poskus E: 0,500; Poskus F: 0,900

Pri poskusih G,F in H smo za infekcijo bakterijske kulture, po dosegu absorbance 0,900, uporabili nižje MOI vrednosti. S tem smo želeli doseči višje končne titre bakteriofagov v bioprosesni brozgi, saj smo pričakovali več ciklov pomnoževanja faga. Končna koncentracija bakteriofagov je podobna oz. nekoliko nižja, kot pri poskusih, kjer smo kulturo bakterij inficirali pri absorbanci 0,500 z MOI 0,1 (Slika 20). Najvišja produktivnost je bila dosegena v poskusu E, kjer smo pri absorbanci 0,500 bakterije inficirali s fagi z MOI vrednostjo 0,1 (Pregl. 10).

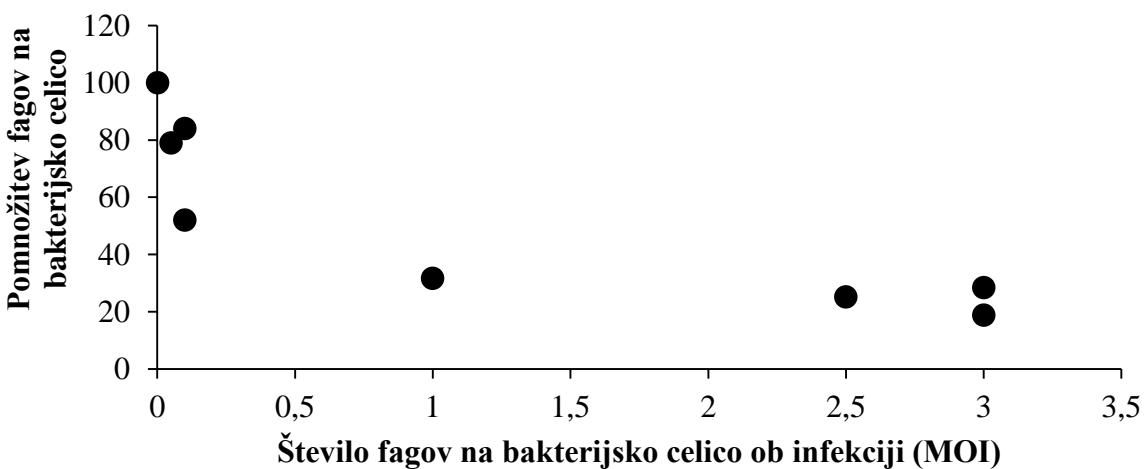
Preglednica 10: Primerjava produktivnosti proizvodnje bakteriofagov med poskusi A,B,C,D,E,F,G in H.

Poskus	Produktivnost (št. nastalih fagov/h)
A	$1,3 \times 10^{10}$
B	$3,6 \times 10^{10}$
C	$3,0 \times 10^{10}$
D	$5,4 \times 10^9$
E	$4,0 \times 10^{10}$
F	$9,0 \times 10^9$
G	$1,1 \times 10^{10}$
H	$1,3 \times 10^{10}$



Slika 20: Primerjava gibanja koncentracije bakteriofagov v bioprosesni brozgi v poskusih F, G in H. Celice smo v poskusih F, G in H inficirali, ko so dosegle vrednost absorbance 0,9 in sicer je bilo v poskusu F število fagov na bakterijsko celico 0,1, v poskusu G je bilo 0,05 in v poskusu H 0,02.

Graf na sliki 21 prikazuje odvisnost števila pomnoženih fagov na bakterijsko celico od MOI na podlagi katere bi lahko trdili, da se z večanjem MOI manjša število novo nastalih fagov na celico. Super infekcija lahko vpliva na število pomnoženih fagov na bakterijsko celico. Pri višjih MOI je večja verjetnost, da se bo na eno bakterijsko celico vezalo več fagov in posledično bi lahko tudi več fagov inficiralo eno bakterijsko celico. Takšen pojav imenujemo superinfekcija.



Slika 21: Število fagov, ki se namnoži v eni bakterijski celici v odvisnosti od števila fagov na bakterijsko celico ob infekciji.

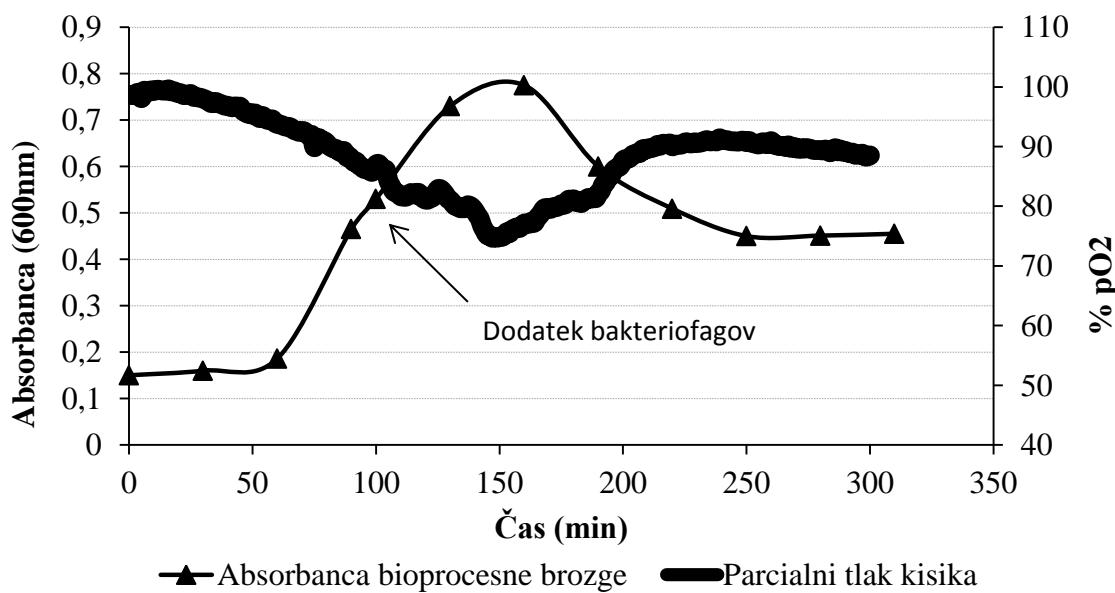
Z višanjem MOI se število pomnoženih fagov na celico zmanjšuje.

Pri poskusih F in H, kjer smo gojili bakteriofage v šaržnem procesu lahko opazimo znižanje koncentracije fagov v prvih 30 min po infekciji, ki je posledica adsorpcije le teh na bakterijske celice. V preglednici 11 so prikazani podatki za izračun konstante adsorpcije. Opazimo lahko, da se je v 15 min adsorbiralo 93 % vseh dodanih fagov. Po enačbi 1 lahko izračunamo konstanto adsorpcije, ki tako znaša 4×10^{-9} ml/min. Konstanta adsorpcije bi lahko bila tudi višja, če bi se fagi adsorbirali prej kot v 15 min po infekciji.

Preglednica 11: Podatki za izračun konstante adsorpcije.

Čas (min)	CFU/ml X 10 ⁸	PFU/ml X 10 ⁶
0	0,40	8,36
15	0,60	0,60
30	1,17	0,65
45	1,03	26,60
60	15,00	3042,00
75	9,50	4042,00

S pomočjo kisikove elektrode smo preverili, kako se spreminja koncentracija raztopljenega kisika tekom gojenja bakteriofagov v šaržnem procesu. Do časa infekcije parcialni kisika pada podobno kot pri gojenju bakterije v šaržnem procesu, nato pa se z lizo celic trend obrne in koncentracija raztopljenega kisika v bioprosesni brozgi se začne povečevati in se ustali. Poskus smo zasnovali tako, da smo pri absorbanci 0,500 inficirali z MOI vrednostjo 0,10 (Slika 22).



Slika 22: Spremljanje deleža parcialnega tlaka kisika in celične mase (absorbance) tekom gojenja v šaržnem procesu.

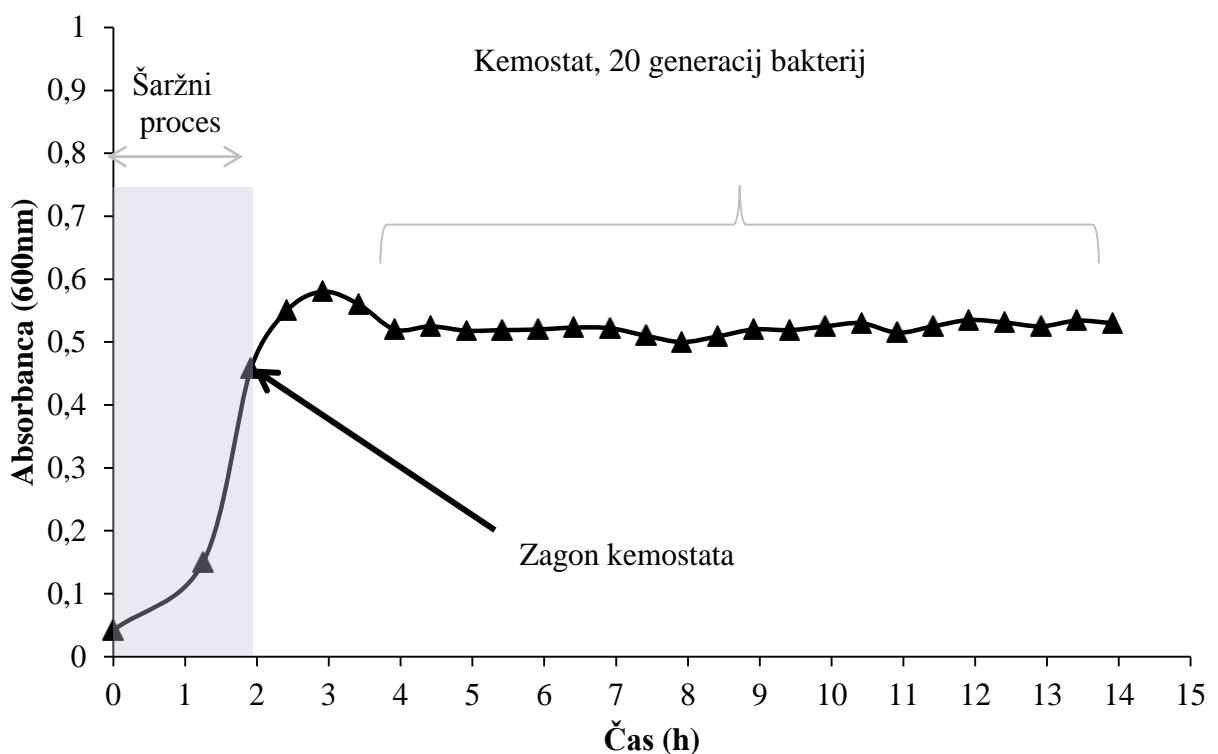
Z višanjem koncentracije celične mase se parcialni tlak kisika v brozgi zmanjšuje. Po začetku sproščanja fagov iz bakterijskih celic se parcialni tlak kisika v bioprosesni brozgi postopoma povečuje, nato pa ustali.

4.4 KONTINUIRNO GOJENJE

Po uspešno zaključenem gojenju bakteriofagov v šaržnem procesu smo eksperimentalno delo nadaljevalni s kontinuirnim gojenjem bakteriofagov.

4.4.1 Kemostat

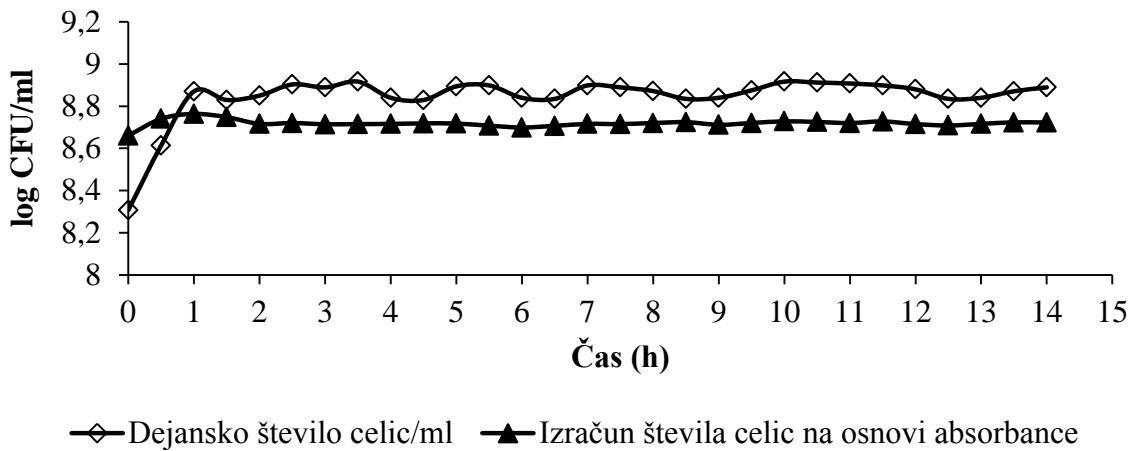
Vodenje kemostata smo začeli kot šaržni proces. Za limitni substrat smo, glede na rezultate merjenja pO_2 pri gojenju bakterije v šaržnem procesu, izbrali kisik. Limitacijo smo izvedli z izklopom prezračevanja in zmanjšanjem hitrosti mešanja. Kot smo že omenili, smo proces začeli kot šaržni proces, in sicer smo v prvo bioreaktorsko posodo k 350 ml gojišča dodali 5 % vcepek bakterijske kulture. Ko je absorbanca presegla vrednost 0,400, smo začeli z vodenjem kemostata. To je po preteku 1,9 h. Koncentracija celic se je po začetku vodenja kemostata še zviševala, nato rahlo padla in se ustalila pri vrednosti 0,500. Proses je tekel še 10 h. V tem časovnem obdobju so se bakterijske celice podvojile približno 20 krat, v celotnem kontinuirnem sistemu pa 33 krat (Slika 23). Vtok in iztok sta bila enaka in sicer 5 ml/min.



Slika 23: Gojenje bakterijske kulture kemostatu.

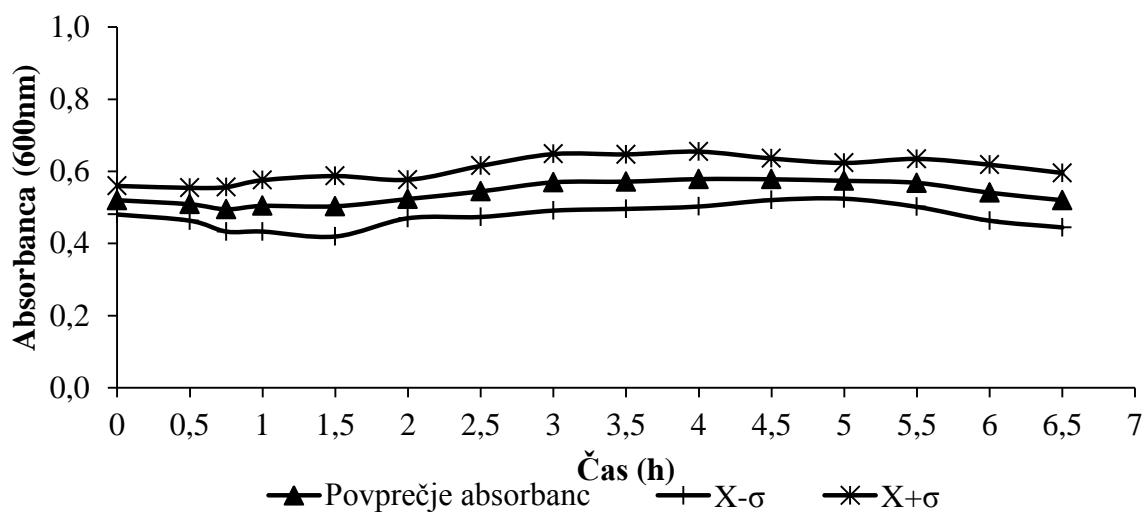
Gojenje smo pričeli s šaržnim procesom. Po preteku 1,9 h smo vklopili pretok in pričeli z vodenjem kemostata pri $D = 0,85 \text{ h}^{-1}$. Po dveh urah vodenja kemostata se celična masa ustali pri vrednosti absorbance 0,500. Kemostat smo vodili še 10 h.

Dejanska koncentracija celic se ustali pri približno 8,8 log CFU/ml in se ne razlikuje bistveno od števila celic, ki je izračunan posredno iz enačbe premice in znaša 8,7 log CFU/ml (Slika 24).



Slika 24: Prikazuje skladnost med številom celic v kemostatu, ki je bilo pridobljeno z metodo štetja kolonij in številom celic, ki smo jih na podlagi absorbance preračunali iz enačbe umeritvene krivulje.

Vodenje kemostata smo tako vedno začeli pri vrednosti absorbance okoli 0,500. Okoli te vrednosti se je le-ta nato tudi ustalila. Slika 25 prikazuje, kako se je v povprečju gibala koncentracija celic pri vodenju kemostata pri različnih poskusih.

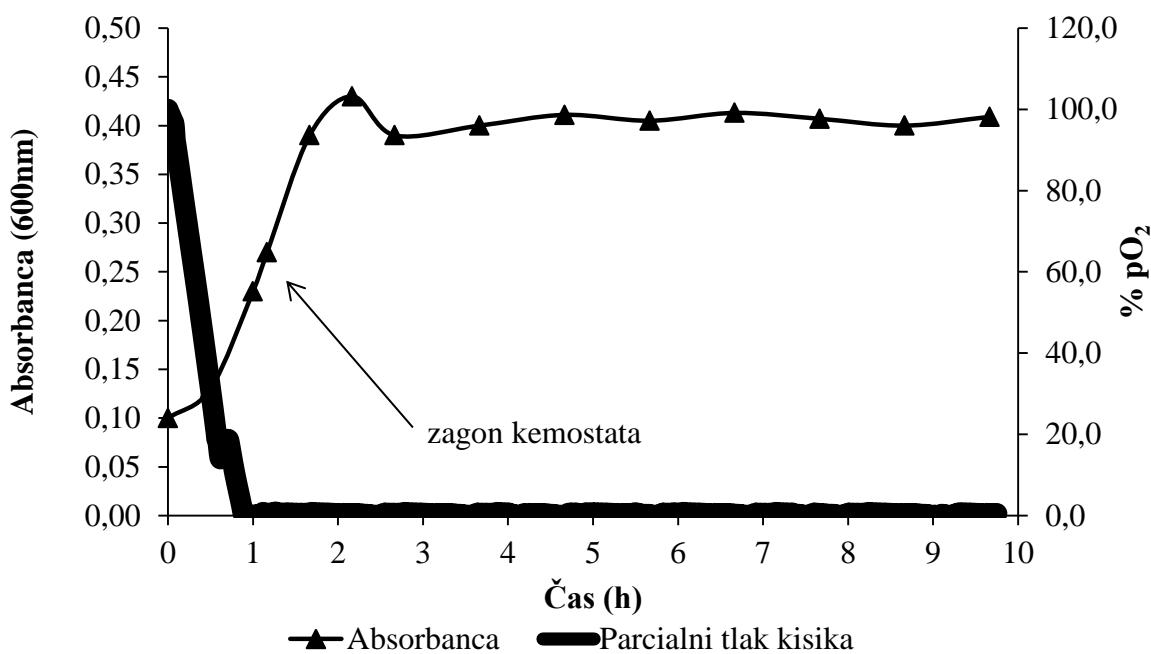


Slika 25: Povprečna vrednost gibanja celične mase tekom vodenja kemostata.

Povprečna vrednost je izračunana iz eksperimentalno pridobljenih podatkov. $X - \sigma$ in $X + \sigma$ predstavljata en standardni odklon od povprečne vrednosti absorbance pri določenem času.

Bakterijske kulture pri gojenju v procesu brez prezračevanja hitro porabi raztopljen kisik v bioprosesni brozgi. Kot smo že omenili, je bil limitni substrat pri vodenju kemostata. Limitacijo s kisikom smo dosegli z izklopom prezračevanja in zmanjšanjem hitrosti

mešanja na 60 obr./min. Bakterije ves kisik porabijo že kmalu po prehodu v eksponentno fazo rasti. Posledično se njihova rast ustali (Slika 26).

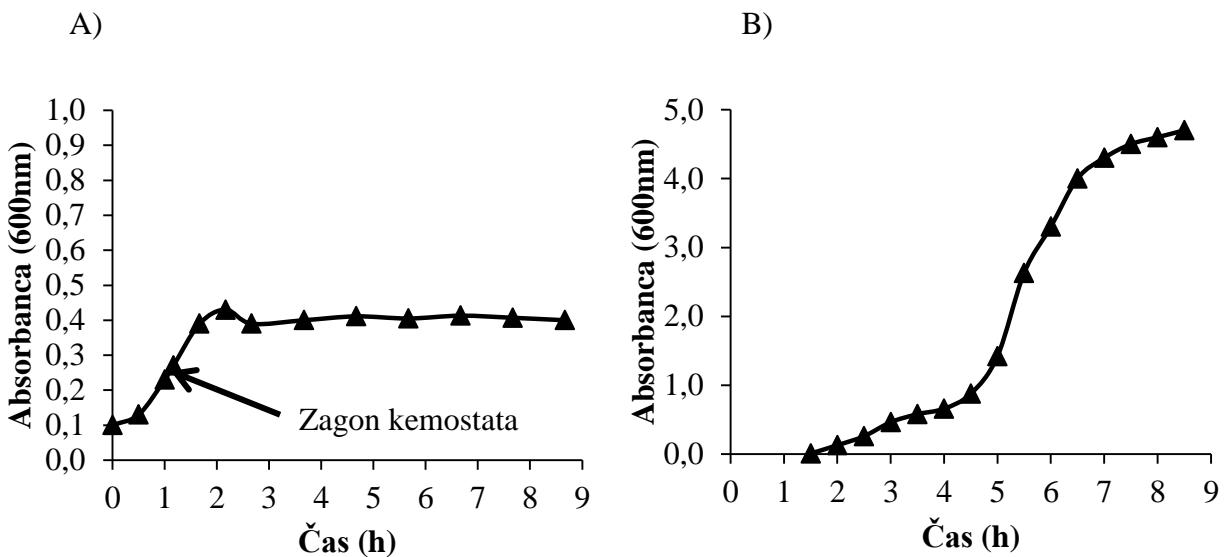


Slika 26: Spremljanje deleža parcialnega tlaka kisika in celične mase (absorbance) tekom gojenja bakterije v kemostatu.

Z višanjem koncentracije celične mase se parcialni tlak kisika v brozgi zmanjšuje. Ko se porabi ves kisik se koncentracija celic v bioprosesni brozgi ustali. Kisik je tako limitni faktor pri vodenju kemostata pri razredčevalni hitrosti $0,85 \text{ h}^{-1}$.

4.4.2 Kontinuirno gojenje bakterije

Kontinuirni sistem je sestavljen iz dveh zaporedno vezanih kemostatov. K prvotni posodi (Posoda 1), v kateri smo vodili kemostat, smo dodali še eno posodo, ki smo jo poimenovali druga posoda (Posoda 2). Slednja je namenjena gojenju fagov. Najprej smo naredili poskus, s katerim smo želeli preveriti, kako raste bakterija v kontinuirnem sistemu brez dodanih bakeriofagov. V Posodi 1 smo začeli šaržni proces za gojenje bakterije. Po uri in pol smo začeli voditi kemostat. Po dvournem vodenju, se je absorbanca v kemostatu ustalila, pri vrednosti približno 0,400 (Slika 27A). Druga posoda je bila do zagona kemostata v mirovanju, nato pa smo vklopili prezračevanje in mešanje. Z zagonom kemostata, so celice iz prve posode prehajale v drugo posodo s pretokom 5 ml/min in koncentracijo $4 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$. Po preteku 1,5 h je bila koncentracija celic v drugi posodi enaka nič, nato pa je koncentracija celic postopno narašča do vrednosti 5, kjer se je počasi ustala (Slika 27B).

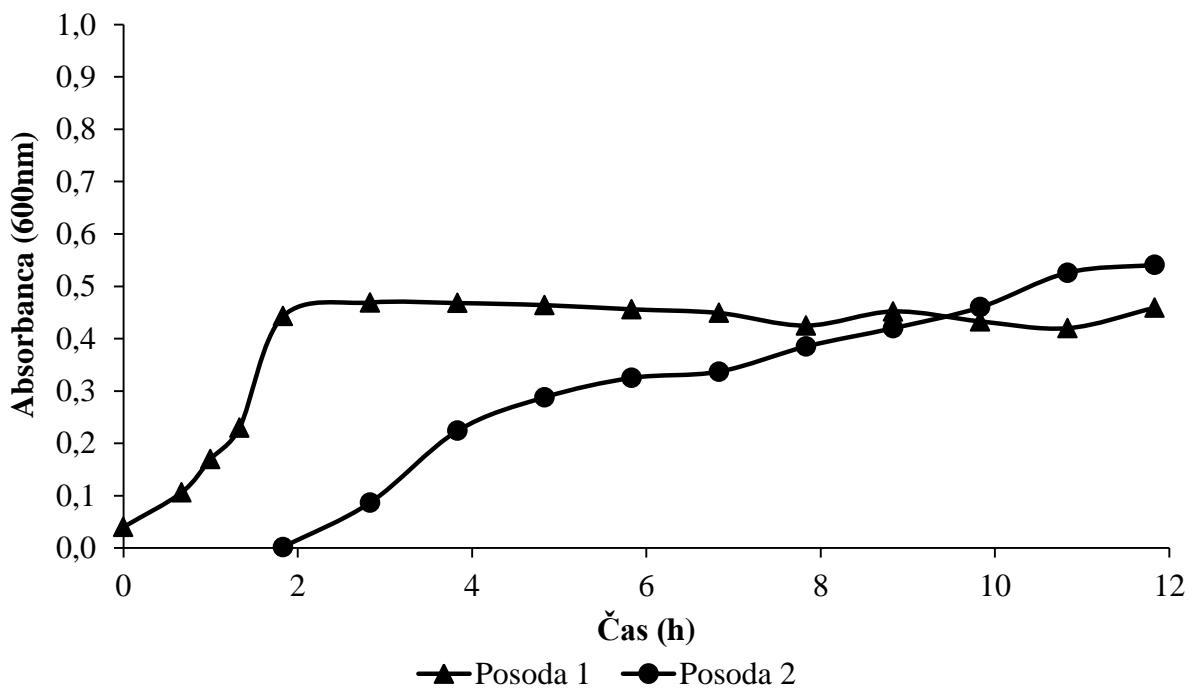


Slika 27: Kapaciteta namnožitve biomase v dvostopenjskem kontinuirnem procesu.

Slika A prikazuje gibanje celične mase (absorbance) po času v prvi posodi. Slika je podobna sliki 23, kjer je prav tako prikazano gojenje bakterije v odprttem sistemu, samo da je v tem primeru iztok iz prve posode predstavlja vok v drugo posodo, kjer je že pripravljeno 350 ml svežega gojišča. Tako slika 27 B prikazuje gibanje celične mase (absorbance) v drugi posodi, kjer je vključeno prezračevanje in hitrejše mešanje kot v posodi 1. Posledično bakterijske celice zrastejo do višje koncentracije, saj se vrednost absorbance ustali šele pri 5 medtem ko je v prvi posodi okoli vrednosti 0,5.

4.4.3 Kontinuirno gojenje bakteriofagov

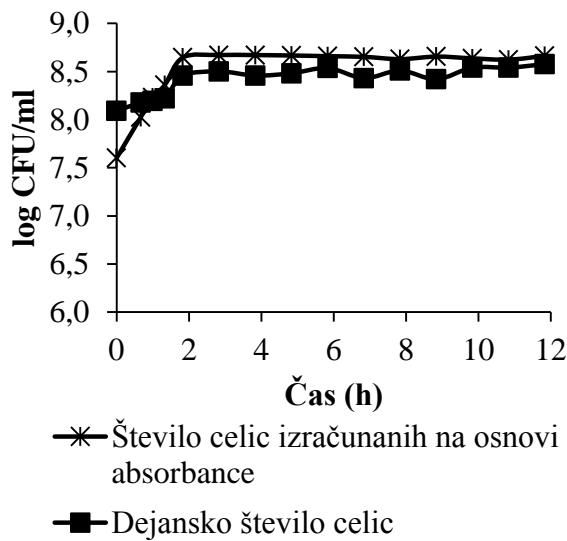
Kontinuirno gojenje bakteriofagov je v osnovi potekalo enako kot kontinuirno gojenje bakterije, le da smo v drugi posodi k gojišču dodali še želeno koncentracijo fagov. Tako so bile bakterijske celice takoj po prihodu v drugo posodo izpostavljene okužbi s fagi. V drugi posodi se absorbanca ustali pri nižjih vrednostih, kot pri kontinuirnem gojenju bakterije. Absorbanca se v posodi 1 ustali nekje med vrednostjo 0,4 in 0,5. Po dveh urah gojenja bakterije v prvi bioreaktorski posodi, pričnemo z zagonom obeh kemostatov in tako prečrpavamo bioprosesno brozgo iz posode 1 v posodo 2. Absorbanca nato počasi narašča in šele po 12ih urah gojenja celo preraste absorbanco v prvi posodi (Slika 28).



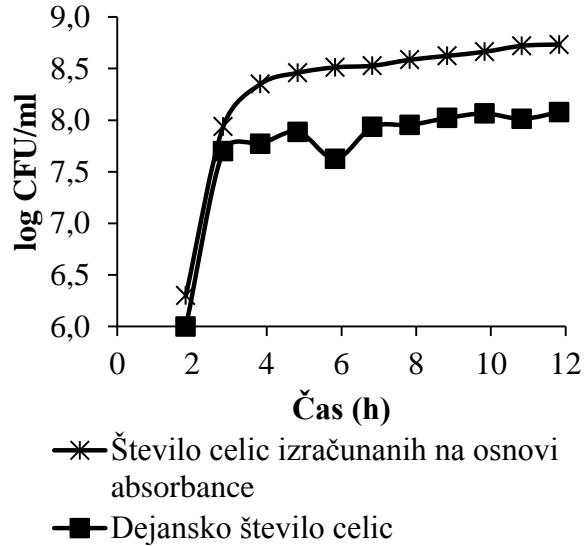
Slika 28: Gibanja celične biomase v dvostopenjskem kontinuirnem sistemu tekom gojenja bakteriofagov. V posodi 1 poteka šaržno gojenje celične biomase do vrednosti absorbance 0,450, nato pa sledi zagon kontinuirnega procesa – kemostata, ki povzroči, da se koncentracija celic ustali. Iztok iz posode 1 predstavlja vtok v posodo 2, kjer so v gojišču prisotni tudi bakteriofagi. Celična biomasa počasi narašča in se ustali pri vrednosti absorbance 0,600.

Na sliki 29 so prikazane dejanske koncentracije celic (A) in koncentracije izračunane iz enačbe premice na osnovi absorbance (B). Absorbanca ustali pri vrednosti 0,500, kar je po izračuni iz enačbe premice približno 5×10^8 celic/ml. Vrednost zelo malo odstopa od dejanske vrednosti, ki smo jo pridobili s štetjem kolonij na trdem agarju in znaša približno 4×10^8 celic/ml (Slika 29A). Slika 29B nam prikazuje dejansko koncentracijo celic in koncentracijo celic izračunanih na osnovi absorbance v posodi 2. Absorbance v drugi posodi se ustali pri vrednosti višji od 0,6. Po izračunu iz enačbe premice, bi pričakovali, da je koncentracija bakterij v bioprosesni brozgi 6×10^8 celic/ml. Dejansko število celic v posodi dve se ustali pri 1×10^8 celic/ml, kar pomeni da nam absorbanca v posodi 2 ne poda realnega števila celic. Pri gojenju bakterijskih celic v šaržnem procesu smo ocenili, da ima 1×10^8 liziranih celic/ml absorbanco približno 0,03. V posodi 2 se absorbanca ustali pri 0,6. Pri tej vrednosti je v bioprosesni brozgi približno 1×10^8 živih celic/ml ter 3×10^8 liziranih celic/ml. Žive celice imajo absorbanco 0,1, kar pomeni, da je absorbanca liziranih celic 0,500. Tako ima v kontinuirnem gojenju 1×10^8 liziranih celic/ml absorbanco 0,160, kar pomeni petkrat večjo absorbanco, kot enaka koncentracija liziranih celic v šaržnem procesu.

A)



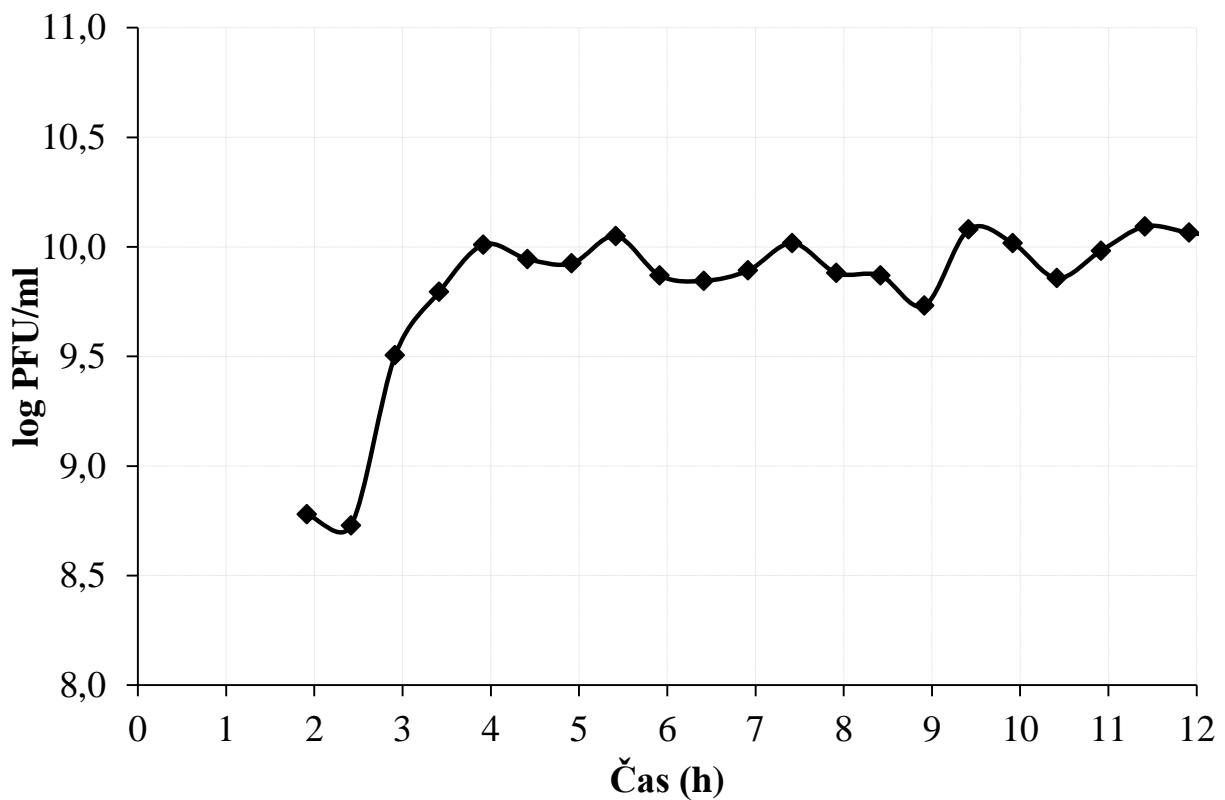
B)



Slika 29: Primerjava števila celic na ml v dvostopenjskem kontinuirnem sistemu tekom gojenja bakteriofagov in sicer v posodi 1 (A) in posodi 2 (B).

Število celic smo pridobili na podlagi absorbance z izračunom iz enačbe premice umeritvene krivulje in z metodo štetja kolonij na trdih ploščah. Slika 29A prikazuje skladnost med metodama določanja števila celic v posodi 1. Slika 29B prikazuje odstopanje med metodama v posodi 2, kjer so prisotni tudi bakteriofagi.

Začetna koncentracija bakteriofagov v drugi posodi je bila 8,8 log PFU/ml. V dveh urah po začetku vodenja kontinuirnega sistema se koncentracija fagov zviša na 10 log PFU/ml in se nato giblje okoli te vrednosti do konca procesa (KP 1) (Slika 30).



Slika 30: Gibanje koncentracije bakteriofagov v kontinuirnem procesu 1 (KP1) v posodi 2.

Proces smo začeli kot zaprt proces in sicer v posodi 1. Ko so bakterijske celice ob času 1,9 zrastle do vrednosti absorbance 0,400 smo pričeli z vodenjem kemostata v posodi 1 in posodi 2. Kontinuirjen bioprocess smo vodili pri 37 °C in razredčevalni hitrosti 0,85 h⁻¹.

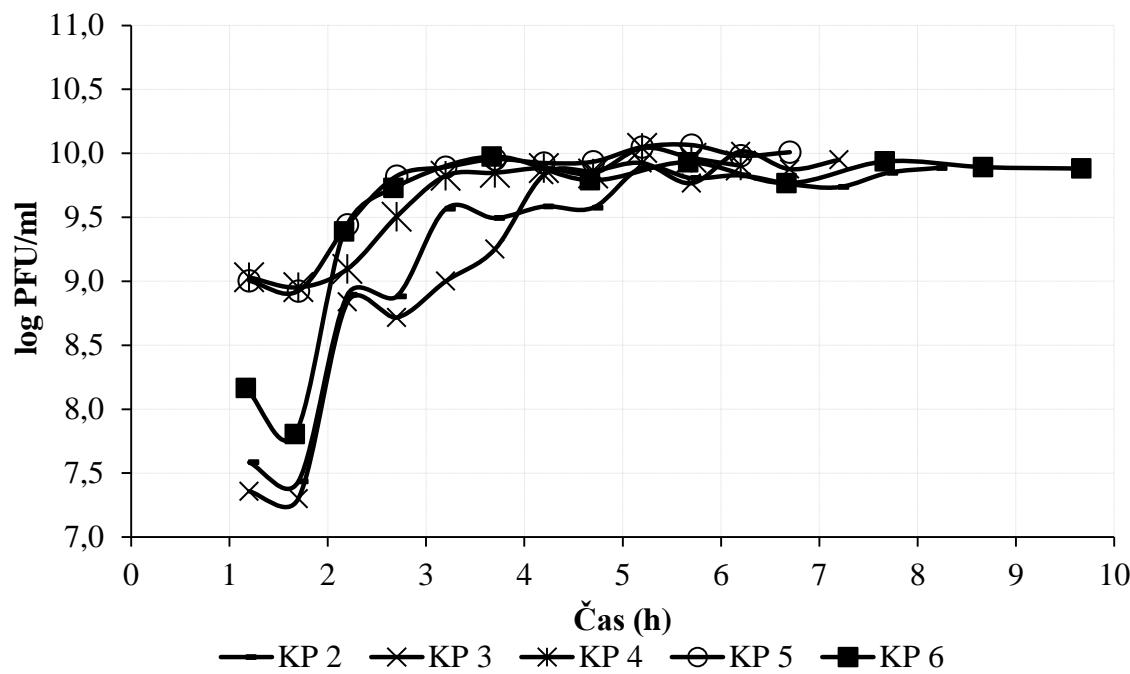
Na začetku kontinuirnega procesa smo v posodo 2 z vtokom prinašali celice, kjer so bile izpostavljene infekciji s fagi. Vse celice niso bile inficirane, ter so se z iztokom odstranjevale iz posode 2. Število živih celic se je v iztoku iz posode dve povečevalo in se počasi ustalilo pri vrednosti 1×10^8 celic/ml. Ker smo v posodo 2 konstantno dovajali enako število bakterijskih celic, lahko izračunamo, da približno 70 % celic, ki so prišle v drugo posodo, lizira. Ocenimo lahko tudi število novo nastalih fagov na eno celico. Po ustalitvi procesa lizira približno 3×10^8 celic/ml in pri tem se sprosti v povprečju $8,7 \times 10^9$ PFU/ml, kar pomeni, da se pri lizi celic sprosti v povprečju 30 fagov. Na začetku vodenja kontinuirnega procesa je v iztoku iz druge posode delež liziranih bakterij zelo visok in sčasoma pada ter se ustali, kot smo že omenili pri približno 75 % liziranih celic. Razlika je posledica med začetnim in ravnotežnim stanjem. Tako imamo v ustaljenih pogojih približno 25 % celic, ki so se okužbi izognile (Preglednica 12).

Preglednica 12: Izračun števila liziranih celic in novo nastalih fagov na podlagi eksperimentalnih podatkov pridobljenih tekom poskusa kontinuirni proces 1.

Čas (h)	MOI	Število liziranih celic (celic/ml $\times 10^8$)	Odstotek liziranih celic (%)	Število pomnoženih fagov na bakterijsko celico
1,8	1,4	/	/	/
2,8	15,4	4,2	89,3	17,2
3,8	21,9	4,1	87,4	25,0
4,8	18,1	3,9	83,4	21,7
5,8	16,2	4,1	90,7	17,9
6,8	17,4	3,6	80,8	21,5
7,8	17,9	3,4	78,8	22,7
8,8	11,9	3,5	76,8	15,6
9,8	24,0	3,2	73,2	32,8
10,8	22,9	3,2	75,5	30,3
11,8	25,3	3,4	73,9	34,2

4.4.4 Poskus povišanja koncentracije fagov v iztoku iz kontinuirnega sistema

Po uspešni postavitevi kontinuirnega sistema smo poskušali izboljšati produktivnost le-tega. Slika 31 nam prikazuje koncentracijo fagov po času v različnih kontinuirnih procesih (KP). V KP 2 in KP 3 smo imeli nižjo začetno koncentracijo fagov v posodi 2 in sicer 7,5 log PFU/ml. Opazna sta dva cikla pomnoževanja fagov, prvi po 45 min, drugi pa po 90 min vodenja kontinuirnega sistema, kar sovpada z rezultati iz gojenja bakteriofagov v šaržnem procesu. Koncentracija fagov se ustali pri vrednosti 9,6 log CFU/ml, kar znaša približno 6×10^9 CFU/ml. V KP 4 smo začeli z višjo začetno koncentracijo fagov in sicer 9,0 log PFU/ml. V tem primeru je opazen samo en cikel pomnožitve fagov, nato pa se koncentracija ustali na vrednosti 9,6 log PFU/ml. V KP 5 smo spremenili pogoje gojenja bakterijske kulture v posodi 1 tako, da smo kemostat vodili pri višji koncentraciji celic. Absorbanca se je ustalila okoli vrednosti 3,0. Tako je v posodo 2 prihajala večja koncentracija živih celic, s čimer je bilo na voljo več substrata za fage. Proses smo začeli z enako začetno koncentracijo fagov kot v KP 4 in tudi končna koncentracija fagov se ustali na približno enaki vrednosti, in sicer pri 9,7 log PFU/ml. V KP 6 smo volumen gojišča v posodi 2 zvišali iz 350 ml na 700 ml. Pretok sistema je ostal enak, kar je povisalo teoretični zadrževalni čas iz 70 min na 140 min. Začetna koncentracija fagov v posodi 2 je bila 8,1 log PFU/ml in se je po 2 h vodenja kontinuirnega sistema ustalila na vrednosti 9,8 log PFU/ml. Ustaljena koncentracija fagov, je povprečje vseh vrednostih, ki se med sabo ne razlikujejo za več kot 1 log PFU/ml.



Slika 31: Primerjava gibanje koncentracije bakteriofagov v kontinuirnih procesih (KP) 2, 3, 4, 5 in 6 v katerih so bilo določeni parametri različni od parametrov gojenja v KP1 (glej pregl. 13).

Preglednica 13: Podatki o začetni in ustaljeni koncentraciji bakteriofagov v kontinuirnih procesih 1,2,3,4,5 in 6, ter spremembe v gojenju, s katerimi smo poskušali povišati končno koncentracijo fagov.

Kontinuirni proces (KP)	Začetna koncentracija fagov (log PFU/ml)	Poskus povišanja koncentracije fagov	Koncentracija fagov (log PFU/ml) v ustaljenem delu procesa
1	8,8	/	10,0
2	7,5	Nižja začetna koncentracija fagov v posodi 2	9,7
3	7,5	Nižja začetna koncentracija fagov v posodi 2	9,5
4	9,0	Višja začetna koncentracija fagov v posodi 2	9,6
5	9,0	Višja koncentracija celic v vtoku v posodo 2	9,7
6	8,1	Večji zadrževalni čas v posodi 2	9,8

4.4.5 Primerjava produktivnosti šaržnega in kontinuirnega procesa

Končna koncentracija bakteriofagov v 350 ml bioprosesne brozge v šaržnem procesu je v povprečju $4,0 \times 10^{10}$ PFU/ml. Za en šaržni proces potrebujemo 8 ur oziroma en dan. Torej bi v enem tednu (5 dni) naredili $7,0 \times 10^{13}$ fagov/teden. V kontinuirnem procesu je končni titer fagov 1×10^{10} PFU/ml. Za postavitev kontinuirnega procesa potrebujemo 3 ure, nato pa lahko proces teče cel teden. Tako bi v enem tednu naredili $5,0 \times 10^{14}$ fagov/teden. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je produktivnost kontinuirnega procesa šestkrat višja od produktivnosti šaržnega procesa.

5 RAZPRAVA

Tekom praktičnega dela magistrske naloge smo poskušali postaviti dvofazni sistem za gojenje bakterij in bakteriofagov. Za uspešno postavitev takšnega sistema je bilo najprej potrebno dobro okarakterizirati bakterijsko kulturo in kulturo bakteriofagov. Po uspešni postavitevi kontinuirnega sistema smo poskušali še povišati koncentracijo bakteriofagov v iztoku iz kontinuirnega sistema.

5.1 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE NA STRESALNIKU

Eksperimentalno delo smo začeli z gojenjem na stresalniku. Gjenje na stresalniku je prva pomembna stopnja pri postavitev procesa. Je del pripravljalnih procesov, v katerih pripravimo bakterijsko kulturo za uporabo v večjem merilu (Smole Možina, 1996). Bakterijsko kulturo, vzgojeno na stresalniku smo uporabili kot vcepek za šaržno in kontinuirno gojenje bakteriofagov. Količina vcepka in stanje bakterij v vcepku vpliva na trajanje prilagoditvene oz. lag faze. Po definiciji je lag faza čas, ki je potreben, da se celice prilagodijo na novo okolje. Trajanje lag faze pa je odvisno od kondicije bakterij v vcepku. Najkrajšo lag fazo dosežemo z dodatkom vcepka, ki vsebuje bakterije v eksponentni fazi rasti (Madigan in sod., 2009). Z gojenjem na stresalniku smo ugotovili, da bakterija preide v eksponentno fazo rasti po 100 min gojenja in čez 100 min vstopi v stacionarno fazo rasti (Slika 8). Tako dolga lag faza je zaradi prilagajanja bakterijske kulture, saj je bila shranjena v 20 % glicerolu in zamrznjena. Za doseganje čim krajše lag faze bi morali za vcepek uporabiti kulturo z $OD_{600\text{nm}}$ med 0,4 in 1,4 (Slika 8). Po prehodu v eksponentno fazo rasti celice rastejo s $\mu_{\text{max}} 1,12 \text{ h}^{-1}$ (Slika 9).

5.2 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE V BIOREAKTORJU

Pri šaržnem gojenju bakterije v bioreaktorju opazimo krajšo lag fazo kot pri gojenju na stresalniku. Vzrok je v fiziološkem stanju bakterij v vcepku. Kot smo že omenili, smo za vcepek pri gojenju kulture na stresalniku uporabljali v glicerolu zamrznjeno bakterijsko kulturo. Vcepek za gojenje kulture v bioreaktorju smo si pripravili stopenjsko, in sicer smo najprej kulturo gojili na stresalniku čez noč, nato pa še svežo uporabili za nacepitev gojišča v bioreaktorju. Bakterije so bile po gojenju čez noč že v stacionarni fazni rasti, zato je še vedno bila opazna krajša lag faza (Slika 10). S povečanjem količine dodanega vcepka samo povečamo začetno populacijo v lag fazi in ne vplivamo na trajanje le-te (Robinson in sod., 2001; Mackey in Kerridge, 1988). Po prehodu v eksponentno fazu rasti celice rastejo s specifično hitrostjo rasti $1,24 \text{ h}^{-1}$ (Slika 11). Tako se celice delijo približno dvakrat na uro. Specifična hitrost rasti je višja, kot pri gojenju na stresalniku, saj imajo celice v bioreaktorju boljše pogoje za rast. Visoka korelacija med koncentracijo živilih celic in absorbancijo, nam je omogočila, da smo lahko v nadalnjih poskusih na podlagi absorbance sklepali o številu živilih celic ter o fazni rasti celic. S pomočjo enačbe premice smo vrednost absorbance preračunali v število celic/ml. Tako je bila pri absorbanci 0,8 v bioprosesni

brozgi približno 8×10^8 celic/ml (Slika 12). Schaechter in sod. (1958) so pri isti vrednosti absorbance določili število živih celic med $1,2 - 6,2 \times 10^8$ celic/ml.

V naslednjem koraku nas je zanimalo, ali je bil kisik limitni faktor pri šaržnem gojenju bakterije v bioreaktorju. Slika 13, ki prikazuje spremembo parcialnega tlaka kisika tekom gojenja, potrdi predvidevanja, da je kisik limitni faktor, ki povzroči, da se rast celic ustavi. Največja poraba kisika (ang. Oxygen consumption rate) je v pozni eksponentni fazи, kjer celice rastejo najhitreje. Wilson in sod. (2003) so določili, da se za eno celico porabi 19×10^{-15} mol kisika. S pomočjo tega podatka lahko izračunamo, da se porabi $0,5-1,2$ g kisika /g biomase ($Y_{O_2/X}$). Raztpljanje kisika v tekoči fazи je zaradi nizke topnosti kisika v vodi problematično. Z večjim vnosom moči lahko zagotovimo boljše raztpljanje kisika in s tem učinkovitost bioreaktorja (Koloini, 1996). Volumetrični koeficient snovnega prestopa kisika (k_L) je bil v naši bioreaktorski posodi $0,383 \text{ min}^{-1}$ oz. $22,9 \text{ h}^{-1}$. S povečanjem hitrosti mešanja, bi lahko še izboljšali raztpljanje kisika, vendar je mešalo že obratovalo pri najvišji hitrosti. Tako bi lahko k_L izboljšali še z večjo intenziteto prepihanja. Na k_L bolj vplivamo z večjim vnosom moči, kot pa z večjo intenziteto prepihanja, še posebej v bioreaktorjih z večjimi volumeni (Moutafchieva in sod., 2013).

5.3 ŠARŽNO GOJENJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU

Poskusi gojenja bakteriofagov v šaržnem procesu so potekali tako, da smo različne koncentracije celic poskušali inficirati z različnimi koncentracijami bakteriofagov. MOI smo določili na predpostavki, da en fag inficira eno bakterijsko celico. V literaturi najdemo podatke o pojavu imenovanem superinfekcija oziroma sekundarna adsorpcija, kar pomeni, da se lahko na že okuženo bakterijsko celico veže še en fag, ki lahko, ni pa nujno, vanjo injicira svoj dedni material. Če pride tudi do injiciranja dednega materiala v celico, se sekundarna adsorpcija razvije v superinfekcijo (Doreman, 1948; Blasdel in Abedon 2013). S konstantno adsorpcijo podamo verjetnost, da se en fag adsorbira na eno bakterijsko celico in se prikazuje kot enota volumna na časovno enoto (ml/min). Fag SF28 ima konstantno adsorpcije 4×10^{-9} ml/min. Po adsorpciji sledi injiciranje fagnega dednega materiala v bakterijsko celico. Število novo nastalih fagov je odvisno od fiziološkega stanja bakterije in od informacij, ki jih s sabo prinese fagna DNA (Gadagkar in Gopinathan, 1980; Calsina in sod., 2011). Pri absorbanci 0,5 so bakterijske celice v eksponentni fazи rasti, torej so v dobrem fiziološkem stanju, zato je to tudi primeren čas za infekcijo s fagi. Tako smo najprej določili čas, ki ga fag potrebuje, da bakterijo inficira, se v njen namnoži in jo lizira. V poskusu A smo celice inficirali z MOI 1, kar pomeni, da se je po upoštevanju Poissonove porazdelitve okužilo 63,2 % celic. Na sliki 14 lahko opazimo, da je bil okužen velik odstotek celic, saj koncentracija živih celic v bioprocesni brozgi začne padati 40 min po infekciji, število novo nastalih fagov pa naraščati. Fag potrebuje 45 min, da se namnoži. Pri poskusih A, B in C (Slika 18) smo pri absorbanci 0,5 inficirali bakterije z različnimi titri fagov. Najvišji titer smo sicer dosegli v poskusu C, kjer smo imeli najnižji MOI. To pomeni, da so v prvem ciklu lahko teoretično vsi dodani fagi okužili celico, neokužene

celice pa so rasle naprej, kar se odraža tudi v rasti absorbance (Slika 18B). Del neokuženih celic v prvem ciklu, je bilo inficiranih v drugem ciklu. Na začetku tretjega cikla je koncentracija fagov višja od koncentracije živih celic, kar pomeni da se večina celic inficira in njihova rast se ustavi. Končna koncentracija fagov v poskusu C, ni bila veliko višja, kot v poskusu B, kjer smo imeli MOI 0,1. Fag je v poskusu B potreboval dva cikla, da je uničil vse bakterije, ki so bile dovzetne za okužbo. Rast bakterijskih celic se ustavi 75 min po infekciji in po 90 min gojenja že dosežemo končno koncentracijo fagov (Slika 16). To potrjuje ugotovitev, da je trajanje življenjski cikel faga 45 min. Calsina in sod. (2011) navajajo, da lahko latentna perioda traja samo 15 min, kar so opazili pri fagu C78 *S.enterica*. Favrin in sod. (2001), Goodridge in sod. (2003) ter Carey Smith in sod. (2006) navajajo čas latentne periode med 38 – 52 min. Čas trajanja latentne periode je odvisen od fiziološkega stanja bakterije. Fagi, ki inficirajo bakterije v eksponentni fazji rasti imajo krajši cikel pomnoževanja, kot fagi iste vrste, ki so inficirali bakterije v stacionarni fazji rasti. Tako lahko latentna perioda traja samo 5 min ali pa tudi do 2 ur (Asami in sod., 1997).

S poskusom E smo potrdili pridobljene rezultate pri poskusu B. Poskus E predstavlja ponovitev poskusa B, saj smo v obeh primerih celice inficirali, ko je celična masa dosegla vrednost absorbance 0,500, z enako koncentracijo bakteriofagov. Koncentracija bakteriofagov na koncu procesa je bila v poskusih B in E enaka. V poskusih D, E in F smo celice inficirali z enako koncentracijo bakteriofagov. V poskusu D smo bakterijske celice inficirali že pri vrednosti absorbance 0,100. V poskusu F smo neuspešno poskušali doseči višji končni titer z infekcijo bakterijskih celic pri absorbanci 0,900. V poskusu D je bilo v času infekcije manj celic kot pri poskusu E in F. Zato je bil večji del celic okuženih že v prvem ciklu. Za razliko od poskusa E in F, kjer je bilo razmerje med številom fagov in številom bakterijskih celic nižje in posledično večji delež neinficiranih celic prvem ciklu. Po Poissonovi porazdelitvi je bilo v poskusu E v prvem ciklu inficiranih celic 9,5 %, v poskusu F pa 4,9 %. Potez prvega cikla v poskusih E in F je skoraj identičen (Slika 19A). V drugem ciklu pa pride do razhajanju, saj je v poskusu F za okužbo na voljo veliko več celic, kot v poskusu E. Trditev potrjuje višja absorbanca v poskusu F (Slika 19B). Najvišja koncentracija je bila dosežena v poskusu E. Zaključimo lahko, da je optimalen čas infekcije pri vrednosti absorbance 0,500 s koncentracijo fagov 5×10^7 PFU/ml (MOI = 0,1). Gadagkar in Gopinathan (1980) navajata, da obstaja korelacija med številom novo nastalih fagov in MOI vrednosti. Večja kot je začetna MOI večje je število novo nastalih fagov. Tako je tudi v primeru F bila vrednost MOI manjša, kar bi se lahko održalo v nižji končni koncentraciji fagov. Na začetku drugega cikla v poskusu F je absorbanca narastla že na 2,5 kar pomeni, da je v biopresesni brozgi že zelo velika koncentracija celic, ki je obdana z ostanki liziranih celic iz prvega cikla in novo nastalih fagov. Verjetno je, da v tem času celice niso več v dobrem fiziološkem stanju in preidejo v stacionarno fazo. Tako niso več primerne za infekcijo in koncentracija fagov se ustali (Asami in sod., 1997).

Padcu absorbance sledi ustalitev, kar pomeni, da je proces pomnoževanja fagov končan. Vrednost absorbance je bila tekom poskusov merilo za število živih celic v bioprosesni brozgi. S spremeljanjem števila živih celic z metodo štetja kolonij na trdem agarju smo preverili, koliko je dejansko živih celic v bioprosesni brozgi po končanem gojenju fagov. Slika 15, ki prikazuje CFU/ml tekom gojenja v šaržnem procesu, nakazuje, da je na koncu procesa še vedno $8 \log \text{CFU}/\text{ml}$. Absorbanca se je ustalila pri vrednosti 0,450, kar po izračunu iz enačbe premice znaša $8,6 \log \text{CFU}/\text{ml}$. To pomeni, da je dejansko 75 % manj živih celic, kot bi jih bilo, če bi upoštevali enačbo premice. Rezultat pove, da je za določanje števila živih celic v bioprosesni brozgi, enačba premice neuporabna. V bioprosesni brozgi niso več samo rastoče bakterije, ampak so prisotni še fagi in ostanki celic po lizi bakterij. Glede na to, da so fagi premajhni, da bi prispevali k motnosti, je tako lahko ta samo še posledica ostankov bakterijskih celic. Asami in sod. (1997) so potrdili, da je motnost, ki ostane po lizi celic, posledica celičnih ostankov. Na koncu procesa so v bioprosesni brozgi še vedno prisotne žive bakterijske celice, katerih koncentracija je ustaljena. Če bi bile odporne na infekcijo bi se naprej pomnoževale, kar bi se odražalo v dvigu absorbance. Izračunali smo, da ima $1,4 \times 10^9$ liziranih celic/ml vrednost absorbance približno 0,350.

Število novo nastalih fagov na inficirano bakterijsko celico ni bilo konstantno, saj se je gibalo med 30 in 100 pri različnih MOI. Pri MOI 0,001 smo dosegli najviše število pomnoženih fagov na celico. Na začetku poskusa C je bilo inficiranih približno 0,1 % celic in po Poisonovi porazdelitvi to pomeni, da se je na vse inficirane celice adsorbiral samo 1 fag. Tako so se vsi fagi porabili za namnožitev novih fagov. Iz števila celic, ki so bile inficirane in števila fagov po končanem ciklu fagov smo izračunali, da je število pomnoženih fagov na celico 100. Carey-Smith in sod. (2006) so določili, da fag, ki inficira *S. enteritidis*, naredi 139 novih fagov v eni inficirani celici. Fag Φ st1, ki je specifičen za *S. typhimurium*, ima vrednost pomnoževanja samo 22. Število pomnoženih fagov na bakterijsko celico je močno odvisno od medija, temperature in pH vrednosti gojišča ter specifične hitrosti rasti mikroorganizma (Wong in sod., 2014). Pri višjih MOI je število pomnoženih fagov na celico nižje (Slika 21). Z večanjem razmerja koncentracije fagov in koncentracije celic se povečuje verjetnost večkratne infekcije ene celice oziroma, se zmanjša izkoristek fagov, saj je več fagov adsorbiranih na eno bakterijsko celico. Trdimo lahko, da je število pomnoženih fagov na celico uporabljene bakterijske kulture približno 100. V preglednici 8 smo predstavili povprečno število pomnoženih fagov na celico, ki upošteva, da je bilo na bakterijsko celico adsorbiranih več fagov. Večja kot je vrednost MOI slabši bo izkoristek fagov.

Koncentracija kisika se na začetku procesa giblje enako kot pri gojenju bakterije v šaržnem (Sliki 13 in 22). Po infekciji se rast bakterij upočasni, kar opazimo na osnovi gibanja krivulje absorbance in koncentracije raztopljenega kisika. Sproščanje fagov iz celice povzroči lizo celic, kar se odraži v padcu absorbance in dvigu koncentracije kisika, saj ni več živih celic, ki bi ga porabljale. Spremljanje koncentracije raztopljenega kisika bi lahko

bil parameter za spremljanje cikla fagov. Zaletel (2013) je s spremljanjem deleža parcialnega tlaka kisika preko pO_2 elektrode spremljala rast *Campylobacter jejuni* ter ugotovila, da se lahko s sledenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika napove čas lize bakterijskih celic in s tem sprostitev bakteriofagov. Glede na rezultate merjenj (glej sliki 13 in 22) bi lahko tudi v našem primeru spremljali rast bakterije in fagov na podlagi sprememb v koncentraciji raztopljenega kisika.

5.4 KONTINUIRNO GOJENJE

Kontinuirni sistem je bil sestavljen iz dveh bioreaktorskih posod, kjer je v prvi posodi potekalo kontinuirno gojenje bakterije v drugi posodi pa je potekala kontinuirna proizvodnja bakteriofagov. Bioreaktorski posodi sta bili med seboj povezani s konstantnim pretokom. Husimi in sod. (1981) so razvili popolnoma kontinuirni proces, ki je prav tako sestavljen iz dveh bioreaktorskih posod. Prva je turbidostat, v katerem se bakterijske celice pomnožujejo in predstavlja konstantno proizvodnjo »substrata« za bakteriofage. Te s določenim pretokom prehajajo v drugo, kjer se bakterijske celice inficirajo. S pomočjo postavljenega procesa so preučevali mutacije in selekcijske procese bakteriofagov. S kontinuirnim sistemom so zagotovili konstantne pogoje, ki niso imeli bistvenega vpliva na genetske spremembe bakteriofagov. Sauvageau in Cooper (2010) sta tudi postavila dvostopenjski proces za proizvodnjo bakteriofagov, ki je prav tako vseboval dve bioreaktorski posodi, v katerem je bila prva namenjena gojenju bakterije, druga pa proizvodnji bakteriofagov, vendar pa njun proces ni bil kontinuirni.

5.4.1 Kemostat

V postavljenem kontinuirnem sistemu smo v obeh bioreaktorskih posodah vodili kemostat. Najprej je bilo potrebno vzpostaviti kontinuirno gojenje bakterije v kemostatu, saj bakterije prestavljajo substrat za fage v drugi bioreaktorski posodi. Kontinuirno gojenje bakterije je potekalo v prvi posodi. Proces smo pričeli, kot šaržni proces in po približno dveh urah vklopili zagon kemostata (Slika 23). V tem času so celice že prešle iz lag faze v eksponentno fazo rasti. Po zagonu kemostata koncentracija celic še narašča in se po dveh urah ustali. Z limitacijo s kisikom smo omejili rast bakterij v visokih koncentracijah. Poskus je potekal tako, da smo v prvi bioreaktorski posodi izklopili prezračevanje in mešanje zmanjšali na 60 obr/min. Tako se je koncentracija celic v kemostatu ustalila zaradi pomanjkanja kisika in ne hranil (Slika 26). Z vodenjem kemostata smo zagotovili konstantno koncentracijo 5×10^8 celic/ml, ki so se s pretokom 5 ml/min odstranjevale iz bioreaktorske posode. Kot smo že omenili, je iztok iz prve posode dejansko vtok v drugo posodo, v kateri smo prav tako vodili kemostat. V iztoku iz prve bioreaktorske posode so bakterijske celice in gojišče, ki vsebuje še dovolj hranil, vendar mu primanjkuje kisika. Po prihodu v drugo bioreaktorsko posodo so celice izpostavljene drugačnemu okolju. Zaradi intenzivnega prezračevanja in mešanja imajo na voljo dovolj kisika za nadaljnjo razmnoževanje. Tako so po prihodu v drugo posodo še vedno v dobrem fiziološkem stanju

in pripravljene za infekcijo s fagi. Dunkley in sod. (2009) so raziskovali vpliv razredčevalne hitrosti na izkoristek glukoze in spremembe v metabolizmu *S. enterica* setotipu Typhimurium. Kontinuirni proces so vodili pod anaerobnimi pogoji, pri 39 °C in pri D vrednostih med $0,0125 \text{ h}^{-1}$ in $1,44 \text{ h}^{-1}$. Ugotovili so, da je največji izkoristek glukoze za proizvodnjo proteinov pri D med $0,025 \text{ h}^{-1}$ in $0,54 \text{ h}^{-1}$. Razredčevalna hitrost ne sme biti višja ali enaka kritični razredčevalni hitrosti, ker tvegamo izgubo celic iz kemostata in posledično nestabilen proces.

Problem pri uporabi kemostata je pojav rezistence bakterije na infekcijo s fagom. Mizoguchi in sod. (2003) so z gojenjem bakterije in bakterofaga v kemostatu spremljali koevolucijo le teh. Ugotovili so, da se tekom gojenja pojavi na fag odporna bakterija, kar se kaže v povišani koncentraciji bakterijske kulture. Prav tako so se tekom gojenja v kemostatu pojavili mutirani fagi, ki so inficirali mutirane bakterije.

5.4.2 Kontinuirno gojenje bakterije

V primeru kontinuirnega gojenja bakterije, v kontinuirni sistem nismo dodali bakteriofagov, saj smo žeeli preveriti, kje se ustali absorbanca, če fagi niso prisotni. Poskus je pokazal, da je v posodi 2 večja gostota celic kot v posodi 1. V prvo posodo dovajamo sveže gojišče, v drugo pa bioprosesno brozgo iz prve, ki ima že določeno motnost. Koncentracija celic v prvi posodi se ustali, kar je bilo po pričakovanjih, glede na rezultate vodenja kemostata. V drugi posodi smo tudi vodili kemostat, je vtok dejansko iztok iz prve posode, torej celice ki se namnožijo v prvi posodi pripeljemo v drugo. V slednji imajo celice boljše pogoje za rast in razmnoževanje zaradi dodanega prezračevanja in hitrejšega mešanja. Tako so celice po prihodu v drugo posodo še naprej v dobri kondiciji. Posledično se absorbanca v drugi posodi ustali pri višjih vrednostih, kot v prvi posodi, kar ponovno dokazuje, da je v prvem bioreaktorju kisik limitni substrat. Od začetka koncentracija celic počasi narašča, kar je lahko posledica odnašanja biomase z iztokom iz posode 2. Teoretični zadrževalni čas celic v posodi je 70 min (Slika 27).

5.4.3 Kontinuirno gojenje bakteriofagov

Za razliko od kontinuirnega gojenja bakterije, smo pri kontinuirnem gojenju fagov v posodo 2 že na začetku procesa dodali fage. Ti so povzročili infekcijo in lizo bakterij, saj absorbanca v posodi 2 ni naraščala tako kot pri kontinuirnem gojenju bakterije, ampak se je ustalila pri nižjih vrednostih. Absorbanca v posodi 2 lahko tudi preraste absorbanco v posodi 1 (Slika 28). Razlog bi lahko bil v pojavu mutiranih bakterij rezistentnih na infekcijo, ki bi razmnoževale. Vzrok je lahko tudi okužba z drugo bakterijsko vrsto, ki je odporna na okužbo z danim bakteriofagom. Počasna rast absorbance je lahko tudi posledica nakopičenja ostankov celic, ki nastanejo po lizi. Tudi pri gojenju v šaržnem procesu smo opazili, da je del absorbance povzročajo ostanki celic (Slika 21). S spremljanjem CFU/ml v obeh kemostatih smo ugotovili, da imamo v posodi 1 in 2 približno enako vrednost absorbance, vendar je dejansko število živih celic v drugi posodi

za 70 % manjše. To je še ena potrditev, da vrednost absorbance v drugi posodi poda zavajajoč podatek o številu živih celic.

Kontinuirna proizvodnja fagov je potekala v posodi 2. Koncentracija fagov je bila na začetku vodenja kemostata 8,8 log PFU/ml. To je bilo dovolj, da se je lahko večina bakterijskih celic inficiralo takoj po vstopu v posodo 2. Zadrževalni čas v drugi posodi je bil prav tako 70 min. V tem času sta potekla dva cikla namnožitve fagov, saj kot smo videli pri gojenju fagov v šaržnem procesu, prva sprostitev fagov iz celic poteče po 30 min in druga po 60 min gojenja. Z zadrževalnim časom 70 min smo fagom omogočili dovolj časa, da so se namnožili in s tem preprečili izgubljanje le-teh z iztokom. Tudi pri kontinuirnem gojenju smo pred ustalitvijo procesa opazili cikle pomnoževanja fagov (Slika 31). Koncentracija fagov v drugi posodi in koncentracija celic v prvi posodi se je ustalila, kar je posledica vodenja kemostata v obeh posodah. Če primerjamo grafa na sliki 28 in sliki 30 lahko ugotovimo, da se je v obeh posodah koncentracija bakterij oz. fagov ustalila po približno dveh urah vodenja kemostata. Ustaljena koncentracija fagov v iztoku iz posode 2 je bila 10 log PFU/ml. V stacionarnem delu procesa imamo v posodi 2 konstanten vtok in iztok živih celic. Razlika v številu celic v vtoku in iztoku iz posode 2 predstavlja število liziranih celic. Iz števila liziranih celic in števila fagov v iztoku iz posode 2 smo izračunali, da se v poprečju naredi 30 novih fagov na eno lizirano bakterijsko celico. (Preglednica 12).

5.4.4 Poskus povišanja koncentracije fagov v iztoku iz kontinuirnega sistema

Po uspešnem kontinuirnem gojenju fagov, smo poskušali doseči višjo koncentracijo fagov v iztoku iz posode 2. Najprej smo višjo koncentracijo fagov pokusili doseči s povečanjem koncentracije celic v vtoku v posodo 2. Domnevali smo, da bo tako večje število celic inficiranih in več fagov se bo lahko namnožilo. Nato smo na koncentracijo fagov poskušali vplivat s povišanjem volumna v posodi 2. Ker smo pretok ohranili enak se je zadrževalni čas fagov povišal iz 70 min na 140 min. Tako so imeli fagi na voljo več časa razmnoževanje. Izboljševanja produktivnosti procesa smo se lotili tudi s spremnjanjem začetne koncentracije fagov v posodi 2. Graf na sliki 31 nam prikaže, da z nobenim od zgoraj navedenih poskusov nismo uspeli znatno vplivati na končno število fagov v iztoku iz posode 2.

5.4.5 Primerjava produktivnosti šaržnega in kontinuirnega procesa

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da bi s kontinuirnem gojenjem v enem tednu pridobili šestkrat več fagov, kot s šaržnim gojenjem. Sauvageau in Cooper (2010) sta preučevala dvostopenjski proces proizvodnje bakeriofagov v katerem je bila količina prizvedenih fagov sicer enaka količini iz šaržnega procesa, s tem da je dvostopenjski proces produktivnejši, ker se lahko le-teh v enakem časovnem obdobju naredi več. Kot prednost njunega procesa, pred kontinuirnim navajata manjšo možnost koevolucije, kar pomeni, da je manjša možnost za pojav rezistentnih bakterij in fagov. S stališča uporabe

produkta (fagnih pripravkov) v medicini, je koevolucija nezaželena. Problem je v zadrževalnem času. Nekateri fagi bodo bioreaktor zapustili takoj, drugi pa lahko neskončno dolgo ostanejo in se razmnožujejo, kar lahko vodi do pojava koevolucije. Proizvodnja fagov v šaržnem procesu je zato enostavnejša, saj je proces robusten, relativno enostaven in ni problemov z zadrževalnim časom. Slabosti pri kontinuirnem sistemu v primerjavi s šaržnim procesom so ravno nezmožnost ohranjanja stabilnega, konsistentnega sistema, zato je potrebno najti ravnovesje med produkcijo fagov, razredčevalno hitrostjo in gostoto gostujoče populacije. Park in Park (2000) ter Oh in sod. (2005) so v dvostopenjskem kontinuirnem procesu poskušali gojiti *E.coli*, ki vsebuje fagni λ vektor. Sistem je podoben našemu, saj ga sestavlja dve posodi in sicer prva za gojitev bakterije, druga pa je namenjena lizi in produkciji rekombinantnega proteina. Celice so bile v kemostatu stabilne 260 ur. Chen in Cen (2005) sta postavila celo tri stopenjski kontinuirni proces prav tako za produkcijo rekombinantnega proteina s pomočjo fagnega ekspresijskega sistema. Vsi ti kontinuirni procesi so prilagojeni za optimalno pridobivanje rekombinantnih proteinov in ne za produkcijo fagov. Z nadaljnjam raziskovanjem bi lahko poskusili zmanjšati vpliv slabosti kontinuirnega sistema.

6 SKLEPI

- Pred postavitvijo kontinuirnega procesa gojenja bakteriofagov je potrebno dobro okarakterizirat uporabljeno bakterijo in fag.
- Z gojenjem bakterije v šaržnem procesu smo pridobili podatke o generacijskem času, specifični hitrosti rasti in optimalni produktivnosti. S spremeljanjem parcialnega tlaka kisika smo ugotovili, da je kisik limitni faktor pri gojenju bakterije v šaržnem procesu pri danih pogojih. Vsi pridobljeni podatki so pripomogli k uspešni postavitvi kemostata in nato še celotnega kontinuirnega sistema. Z gojenjem bakteriofaga v šaržnem procesu smo pridobili podatke o trajanju latentne periode, številu novo nastalih fagov na celico. Na osnovi pridobljenih rezultatov smo določili optimalen čas in titer infekcije. Tako lahko trdimo, da je za uspešen kontinuirni proces potrebno najprej dobro preučiti delovni organizem.
- Uspešno smo postavili kontinuirni sistem za gojenje bakteriofagov, sestavljen iz dveh bioreaktorskih posod, ki so bile povezane s konstantnim pretokom. Proses je bil konstanten 10 ur. V kontinuirnem sistemu so se fagi uspešno pomnoževali v koncentraciji 1×10^{10} PFU/ml.
- Kontinuirni sistem je bil postavljen tako, da se fagi kontinuirno pomnožujejo iz fagov, ki so bili dodani v gojišče na začetku kontinuirnega procesa, zato ni bilo potrebe po povratnem toku.
- Predstavljen kontinuirni proces bi lahko bil primeren za gojenje drugih fagov, specifičnih za druge seve iste vrste ali seve preostalih bakterijskih vrst. Potrebne bi bile prilagoditve na lastnosti in potrebe določene bakterije ter bakteriofaga.
- Postavljen kontinuirni proces je produktivnejši od šaržnega procesa.

7 POVZETEK

Bakterije iz rodu *Salmonella*, so patogeni organizmi, ki pogosto povzročajo bolezni ljudi in živali. Ena izmed možnih alternativ, za zatiranje oz. zdravljenje bakterijskih okužb, je uporaba za salmonele specifičnih bakteriofagov. Bakteriofagi so virusi, ki se pomnožujejo izključno v bakterijskih celicah. V svetu se potrebe po bakteriofagih povečujejo, saj je na svetovnem trgu vedno več komercialnih pripravkov, ki s pomočjo bakteriofagov zatirajo okužbe z bakterijami. Predvsem se bakteriofagi uporabljajo za preprečevanje bakterijskih okužb v proizvodnji in predelavi hrane, kjer so salmonele pogosto vir okužbe. Gojenje bakteriofagov običajno poteka v šaržnem procesu, kjer se gojijo bakterije do določene koncentracije. Bakterije predstavljajo substrat za bakteriofage. Po določenem času v šaržni proces dodamo še bakerifage, ki se na bakterijske celice adsorbirajo, jih inficirajo, se v njih namnožijo in se nato z lizo bakterijske celice sprostijo v gojišče. Če so v gojišču še na voljo bakterijske celice za okužbo se cikle ponovi. Proces se konča, ko fagi uničijo vse, za to primerne bakterijske celice. V magistrskem delu smo poskušali postaviti kontinuirni sistem za kontinuirno gojenje bakteriofagov. Za uspešno postavitev procesa je bilo potrebno najprej dobro okarakterizirati delovni organizem, v našem primeru Salmonelo. To smo naredili s šaržnim gojenjem v bioreaktorju. Spremembe v celični masi smo spremljali z metodo štetja kolonij, z merjenjem absorbance bioprocесne brozge pri 600nm ter s spremeljanjem parcialnega tlaka kisika. Določili smo μ_{max} , ki za dano bakterijo znaša $1,24 \text{ h}^{-1}$. Podatek je bistvenega pomena pri vodenju kemostat, kjer razredčevalna hitrost ne sme biti višja od μ_{max} , če ne želimo izgubljati biomase iz kemostata. Bakteriofag smo okarakterizirali z gojenjem v šaržnem procesu in metodo štetja plakov. Latentna perioda faga FS28 je 45 min. Optimalen čas infekcije je, ko je gostota celic približno $5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$, kar pomeni, da so bakterijske celice na začetku eksponentne faze rasti. Optimalna vrednost MOI je 0,1. Kontinuirno gojenje bakteriofagov smo vedno pričeli s šaržnim gojenjem bakterije v posodi 1 in zagnali kemostat šele po dosegu vrednosti absorbance okoli 0,400. Zaradi pomanjkanja kisika, se je absorbanca ustalila pri vrednosti približno 0,500. Kemostat smo vodili pri $D = 0,85 \text{ h}^{-1}$. Posoda 1 je predstavljala del kontinuirnega sistema, ki je zagotavljal konstantno koncentracijo bakterij za drugi del sistema, posodo 2, kjer je potekalo kontinuirno pomnoževanje bakteriofagov. Na začetku procesa smo v gojišče dodali želeno koncentracijo fagov. Ti se začnejo, po pritoku celic v posodo 2, pomnoževati in po dveh urah vodenja kontinuirnega sistema dosežejo ustaljeno vrednost 1×10^{10} . Povprečno število novo nastalih fagov na celico znaša 30. Ko je bil kontinuirni sistem uspešno postavljen smo poskušali povečati produktivnost sistema s spremeljanjem začetne koncentracije bakteriofagov v posodi 2, s povečanjem zadrževalnega časa faga v posodi 2 in z dotokom višje koncentracije bakterij v posodo 2. V nobenem izmed našetih poskusov nismo uspeli povišati koncentracije fagov v iztoku. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da bi s kontinuirnem gojenjem v enem tednu proizvedli šestkrat več fagov, kot s šaržnim gojenjem.

8 VIRI

- Ackermann H.W. 2009. Phage classification and characterization. V: *Bacteriophages Methods and Protocols*. Vol. 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (eds.). New York, Humana Press: 127-141
- Alvarez-Ordoñez A., Fernandez A., Bernardo A., Lopez M. 2010. Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology*, 27: 44-49
- Asamin K., Xing X.H., Tanji Y., Unno H. 1997. Synchronized disruption of *Escherichia coli* Cells by T4 phgae infecion. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 6: 511-516
- Bergey's manual of systematic bacteriology. 2001. Vol. 1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. (eds.). New York, Springer: 721 str.
- Birge E.A. 2006. Bacterial and bacteriophage genetics. Springer, New York: 559 str.
- Blasdel B.G., Abedon S.T. 2013. Superinfection Immunity. V: Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2ed. Maloy S., Hughes K. (eds). Elviser, Oxford: 315-350
- Bratkovič T., Preželj A. 2008. Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. Farmacevtski vestnik, 59: 129-134
- Brovko L.Y., Anany H., Griffiths M.V. 2012. Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67: 241-288
- Calsina A., Palmada J.M., Ripoll J. 2011. Optimal latent period in a bacteriophage population model structured by infection-age. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 12, 4: 1-26
- Carey Smith G.V., Billington C., Cornelius A.J., Hudson A., Heinemann J.A. 2006. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiolgy Letters*, 258: 182-186
- Carlson K. 2005. Working with bacteriophages. V: *Bacteriophages, Biology and Applications*. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds). CRC Press, New York: 320-340
- Cegnar M., Obermajer N., Kos J., Kristl. 2007. Nosilni sistem za dostavo bioloških učinkovin V: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 210-250
- Chen X.A., Cen P.L. 2005. A novel three-stage process for continuous production of penicillin G acylase by a temperature-sensitive expression system of *Bacillus subtilis* phage phi105. *Chemical and Biochemical Quarterly*, 19: 367-372
- Cheng Q., Nelson D., Zhu S., Fischetti V.A. 2005. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 111-117
- Cox J. 1999. *Salmonella*, Introduction. V: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson R. K. (ed.). San Diego, Academic Press: 1928-1937

- Drinovec B. 1996. Virusi. V: Biotehnologija, Osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, BIA d.o.o., 3-15
- Doreman A.H. 1948. Lysis and lysis inhibition with *Escherichia coli* bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 55, 2: 57-76
- Dulbecco R. 1952. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38: 747-752
- Dunkley K.D., Callaway T.R., O'Bryan C., Kundinger M.M., Dunkley C.S., Anderson R.C., Nisbet D.J., Crandall P.G., Ricke S.C. 2009. Cell yields and fermentation responses of a *Salmonella Typhimurium* poultry isolate at different dilution rates in an anaerobic steady state continuous culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 537 - 544
- Enfors S.O. 2003. Continuous and fed-batch fermentation. V: Bioprocess engineering. Doctoral/postdoctoral level Course, 7-13 September 2003. Berovič M., Kieran P. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 152-175
- Favrin S.J., Jassim S.A., Griffiths M.W. 2001. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation- bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in broth. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 217-224
- Favrin S.J., Jassim S.A., Griffiths M.W. 2003. Application of a novel immunomagnetic separation–bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 63-71
- Fortirer L.C., Moineau S. 2009. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. V: Bacteriophages: Methods in Molecular Biology. Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (eds). New York, Humana Press, 203-223
- Gadakar R., Gopinathan K.P. 1980. Bacteriophage burst size during multiple infection. *Journal of Bioscience*, 2, 3: 153-259
- Garrett M. G., Bell A. J., Lilburn G. T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 11st ed. New York, Springer: 121-122
- Goode D., Allen V.M., Barrow P.A. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 8: 5032-5036
- Goodridge L., Gallaccio A., Griffiths M.W. 2003. Morphological, host range, and genetic characterization of two coliphages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5364-5371
- Haefner J.W. 1996. Chemostats. V: Modeling biological systems, principles and applications. Utah, Springer Science + Business Media Dordrecht: 295-306
- Hagens S., Blasi U. 2003. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 318-323
- Housby J.N., Mann N.M. 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14, 12: 536-540

- Hyman P., Abedon S.T. 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. V: Bacteriophages: Methods and Protocols. Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (eds.). Mansfield, Humana Press: 175-203
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. 2013. Current taxonomy release.
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (20.10. 2013)
- ISO 4833. 1991. Microbiology general guidance for the enumeration of microorganisms colony count technique at 30 °C: 5 str.
- Jin J., Li Z.J., Wang S.W., Wang S.M., Huang D.H., Li Y.H., Ma Y.Y., Wang J., Liu F., Chen X.D., Li G.X., Wang X.T., Wang Z.Q., Zhao Q. 2012. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Microbiology*, 12: 156-164
- Koloini T. 1996. Prenos snovi in topote v bioreaktorjih. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur). Ljubljana, Bia: 487-507
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (15.1.2014)
- Kropinski A.W. 2009. Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. bacteriophages methods and protocols. Vol. 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (eds.). New York, Humana Press: 151-157
- Leverentz B., Conway W.S., Alavidze Z., Janisiewicz W.J., Fuchs Y., Camp M.J., Chighladze E., Sulakvelidze A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of Food Protection*, 64, 8: 1116-1221
- Lu T. K., Koeris M.S. 2011. The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 524–531
- Mackey B.M., Kerridge A.L., 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *International Journal of Food Microbiology* 6, 57-65
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. 2009. Brock Biology of Microorganisms. 12 ed. San Francisco, Person Education: 1061 str.
- Matsuzaki S., Rashel M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Ikeuchi M., Tani T., Fujieda M., Wakiguchi H., Ima S. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *The Journal of Infection and Chemotherapy*, 11: 211-219
- Merabishvili M., Pirnay J.P., Verbeken G., Chanishvili N., Tediashvili M., Lashkhi N., Glonti T., Krylov V., Mast J., Parys L., Lavigne R., Volckaert G., Mattheus W., Verween G., Corte P., Rose T., Vos D., Vaneechoutte M. 2009. Quality-controlled

- small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. PlosOne, 4, 3: e4944. doi:10.1371/journal.pone.0004944: 10str.
- ListexTM. 2012. Wageningen, Micreos Food Safety: 1 str.
<http://www.micreosfoodsafety.com/en/listex-productdata.aspx#> (18.10.2013)
- Mizoguchi K., Morita M., Fischer C.R., Yoichi M., Tanji Y., Unno H. 2003. Coevolution of bacteriophage PP01 in *Escherichia coli* O157:H7 in continuous culture. Applied and Environmental Microbiology, 69, 1: 170-176
- McCoy M. 2011. Microphage staph test wins Fda approval. Chemical Engeniring News 89: 17-19
- Mmolawa P.T., Willmore R., Thomas C.J. Heuzenroeder M.W. 2002. Temperate phages in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Implications for epidemiology. International Journal of Medical Microbiology, 291: 633-644
- Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D., 2010. Bacteriophage applications: where are we now? Letters of Applied Microbiology, 51: 363-369
- Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. Annual Review of Microbiology, 3: 371-395
- Moreira Hungaro U., Santos Mendonça R.C., Meireles Gouvêa D., Dantas Vanetti M.C., de Oliveira Pinto C.L. 2013. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. Food Research International, 52: 75-81
- Moutafchieva D., Popova D., Dimitrova M., Tchaoushev S. 2013. Experimental determination of the volumetric mass transfer coefficient. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 48: 351-356
- Oh J.S., Cho D., Park T.H. 2005. Two-stage continuous operation of recombinant *Escherichia coli* using the bacteriophage λ Q- vector. Bioprocess and Biosystems Engineering, 28: 1-7
- Panec M., Katz S.D. 2006. Plaque Assay Protocols. Washington, American Sociey for Microbiology: 3 str.
<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3073-plaque-assay-protocols> (15.3.2013)
- Pavko A. 1996. Masne bilance in načini vodenja bioprosesov. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur). Ljubljana, Bia: 425-436
- Park S.H., Park T.H. 2000. Analysis of two-stage continuous operation of *Escherichia coli* containing bacteriophage λ vector. Bioprocess Engineering, 23: 187-190
- Paš M., Raspor P. 2010. Praktikum iz osnov biotehnologij. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 str.
- Popoff M.Y., Minor L. 2005. *Salmonella*. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: 2ed . Volume Two, The Proteobacteria. Part B, The Gammaproteobacteria. Brenner D.J. (ed.). Boston, Springer: 764-799
- Raspor P., Smole-Možina Sonja. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, Bia: 148 str.

- Robinson T.P., Aboaba O.O., Kaloti A., Ocio M.J., Baranyi J., Mackey B.M. 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 70: 163-173
- The Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. 1934. The genus *Salmonella* Lignières, 1900. The Journal of Hygiene, 34, 3: 333–350
- Sanders C. 2011. Sanders Lab Protocols: 85 str.
http://structbio.vanderbilt.edu/sanders/dgk_protocols.pdf (25.5.2013)
- Sauvageau D. 2010. Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. Montreal, Department of Chemical Engineering, McGill University: 175 str.
- Sauvageau D., Cooper D.G. 2010. Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. Microbial Cell Factories, 9, 81: 1-10
- Schaechter M., Maaloe O., Kjeldgaard N.O. 1958. Dependency on medium and temperature of cel size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. Journal of General Microbiology, 19: 592-606
- Shelobolina S. E., Sullivan A. S., O'Neill R. K., Nevin P. K., Lovley R. D. 2004. Isolation,characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistantbacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment anddescription of *Salmonella subterranea* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology, 70, 5: 2959-2965
- Skurnik M., Pajunen M., Kiljunen S. 2007. Biotechnological challenges of phage therapy. Biotechnology Letters, 29: 995-1003
- Smole Možina S. 1996. Izbor, priprava in shranjevanje industrijskih biokultur. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur). Ljubljana, Bia: 350-365
- Stone R. 2002. Stalin forgotten cure. Science, 298: 728-731
- Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. 2001. Bacteriophage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 3: 649-659
- Villadsen J., Nielsen J., Lidén G. 2011. Bioreaction Engineering Principles. London, Springer Science+Business Media: 547 str.
- Wise W.S. 1951. The measurement of the aeration of culture media. Journal of General Microbiology, 5: 167-177
- Wilson P.D.G., Wilson D.R., Brocklehurst T.F., Coleman H.P., Mitchell G., Waspe C.R., Jukes S.A., Robins M.M. 2003. Batch growth of *Salmonella typhimurium* LT2: stoichiometry and factors leading to cessation of growth. International Journal of Food Microbiology, 89: 195-203
- Withey S., Cartmell E., Avery L.M., Stephenson T. 2005. Bacteriophages – poencial for application in wastewater reatment process. Science of the Environment, 339: 1-18
- Wittrup K.D. 2007. Course materials for Chemical and Biological Reaction Engineering. Boston, Massachusetts Institute of Technology: 5 str.

http://ocw.mit.edu/courses/chemical-engineering/10-37-chemical-and-biological-reaction-engineering-spring-2007/lecture-notes/lec07_02282007_w.pdf
(14.10.2013)

- Wong C.L., Sieo C.C., Tan W.S., Abdullah N., Hair-Bejo M., Abu J., Ho Y.W. 2014. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. International Journal of Food Microbiology, 172: 92-101
- Yan S. S., Pendrak L. M., Abela-Ridder B., Pounderson W. J., Fedorko P. D., Foley L. S. 2003 An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews, 4: 189-199
- Zaletel E. 2013. Optimizacija pridobivanja bakteriofagov v bioreaktorju. Magistrsko delo. Biotehniška fakulteta, Ljubljana: 63 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Alešu Podgorniku za strokovno pomoč in nasvete ter za natančen pregled magistrskega dela.

Iskreno se zahvaljujem dr. Franciju Smrekarju za odlično usmerjanje, čas in pomoč pri izvajanju eksperimentov v okviru magistrskega dela. Prav tako se zahvaljujem vsem sodelavcem iz podjetja JAFRAL d.o.o.

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Petru Rasporju in recenzentu prof. dr. Marinu Beroviču za hiter in temeljit pregled magistrskega dela in vse nasvete, ki so pripomogli k njegovemu izboljšanju.

Podjetju BIA d.o.o. se zahvaljujem za opremo MonitShaker in Evi Zaletel za pomoč pri njeni uporabi.

PRILOGE

Priloga 1: Podatki za vrednost absorbance, ki so bili pridobljeni tekom šaržnega gojenja bakterijske kulture na stresalniku.

Čas (min)	Absorbanca (600nm)				
	Poskus A	Poskus B	Poskus C	Poskus D	Poskus E
0	0,067	0,060	0,060	0,075	0,053
30	0,070	0,077	0,070	0,085	0,086
60	0,115	0,122	0,130	0,118	0,107
90	0,198	0,214	0,233	0,222	0,212
120	0,398	0,353	0,322	0,386	0,388
150	0,650	0,612	0,594	0,668	0,670
180	0,962	0,833	0,855	1,140	0,980
210	1,364	1,070	1,170	1,280	1,116
240	1,430	1,164	1,364	1,430	1,184
270	1,454	1,296	1,488	1,500	1,270
300	1,418	1,460	1,524	1,560	1,286

Priloga 2: Podatki za vrednost absorbance, ki so bili pridobljeni tekom šaržnega gojenja bakterijske kulture v bioreaktorju.

Čas (min)	Absorbanca (600 nm)			
	Poskus 1	Poskus 2	Poskus 3	Poskus 4
0	0,1	0,1	0,1	0,1
30	0,3	0,2	0,2	0,2
60	0,5	0,5	0,4	0,3
90	0,9	0,8	0,7	0,7
120	1,6	1,4	1,1	1,1
150	2,7	2,3	2,0	2,0
180	4,1	3,5	3,0	3,6
210	5,5	4,4	4,1	4,6
240	5,8	5,5	5,9	5,2
270	5,9	6,1	6,6	5,5
300	5,9	6,1	6,8	5,7

Priloga 3: Prikaz podatkov o koncentraciji celic ob infekciji (absorbanca), začetno in končno koncentracijo fagov, MOI ter produktivnost za poskuse gojenja bakteriofagov v šaržnem procesu.

Poskus	Infekcija pri A ₆₀₀	Začetni PFU/ml	Končni PFU/ml	MOI
A	0,500	5 X 10 ⁸	2 X 10 ¹⁰	1,000
B	0,500	5 X 10 ⁷	6 X 10 ¹⁰	0,100
C	0,500	5 X 10 ⁵	9 X 10 ¹⁰	0,001
D	0,100	5 X 10 ⁷	1 X 10 ¹⁰	0,500
E	0,500	5 X 10 ⁷	6 X 10 ¹⁰	0,100
F	0,900	5 X 10 ⁷	2 X 10 ¹⁰	0,050
G	0,900	7 X 10 ⁶	4 X 10 ¹⁰	0,010
H	0,900	1 X 10 ⁷	3 X 10 ¹⁰	0,020

Priloga 4: Prikaz podatkov števila celic v vtoku in iztoku iz posode 2 ter koncentracije fagov v iztoku iz kontinuirnega sistema pridobljenih tekom poskusa kontinuirni proces 1 (KP1).

Čas (h)	Koncentracija celic ob prihodu v posodo 2 (celic/mlX10 ⁸)	Koncentracija celic v iztoku iz posode 2 (celic/mlX10 ⁸)	Koncentracija fagov v iztoku (PFU/mlX10 ⁹)
1,8	4,4	0,00	0,6
2,8	4,7	0,50	7,2
3,8	4,7	0,59	10,2
4,8	4,6	0,77	8,4
5,8	4,6	0,42	7,4
6,8	4,5	0,86	7,8
7,8	4,3	0,90	7,6
8,8	4,5	1,05	5,4
9,8	4,3	1,16	10,4
10,8	4,2	1,03	9,6
11,8	4,6	1,20	11,6