

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Eva ZALETAL

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA BAKTERIOFAGOV
V BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Eva ZALETEL

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA BAKTERIOFAGOV V
BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF BACTERIOPHAGES
IN BIOREACTOR**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil in na Centru odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, Laboratorij za bioanalitiko.

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 recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možinu.

Mentor: prof. dr. Aleš Podgornik

Somentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

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 kontrolo,
Laboratorij za bioanalitiko

Član: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Sonja Smole Možina
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Ocena:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Eva Zaletel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:602.3:578.347(043.2)=163.6
KG	bakteriofagi/ <i>Campylobacter jejuni</i> /bioreaktorji/bioprocес/fagna terapija/odpornost na antibiotike/patogene bakterije
AV	ZALETEL, Eva
SA	PODGORNIK, Aleš (mentor)/RASPOR, Peter (somentor)
KZ	SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XII, 63 str., 5 preg., 24 sl., 11 pril., 81 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Povečanje odpornosti na antibiotike je povzročilo iskanje alternativ za zdravljenje bakterijskih okužb. Zanimivo možnost predstavlja fagna terapija, katere razvoj je tesno povezan z učinkovitostjo in stroški proizvodnje bakteriofagov. Namen dela je bil optimizirati postopek za pridobivanje bakteriofagov v bioreaktorju. Za bakteriofagni gostiteljski organizem smo izbrali bakterije rodu <i>Campylobacter</i> , ki so vodilni povzročitelji črevesnih okužb v razvitem svetu. Primerjali smo rast bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> v mikraerofilni atmosferi in v mikraerofilni atmosferi s povišanimi koncentracijami O ₂ in CO ₂ , kjer smo z metodo določanja kolonijskih enot (CFU/ml) ugotovili, da so za rast bakterije <i>C. jejuni</i> primerne koncentracije 3-20 % O ₂ in 3-10 % CO ₂ . Ugotovili smo povezano med CFU/ml in deležem koncentracije raztopljenega kisika merjenega s pO ₂ elektrodo. S pO ₂ elektrodo smo sprotno spremljali dinamiko rasti. Pri namnoževanju bakteriofagov v erlenmajericah smo ugotovili hitrejši zaključek bioprocesa z uporabo 12 urne kulture, kjer smo 11-15 ur po inokulaciji dobili koncentracijo bakteriofagov 10 ⁶ PFU/ml. Maksimalna specifična hitrost rasti bakterije je bila 0,3 h ⁻¹ . Ugotovili smo, da s sledenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika merjenega s pO ₂ elektrodo lahko napovemo čas lize in s tem sprostitev bakteriofagov. V bioreaktorju smo namnoževali bakteriofage z 12 urno kulturo. Z uporabo bioreaktorja smo dosegli visoko maksimalno specifično hitrost rasti 0,83 h ⁻¹ . Končni titer bakteriofagov (3x10 ⁷ PFU/ml) smo dosegli 10 ur po inokulaciji, čas lize pa ugotovili s spremljanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 606:602.3:578.347(043.2)=163.6
CX	bacteriophages/ <i>Campylobacter jejuni</i> /bioreactors/bioprocess/phage therapy/antibiotic resistance/pathogenic bacteria
AU	ZALETEL, Eva
AA	PODGORNIK, Aleš (supervisor)/RASPOR, Peter (co-advisor)
PP	SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Study of Biotechnology
PY	2013
TI	OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF BACTERIOPHAGES IN BIOREACTOR
DT	M. Sc Thesis (Master Study Programmes:Biotechnology)
NO	XII, 63 p., 5 tab., 24 fig., 11 ann., 81 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The increase in antibiotic resistance leads to alternatives for treatment of bacterial infections. An interesting option is phage therapy, which development is closely related to the efficiency and cost of production of bacteriophages. The purpose of the thesis was to optimize process of the production of bacteriophages in a bioreactor. As a host organism for bacteriophages we selected bacteria <i>Campylobacter</i> , the leading bacterial cause of gastroenteritis worldwide. We compared growth of bacteria <i>Campylobacter jejuni</i> in a microaerophilic atmosphere and in a microaerophilic atmosphere with increased concentrations of O ₂ and CO ₂ . By determining viable colony forming units (CFU/ml) we found out that for growth of bacteria <i>C. jejuni</i> appropriate concentrations are 3-20 % of O ₂ and 3-10 % of CO ₂ . We established a connection between CFU/ml and the proportion of dissolved oxygen measured with pO ₂ electrode. Using pO ₂ electrode we monitored growth dynamics on-line. We established faster harvest of bioprocess using 12 h culture at bacteriophage propagation in conical flasks. Using this method the bacteriophage concentration was 10 ⁶ PFU/ml 11-15 hours after inoculation. Maximum specific growth rate was 0,3 h ⁻¹ . We found out that by monitoring the proportion of dissolved oxygen measured with pO ₂ electrode, we can predict the time of lysis and consequently the release of bacteriophages. In bioreactor we propagated bacteriophages with 12 h culture. With the use of bioreactor we achieved a high maximum specific growth rate of 0,83 h ⁻¹ . Final bacteriophage titre (3x10 ⁷ PFU/ml) was achieved 10 hours after inoculation. The time of lysis was determined by monitoring the proportion of dissolved oxygen.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII

1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>CAMPYLOBACTER</i>	3
2.1.1 Rastne karakteristike	3
2.1.2 Epidemiologija	4
2.2 BAKTERIOFAGI	4
2.2.1 Taksonomija in zgradba bakteriofagov.....	5
2.2.2 Življenjski cikel.....	5
2.2.3 Stopnje infekcije litičnega bakteriofaga	6
2.2.3.1 Kinetika bakteriofagne infekcije.....	6
2.2.4 <i>Campylobacter</i> specifični bakteriofagi	7
2.2.5 Fagna terapija.....	8
2.2.6 Proizvodnja bakteriofagov v velikem merilu	8
2.2.6.1 Vpliv koncentracije bakterijskih celic	9
2.2.6.2 Vpliv časa infekcije in multipliciteta infekcije	9
2.3 NAMNOŽEVANJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU.....	10
2.3.1 Bioprocес z enkratnim polnjenjem	10
2.3.1.1 Večstopenjska generacija inokuluma.....	10
2.3.2 Mikrobnna rast	11
2.3.2.1 Kinetika rasti v zaprtem bioprocесu	11
2.3.3 Bioreaktorji z mehanskim načinom mešanja.....	12
2.3.4 Raztopljanje kisika	12
2.3.4.1 Poraba kisika v aerobnih procesih	13
2.3.4.2 Merjenje raztopljenega kisika	13

2.3.4.3	Eksperimentalno določanje k_{LA}	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	MATERIALI	16
3.1.1	Bakterijski sev.....	16
3.1.2	Bakteriofag PC5.....	17
3.1.3	Rastna gojišča za bakterije rodu <i>Campylobacter</i>	17
3.1.3.1	Columbia krvni agar	17
3.1.3.2	Abeyta-Hunt-Bark agar.....	17
3.1.3.3	Možgansko-srčni infuzijski bujon	17
3.1.3.4	<i>Campylobacter</i> selektivni agar	17
3.1.3.5	Mueller Hinton bujon.....	18
3.1.4	Gojišča za namnoževanje in kvantifikacijo bakteriofagov.....	18
3.1.4.1	NZCYM osnovni agar	18
3.1.4.2	NZCYM mehki agar	18
3.1.4.3	Solno magnezijev pufer	18
3.1.5	Priprava reagentov	19
3.1.6	Druge kemikalije	19
3.1.7	Laboratorijski pribor in oprema.....	19
3.2	METODE	20
3.2.1	Priprava delovne banke bakterije <i>C. jejuni</i> LBA65	20
3.2.2	Revitalizacija bakterij	21
3.2.3	Priprava inokuluma	21
3.2.4	Metoda štetja kolonij.....	21
3.2.5	Priprava delovne banke bakteriofaga PC5	22
3.2.6	Metoda štetja plakov	22
3.2.7	Priprava mrežic za presevno elektronsko mikroskopijo	23
3.2.8	Kalibracija elektrod v erlenmajericah s pO_2 in pH elektrodo	23
3.2.9	Merjenje k_{LA} po razplinjevalni metodi v 500 ml erlenmajericah in 30 l bioreaktorju	24
3.2.10	Izračun maksimalne specifične hitrosti rasti iz podatkov pO_2 elektrod	24
4	REZULTATI	26
4.1	OPTIMIZACIJA RASTI BAKTERIJE <i>C. jejuni</i>	26
4.1.1	Preverjanje možnosti gojenja bakterije <i>C. jejuni</i>	26

4.1.2	Spremljanje rasti s sistemom s kisikovo in pH elektrodo	27
4.1.3	Ovrednotenje sistema s pO₂ elektrodami	29
4.1.3.1	Preverjanje signala pO ₂ elektrode	29
4.1.3.2	Merjenje k _{LA} v 500 ml erlenmajericah.....	30
4.1.3.3	Velikost hitrosti prenosa kisika proti hitrosti porabe kisika	31
4.1.4	Povezava znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika s koncentracijo celic	32
4.1.4.1	Vpliv volumna inokuluma na delež koncentracije raztopljenega kisika in dinamiko bakterijske rasti	33
4.1.5	Optimizacija vpihanja CO₂.....	34
4.2	OPTIMIZACIJA NAMNOŽEVANJA BAKTERIOFAGOV	37
4.2.1	Namnoževanje bakteriofagov s 24 urno gostiteljsko kulturo <i>C. jejuni</i> ...	37
4.2.2	Namnoževanje bakteriofagov z 12 urno gostiteljsko kulturo <i>C. jejuni</i> ...	39
4.3	PRENOS GOJENJA BAKTERIJE <i>C. jejuni</i> V 2 L BIOREAKTOR.....	42
4.4	PRIDOBIVANJE BAKTERIOFAGOV V 30 L BIOREAKTORJU	42
4.4.1	Merjenje k _{LA} in razmerje hitrosti prenosa kisika proti porabi kisika ...	42
4.4.2	Namnoževanje bakteriofagov z 12 urno gostiteljsko bakterijo <i>C. jejuni</i> v bioreaktorju	43
5	RAZPRAVA	46
5.1	OPTIMIZACIJA RASTI BAKTERIJE <i>C. jejuni</i>	46
5.1.1	Preverjanje možnosti gojenja bakterije <i>C. jejuni</i>	46
5.2	SPREMLJANJE RASTI S SISTEMOM S pO ₂ IN pH ELEKTRODO.....	46
5.2.1	Ovrednotenje sistema s pO ₂ elektrodami	47
5.2.2	Povezava znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika s koncentracijo celic	48
5.2.3	Optimizacija vpihanja CO ₂	49
5.3	OPTIMIZACIJA NAMNOŽEVANJA BAKTERIOFAGOV	50
5.4	PRENOS GOJENJA BAKTERIJE <i>C. jejuni</i> V 2 L BIOREAKTOR.....	51
5.5	PRIDOBIVANJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU.....	52
6	SKLEPI	54
7	POVZETEK (SUMMARY).....	55
7.1	POVZETEK	55
7.2	SUMMARY	56
8	VIRI	57
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava atmosfere za posamezne koncentracije vpihanega čistega CO ₂ v inkubator in koncentracije celic	36
Preglednica 2: Maksimalna specifična hitrost rasti (h ⁻¹) bakterije <i>C. jejuni</i> za kontrolo-gojenje bakterije <i>C. jejuni</i> in za infekcijo 24 urne kulture <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	39
Preglednica 3: Maksimalna specifična hitrost rasti (h ⁻¹) bakterije <i>C. jejuni</i> za kontrolo-gojenje bakterije <i>C. jejuni</i> in za infekcijo 12 urne kulture <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	41
Preglednica 4: V preglednici so zbrani podatki eksperimentov optimizacije gojenja v 21 bioreaktorju	42
Preglednica 5: Maksimalna specifična hitrost rasti (h ⁻¹) in generacijski čas (min) bakterije <i>C. jejuni</i> za infekcijo <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Mikrografija <i>Campylobacter jejuni</i> LBA65 posnet s presevno elektronsko mikroskopijo(foto Tušek M.)	3
Slika 2: Večstopenjska generacija inokuluma za proizvodni bioreaktor (Christi, 2010) ..	11
Slika 3: Hodogram poskusa optimizacije rasti bakterije <i>C. jejuni</i>	15
Slika 4: Hodogram poskusa namnoževanja bakteriofagov na gostiteljski bakteriji <i>C. jejuni</i>	16
Slika 5: Primer plošče AHB s triplikati posameznih redčitev <i>C. jejuni</i>	22
Slika 6: Primer kalibracije pO ₂ elektrode.	24
Slika 7: Dinamika rasti bakterije <i>C. jejuni</i> z določanjem števila kolonijskih enot.....	27
Slika 8: Spremljanje dinamike rasti bakterije <i>C. jejuni</i> v erlenmajericah s kisikovo in pH elektrodo.....	27
Slika 9: Spremljanje dinamike rasti s sistemom s pO ₂ in pH elektrodo.....	28
Slika 10: Spremljanje spremembe pH gojišča pri vpihanju različnih koncentracij čistega CO ₂ v inkubator.....	29
Slika 11: Preverjanje signala pO ₂ elektrode.	30
Slika 12: Določanje koeficiente prenosa kisika, k _{LA} , po razplinjevalni metodi.	31
Slika 13: Povezava dinamike rasti bakterije <i>C. jejuni</i> z zmanjšanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika in z višanjem koncentracije celic.	33
Slika 14: Gojenje bakterije <i>C. jejuni</i> pri različnem volumnu inokuluma.....	34
Slika 15: Primerjava znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika pri gojenju bakterije <i>C. jejuni</i> pri različnih koncentracijah vpihanega čistega CO ₂ v inkubator.	35
Slika 16: Primerjava dinamike rasti bakterije <i>C. jejuni</i> v primeru »izklopa CO ₂ « in v mikraerofilni atmosferi.....	36
Slika 17: Primerjava deleža koncentracije raztopljenega kisika med infekcijo 24 urne gostiteljske bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi in med gojenjem bakterije <i>C. jejuni</i>	38
Slika 18: Primerjava dinamike rasti bakterije <i>C. jejuni</i> v primeru kontrole in v primeru infekcije 24 urne bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi.	39
Slika 19: Primerjava deleža koncentracije raztopljenega kisika med infekcijo 12 urne gostiteljske bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi in med gojenjem bakterije <i>C. jejuni</i>	40
Slika 20: Primerjava dinamike rasti bakterije <i>C. jejuni</i> v primeru kontrole in v primeru infekcije 12 urne bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi.	41
Slika 21: Na sliki je 30 l bioreaktor Techofors-S s spektrofotometrom za merjenje optične gostote.	42
Slika 22: Določanje koeficiente prenosa kisika, k _{LA} , po razplinjevalni metodi.	43

Slika 23: Primer infekcije 12 urne gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagom PC5 v 15
1 bioreaktorju. 45

Slika 24: Meritve optične gostote za namnoževanje bakteriofagov z 12 urno kulturo
C. jejuni. 45

KAZALO PRILOG

- Priloga 1: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med gojenjem bakterije *C. jejuni* v mikroaerofilni atmosferi (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) in atmosferi z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 % N₂.
- Priloga 2: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med spremljanjem dinamike rasti bakterije *C. jejuni* s sistemom s pO₂ in pH elektrodo.
- Priloga 3: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu povezave dinamike rasti *C. jejuni* z zmanjšnjem deleža koncentracije raztopljenega kisika s koncentracijo celic.
- Priloga 4: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu preverjanja vpliva volumna inokulumna na delež koncentracije raztopljenega kisika in dinamiko bakterije *C. jejuni*.
- Priloga 5: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu optimizacije koncentracije vpihanega čistega CO₂ v inkubator.
- Priloga 6: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu gojenja bakterije *C. jejuni* v primeru »izklopa CO₂« in v primeru gojenja v mikroaerofilni atmosferi-kontrola (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂).
- Priloga 7: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri gojenju bakterije *C. jejuni*-kontrola in pri infekciji 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.
- Priloga 8: Povprečno število plakov (PFU/ml) pri infekciji 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.
- Priloga 9: Povprečno število celic (CFU/ml) pri infekciji 12 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.
- Priloga 10: Povprečno število plakov (PFU/ml) pri infekciji 12 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.
- Priloga 11: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) in povprečno število plakov (PFU/ml) med namnoževanjem bakteriofagov z gostiteljsko bakterijo *C. jejuni* v bioreaktorju.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHB	Abeyta-Hunt-Bark agar
BHI	možgansko-srčni infuzijski bujon (ang. brain heart infusion)
CCDA	ogljeni cefoperazon deoksiholat agar, <i>Campylobacter</i> selektivni agar (ang. charcoal cefoperazone desoxycholate agar)
C^*_{AL}	ravnotežna koncentracija kisika v tekoči fazni na fazni meji zrak-tekočina
C_{AL}	povprečna koncentracija kisika v tekočini
H_2CO_3	ogljikova kislina
H_3O^+	oksonijev kation
HCO_3^-	bikarbonatni ion
ICTV	mednarodni komite za taksonomijo virusov (ang. International Committee on Taxonomy of Viruses)
k_La	volumenski koeficient snovnega prestopa oziroma prenosa kisika
LBA	Laboratorij za bioanalitiko
MHB	Mueller Hinton bujon
CMHB	Mueller Hinton bujon z dodanimi ioni
MOI	multipliciteta infekcije (ang. multiplicity of infection)
N_A	hitrost prenosa kisika na volumensko enoto brozge
NZCYM	novozelandski kazamino kvasni medij
Q_o	hitrost porabe kisika na volumensko enoto brozge
q_o	specifična hitrost porabe kisika
SM	solno magnezijev pufer
TTC	2,3,5 trifenil-tetrazolijev klorid
μ	maksimalna specifična hitrost rasti
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

V 21. stoletju se soočamo s ponovnim pojavljanjem že obvladanih bolezni, ki so posledica povečane odpornosti bakterijskih sevov na obstoječe antibiotike. To je sprožilo iskanje alternativ za zdravljenje bakterijskih infekcij (Sulakvelidze in sod., 2001) med katerimi zanimivo možnost predstavlja t.i. fagna terapija. V času pred antibiotiki so se pogosto uporabljali bakteriofagi za zdravljenje in preprečevanje bakterijskih okužb (van der Vlugt in Verbeek, 2008). Bakteriofagi so bakterijski virusi, ki okužijo dovezno bakterijo, se v njen razmnožujejo in povzročijo lizo (Hendrix in sod., 1999). Bakteriofagi so visoko specifični, nepatogeni in imajo dolgoročno sposobnost preživetja v primerem gostitelju (Calendar, 1988).

Bakterije rodu *Campylobacter* so majhne Gram-negativne bakterije v obliki spiralnih in zavitih palčk (Holt in sod., 1994). Občutljivi so na zunanje okoljske dejavnike in za rast potrebujejo mikraerofilno atmosfero in temperaturo med 37 in 42 °C (Lee in sod., 1998). Take pogoje jim nudi gastrointestinalni trakt številnih toplokrvnih živali. Termofilne vrste, posebno bakterija *C. jejuni*, so glavni povzročitelji bakterijskega enteritisa pri ljudeh (Skirrow, 1977). Bakterije rodu *Campylobacter* so vedno bolj odporne na klinično pomembne antibiotike (Luangtongkum in sod., 2009) in zato je zanimiva fagna terapija s *Campylobacter* specifičnimi bakteriofagi.

Za uspešnost fagnih terapij je potrebno zagotoviti v produktu dovolj visoko koncentracijo bakteriofagov. Če se bakteriofagi znani že okoli 100 let in v zadnjem desetletju tudi intenzivno preučevani, pa njihovo gojenje in pridobivanje v večjem merilu še vedno predstavlja izziv. Proizvodnja bakteriofagov je mogoča v bioreaktorjih, kjer pomembno vlogo igrata optimizacija procesa in kontrola. To še posebej velja za bakteriofage, ki napadajo človeku patogene bakterije in je potrebno zagotoviti visoko čisti fagni produkt, brez bakterij, toksinov, pirogenov in ostalih škodljivih substanc (Carla in sod., 2012).

Litični bakteriofagi so temelj za namnoževanje terapevtskih fagov v bioreaktorjih, saj vedno povzročijo lizo bakterijske celice in sprostijo nove bakteriofage (Cheetham in Katz, 1995). Na uspešen proces infekcije vpliva tako uspešna rast gostiteljske celice, kot produkcija fagov (Sauvageau in Cooper, 2010).

1.1 CILJI DELA

Namen magistrskega dela je bil optimizirati pogoje gojenja bakterij rodu *Campylobacter* s ciljem doseči visoke koncentracije celic, ki so predpogoj za visok titer bakteriofagov. Pri tem smo optimizirali koncentracijo kisika v mediju s sestavo vpihovanih plinov in z ustreznim pripravljenim inokulumom. Drugi cilj naloge je bil optimizirati namnoževanje bakteriofagov z določitvijo optimalnega trenutka inokulacije z bakteriofagi in določiti čas zaključka bioprosesa, ko bomo dosegli končni titer bakteriofagov in prenos optimalnega bioprosesa na bioreaktorski nivo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo postavili naslednje hipoteze:

- Specifična hitrost rasti *Campylobacter* v šaržnem biopresusu je odvisna od koncentracije raztopljenega kisika v mediju in sestave plinske mešanice.
- Različni načini doseganja konstantne koncentracije kisika v mediju vplivajo na specifično hitrost rasti.
- Trenutek inokulacije bakteriofaga vpliva na končno koncentracijo bakteriofagov v mediju.

Zaradi rezultatov predposkusov in razpoložljive opreme smo ob začetku eksperimentalnega dela hipoteze spremenili v naslednje:

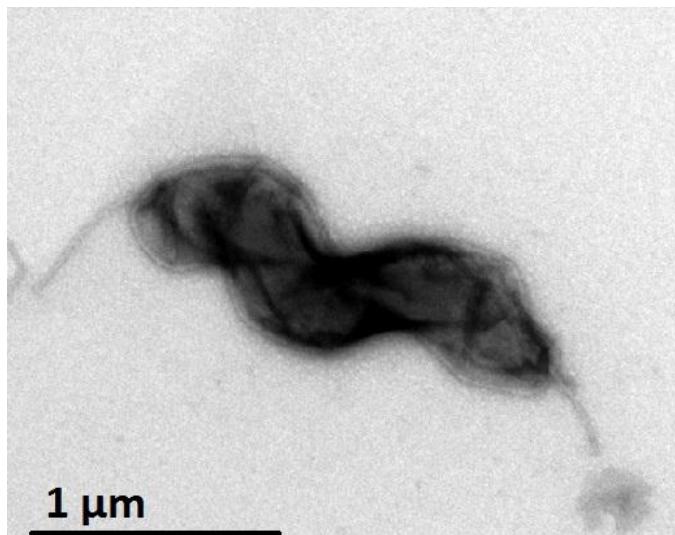
- Specifična hitrost rasti *Campylobacter* v šaržnem biopresusu je odvisna od koncentracije raztopljenega kisika v mediju in sestave plinske mešanice.
- Fiziološko stanje gostiteljske celice *Campylobacter* vpliva na končno koncentracijo bakteriofagov v mediju.
- Biopres razvit na laboratorijskem nivoju je mogoče učinkovito prenesti v bioreaktor.

2 PREGLED OBJAV

V poglavju je zbran pregled literature v obsegu, ki je potreben za razumevanje eksperimentalnega dela.

2.1 BAKTERIJE RODU *CAMPYLOBACTER*

Domnevno je bakterije rodu *Campylobacter* prvi izoliral iz črevesja dojenčka in opazoval Escherich leta 1886, šele leta 1972 pa so bili spoznani za pomembne povzročitelje bolezni povezanih s hrano (Dekeyser in sod., 1972). Trenutno rod *Campylobacter* šteje 25 vrst (Man, 2011). Bakterije rodu *Campylobacter* so majhne Gram-negativne bakterije, v širino merijo od 0,2 do 0,8 μm v dolžino pa od 0,5 do 5 μm in so v obliki spiralnih in zavitih palčk (Holt in sod., 1994). Večina vrst ima spiralno gibanje, ki ga omogoča polarna flagela na enem oz. obeh koncih celice. Skoraj vse vrste imajo katalazno aktivnost. Niso sposobni fermentirati ogljikovih hidratov, namesto tega energijo pridobijo iz aminokislin ali pa iz intermediatov cikla trikarboksilnih kislin (Silva in sod., 2011).



Slika 1: Mikrografija *Campylobacter jejuni* LBA65 posnet s presevno elektronsko mikroskopijo (foto: Tušek M.)

2.1.1 Rastne karakteristike

Bakterije rodu *Campylobacter* so bolj občutljive na zunanje okoljske dejavnike kot ostale patogene bakterije povezane z okužbami s hrano. Kampilobaktri potrebujetejo zelo specifične pogoje za rast. Termofilne vrste rodu *Campylobacter* so sposobne rasti med 37 in 42 °C in ne rastejo pod 30 °C (Lee in sod., 1998). Optimalna temperatura za rast je 42 °C. So mikroaerofilni organizmi, kar pomeni da ne rastejo v prisotnosti zraka, rastejo pa v atmosferi s 5 % kisika (Roberts in sod., 1996; Park, 2002). Optimalna atmosfera za rast

je sestavljena iz 5 % O₂, 10 % CO₂ in 85 % N₂ (Garénaux in sod., 2008). Občutljive so na osmotski stres in ne rastejo pri koncentraciji natrijevega klorida večje od 2 % w/v (Doyle in Roman, 1981). Bakterije rodu *Campylobacter* ne bodo preživele pH pod 4,9 in nad 9, medtem ko je optimalni pH za rast med 6,5 in 7,5 (Roberts in sod., 1996). Rastni eksperimenti so pokazali, da je podvojitveni čas odvisen od številnih faktorjev kot so genotip, temperatura, sestava medija in prisotnost konkurenčnega seva (Velayudhan in Kelly, 2002; Khanna in sod., 2006; Jackson in sod. 2007; Konkel in sod., 2007). Pregled nedavne literature kaže, da je podvojitveni čas divjega tipa bakterije *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) med 90 min in 5 h (Wilson in sod., 2009).

2.1.2 Epidemiologija

Termofilne vrste bakterije rodu *Campylobacter*, posebno bakterije *C. jejuni*, so glavni povzročitelj akutnega bakterijskega enteritisa pri ljudeh. Ocenjeno je, da so bakterije rodu *Campylobacter* vsakoletno odgovorne za 400-500 milijonov primerov diareje (Luangtongkum in sod., 2009). Bakterije rodu *Campylobacter* so naravno prisotne v gastrointestinalnem traktu številnih toplokrvnih živali. Najpogosteji gostitelji so ptice, verjetno zaradi njihove višje telesne temperature. Perutnina je primarni rezervoar *C. jejuni* (Skirrow, 1977).

Primarni izvor okužbe je zaužitje mikrobiološko kontaminirane hrane živalskega izvora. Glavni vzrok okužbe je rokovanje in uživanje kontaminirane perutnine, navzkrižna kontaminacija živil in uživanje nezadostno toplotno obdelanega perutninskega mesa (Park, 2002). Večina okužb z bakterijo rodu *Campylobacter* je blagih in minejo same od sebe v roku 2-4 dni brez uporabe antibiotikov. Pri otrocih, starejših in osebah z oslabljenim imunskim sistemom se lahko pojavijo številne daljše okužbe s težjimi simptomi in zahtevajo uporabo antibiotikov (Walker in sod., 1986). Bakterije rodu *Campylobacter* so vedno bolj odporne na klinično pomembne antibiotike in naraščajoča odpornost predstavlja skrb za javno zdravje (Luangtongkum in sod., 2009).

2.2 BAKTERIOFAGI

Znatno povečanje odpornosti bakterij na antibiotike je sprožilo iskanje alternativ za zdravljenje bakterijskih infekcij (Sulakvelidze in sod., 2001). V času pred antibiotiki so se pogosto uporabljali bakteriofagi za zdravljenje in preprečevanje bakterijskih okužb (van der Vlugt in Verbeek, 2008; Bruynoghe in Maisin, 1921, cit. po Sulakvelidze in sod., 2001). Bakteriofage sta leta 1915 in 1917 odkrila dva neodvisna raziskovalca, Frederick Twort (Twort, 1915, cit. po Duckworth, 1976) in Felix d'Herelle (d'Herelle, 1917, cit. po Duckworth, 1976). Bakteriofagi so bakterijski virusi, ki okužijo dovetno bakterijo, se v njej razmnožujejo in povzročijo lizo. Bakteriofagi so najštevilčnejša živa bitja na zemlji, njihovo število je ocenjeno na 10³⁰ do 10³². So naravno prisotni v okolju, najdemo jih

kjerkoli živi in se razmnožuje njihov gostitelj-v odpadnih vodah in blatu, v tleh, v globokih termalnih vrelcih, v oceanih, v hrani in pijači, ... (Hendrix in sod., 1999). Pogosto je njihova sposobnost razmnoževanja omejena le na nekaj sevov, najdemo pa tudi bakteriofage s širokim spektrom delovanja, ki uničijo več vrst znotraj rodu. Po napadu sprostijo na stotine novih virusnih delcev in proces se ponavlja, dokler je prisotna gostiteljska bakterija (Connerton in sod., 2011).

Bakteriofagi so kot vsi virusi popolni paraziti. Imajo vse informacije za usmerjanje lastnega razmnoževanja v primernem gostitelju, nimajo pa lastnega metabolizma in ribosomov za izdelavo proteinov. So visoko specifični in imajo dolgoročno sposobnost preživetja in sposobnost hitrega razmnoževanja v primernem gostitelju. V primeru, da ni prisotnega primernega gostitelja, bakteriofagi lahko ohranijo infektivnost desetletja, razen če so poškodovani zaradi zunanjih dejavnikov (Calendar, 1988).

2.2.1 Taksonomija in zgradba bakteriofagov

Preko 5100 bakteriofagov je bilo pregledanih pod elektronskim mikroskopom, in od tega jih ima več kot 96 % rep. Mednarodni komite za taksonomijo virusov (ICTV) je razdelil bakteriofage v en red, 13 družin in 30 rodov. Družine so opredeljene glede na naravo njihove nukleinske kisline in morfologijo delcev. Bakteriofagi z repom pripadajo eni od treh filogenetsko sorodnih družin: *Myoviridae* s kontraktilnimi repi, ki so sestavljeni iz plašča in osrednje cevi (25 %), *Siphoviridae* z dolgimi ne kontraktilnimi repi (61 %) in *Podoviridae* s kratkimi repi (14 %) (Ackerman, 2003).

Bakteriofagni genom je sestavljen iz DNK ali RNK, obdan s proteinskim ali lipoproteinskim plaščem ali kapsido. Kapsida ima največkrat ikozaedrično obliko. Ikozaedrična glava se nadaljuje v tubolarni rep preko proteinskega kompleksa, ki ga imenujemo vrat. Večina bakteriofagov ima tubolarni rep, ki vsebuje elemente za prepoznavo bakterijskih receptorjev in elemente potrebne za sprostitev genoma iz virusne glave v bakterijsko citoplazmo. Na koncu repa so adsorpcijske strukture, ki sodelujejo pri prvi interakciji z gostiteljsko celico (Cuervo in Carrascosa, 2012; Adams, 1959).

2.2.2 Življenski cikel

Bakteriofage delimo v dve skupini glede na njihov življenski cikel: virulentni (litični) in temperatni (lizogeni). Virulentni fagi se lahko razmnožujejo samo z litičnim ciklom; fagni virion se adsorbira na površino gostiteljske celice, injecira genom in s tem prevzame metabolizem gostitelja in postavi molekularni mehanizem za proizvodnjo številnih novih bakteriofagov. Posledica je liza gostiteljske celice in sprostitev na stotine novih infektivnih delcev-ta proces se ponavlja toliko časa, dokler je prisotna bakterijska celica (Adams, 1959; Gutmann in sod., 2004). Temperatni bakteriofagi pa lahko sprožijo tako litični in

lizogeni cikel. Lizogeni cikel poteka tako, da bakteriofagi vstavijo DNK v gostiteljski genom in vzpostavijo mirujočo latentno fazo, kar imenujemo profag. V stanju mirovanja se prenašajo kot profag na hčerinske celice gostitelja. Občasno profag iz stanja mirovanja vstopi v litični cikel (Doermann, 1953; cit. po. Gutmann in sod., 2004). Za fagno terapijo se uporabljajo litični bakteriofagi, ker vedno povzročijo lizo bakterijske celice in tako sprostijo nove bakteriofage. Lizogeni bakteriofagi niso primerni za fagno terapijo, ker lahko inducirajo odpornost bakterij na nadaljnje infekcije (Cheetham in Katz, 1995).

2.2.3 Stopnje infekcije litičnega bakteriofaga

Infekcijski proces vključuje adsorpcijo, penetracijo, biosintezo in celično lizo. Prvi korak infekcije bakteriofagov z repi je adsorpcija. Posebne specializirane adsorpcijske strukture (beljakovinski repki, nitaste strukture) se vežejo na specifične površinske molekule na tarčni bakteriji. Pri G- bakterijah kot receptorji sodelujejo proteini, oligosaharidi in lipopolisaharidi (Gutmann in sod., 2004). Hitrost in učinkovitost adsorpcije se razlikujejo od sistema fag-gostiteljska celica in je odvisna od zunanjih dejavnikov in fiziološkega stanja gostitelja. Nekateri fagi za uspešno adsorpcijo potrebujejo kofaktorje Mg^{2+} in Ca^{2+} . Fiziološko stanje celice lahko vpliva na koncentracijo receptorjev na površini in tako vplivajo na učinkovitost infekcije s fagi (Brown in Anderson, 1969). Po ireverzibilni vezavi faga na celico se fagni genom prenese po repu v gostiteljsko celico in vključuje mehanizme prenosa DNK specifične za vsak fag. Bakteriofagna DNA v gostiteljski celici kodira spremembo bakterijskega metabolizma v sintezo bakteriofagnih delcev. Začetni korak vključuje prepoznavanje gostiteljeve RNK polimeraze, kar povzroči transkripcijo in translacijo bakteriofagne DNK in nastanka zgodnjih bakteriofagnih proteinov. Sledi transkripcija srednjih genov, ki sodelujejo pri replikaciji bakteriofagne DNK. Modifikacija bakterijske DNK polimeraze sproži transkripcijo poznih genov, ki kodirajo proteine glave in repa kot tudi encime, ki so vključeni v bakterijsko lizo (Gutmann in sod., 2004; Adams 1959). Končni korak je celična liza. Na čas lize vplivajo rastni pogoji in genetika. V bakterijsko lizo sta vključena dva encima: lizin cepi ključne vezi v peptidoglikanskem matriksu, holin združi pore v notranji membrani ob točno določenem času in omogoči lizinu, da doseže plast peptidoglikana in povzroči lizo (Wang in sod., 2003).

2.2.3.1 Kinetika bakteriofagne infekcije

Kinetiko bakteriofagne infekcije lahko opišemo z matematičnimi napovednimi modeli. Matematično modeliranje interakcij bakteriofag bakterija ima dolgo zgodovino. Campbell (1961) je bil prvi, ki je opisal matematični model-sistem diferencialnih enačb za opis sistema bakteriofag bakterije.

Krueger (1931) je pokazal da adsorpcija fagnih delcev na bakterijske celice, bodisi žive ali mrtve, sledi kinetiki prvega reda:

$$k = \frac{2,3}{Xt} \log \frac{P_o}{P} \quad \dots (1)$$

kjer je k adsorpcijska konstanta, X je koncentracija bakterijskih celic, t je časovni interval v katerem fagni titer pade od P_o (začetni) do P (končni). Če je reakcija adsorpcije fagnih delcev na gostiteljsko celico dobro opisana in znana že dolgo, pa to ne velja za ostale stopnje infekcije.

Dinamiko infekcije lahko opišemo kot adsorpijo fagnega delca na površino celice. V infecirani celici fagni potomci dozorijo/se sestavijo po določenem času faze mrka. Faza mrka je zamik med adsorpcijo in zorenjem prvega fagnega potomca znotraj gostiteljske celice (Ellis in Delbrück, 1939, Abedon in sod., 2001). Čas med adsorpcijo faga na celico in lizo celice imenujemo latentna perioda. S celično lizo se sprosti b število fagnih potomcev. Število sproščenih fagnih potomcev imenujemo burst size. V splošnem za fage velja, da je potreben čas za celoten cikel infekcije seštevek časa iskanja celice (t_s) in čas do lize celice (t_L). Generacijski čas je tako:

$$t_G = t_s + t_L \quad \dots (2)$$

Ob zaključku infekcije ene generacije, se sprosti b število fagnih potomcev. Stopnja fagne rasti se lahko opiše z (Wang in sod., 1996):

$$\frac{\ln(b)}{t_s + t_L} \quad \dots (3)$$

2.2.4 *Campylobacter* specifični bakteriofagi

Obstaja relativno malo podatkov o *Campylobacter* specifičnih bakteriofagih, najbrž zaradi zahtevnih rastnih pogojev gostiteljske bakterije. *Campylobacter* specifični bakteriofagi so bili izolirani iz iztrebkov brojlerjev, drobne perutnine in drugih virov kot so govedo, prašiči, odplake iz klavnic in kanalizacije (Salama in sod., 1989; Atterbury in sod., 2003). Znanih je več kot 170 *Campylobacter* specifičnih bakteriofagov. Glavnina jih ima litični življenski cikel, dvojno viačno DNK, rep z ikoziedrično glavo in spadajo v družino *Myoviridae* (Sails in sod., 1998).

2.2.5 Fagna terapija

Bruynoghe in Maisin sta leta 1921 kot prva uspela na področju fagne terapije. Uporabila sta bakteriofage za zdravljenje okužbe kože s stafilokokom pri ljudeh (Sulakvelidze in sod., 2001). Glavna prednost uporabe bakteriofagov za zdravljenje okužbe je njihova sposobnost razmnoževanja in posledično je potrebno manj doz bakteriofagov, v nasprotju z večkratnim jemanjem antibiotikov. Uporaba napačnih bakteriofagov ni problematična, ker bodo le ti sčasoma odmrli, zaradi odsotnosti gostitelja (Barrow in Soothil, 1997). Robustnost bakteriofagov omogoča, da jih lahko dodamo v pitno vodo ali krmo, če so tarča črevesni patogeni (Carvalho in sod., 2010). Prednost pri veterinarskih aplikacijah je zdravljenje skupine živali v zaprtem območju, ki omogoči bakteriofagom prenos na ostale živali (Smith in sod., 1987).

O uporabi fagne terapije pri zmanjšanju števila bakterij *C. jejuni* v piščančjem črevesju poročajo Loc Carrillo in sod. (2005). Brojlerje so tretirali s fagnim pripravkom in dosegli zmanjšanje števila bakterij *C. jejuni* za 1 do 4 log₁₀ CFU/g. Carvalho in sod. (2010) so testirali učinkovitost fagnega koktejla sestavljenega iz treh različnih fagov na perutnino okuženo z bakterijo *Campylobacter coli* (*C. coli*) in *C. jejuni*. Fagni koktejl je zmanjšal število bakterij *C. coli* in *C. jejuni* za približno 2 log₁₀ CFU/g.

Za uspešnost fagnih terapij je potrebno zagotoviti v produktu dovolj veliko koncentracijo fagov. Količina fagov v enem odmerku naj bi po nekaterih podatkih bila med 10⁶-10¹³ PFU/kg telesne teže/dan. Za pokritje potreb pacienta potrebujemo velike volumne fagnega pripravka. Veliki volumni in nizke koncentracije potegnejo za sabo povečane stroške proizvodnje. Višji proizvodnimi izkoristki na industrijskem nivoju bi pomenili večjo dostopnost fagne terapije (Bunajover, 2003).

2.2.6 Proizvodnja bakteriofagov v velikem merilu

Povečan interes za bakteriofage, kot terapevtske ali protimikrobne agense in namera za komercialno distribucijo fagov ali fagnih izdelkov, zahteva proizvodnjo bakteriofagov v velikem merilu, ki ni mogoča s klasično metodo namnoževanja bakteriofagov v trdnem gojišču na petrijevih ploščah. Proizvodnja bakteriofagov je mogoča v bioreaktorjih, kjer pomembno vlogo igrata kontrola in optimizacija procesa. Priporočila dobre proizvodne prakse zahtevajo razvoj metode, ki zagotavlja, da so fagni produkti visoko čisti, brez bakterij, toksinov, pirogenov in ostalih škodljivih substanc (Carla in sod., 2012).

Litični življenjski cikel bakteriofaga je temelj za namnoževanje terapevtskih bakteriofagov v bioreaktorjih. Na uspešen proces infekcije vpliva tako uspešna rast gostiteljske celice, kot produkcija fagov (Sauvageau in Cooper, 2010). Eisenstark (1967) navaja, da so ključni

parametri teh bioprocесов: izbira občutljivega gostitelja, temperatura, pH, sestava medija, prezračevanje; vključujejo pa tudi specifične parametre, kot je koncentracija gostitelja in razmerje med številom bakteriofagov in bakterij, ki imata pomembno vlogo v dinamiki populacije in pogosto narekujeta rezultat infekcije. Za proizvodnjo *Campylobacter* specifičnih bakteriofagov izberemo tako sestavo gojišča, temperaturo, pH in zahteve po kisiku, ki so optimalni za rast bakterij rodu *Campylobacter* in so opisani v poglavju 2.1.1.

2.2.6.1 Vpliv koncentracije bakterijskih celic

Uspešnost razmnoževanja bakteriofagov je odvisna od koncentracije gostitelja. Število bakteriofagov lahko naraste samo v primerih, ko je bakterijska koncentracija dovolj velika (Cairns in sod., 2009). Wiggins in Alexander (1985) sta eksperimentalno določila mejno koncentracijo bakterij okoli 10^4 CFU/ml, ki je potrebna za namnoževanje bakteriofagov. Sargeant in sod. (1968) so namnoževali bakterijsko kulturo do visoke celične gostote in jo nato infecirali z bakteriofagom T7. Pričakovali so, da večja kot je bakterijska koncentracija pri infekciji, večje bo število sproščenih potomcev bakteriofaga. Ugotovili so, da število fagov narašča z gostoto celic, vendar le do določene celične gostote. Izkoristki so začeli padati, ko je gostota celic narasla nad 10^{10} CFU/ml, najbrž zato, ker gostitelj porabi vsa esencialna hranila, preden pride do popolne lize celic.

2.2.6.2 Vpliv časa infekcije in multipliciteta infekcije

Na uspešnost procesa vplivata tudi čas infekcije gostiteljske kulture in razmerje med bakteriofagi in bakterijskimi celicami. Multipliciteta infekcije (MOI) podaja razmerje med številom virusnih delcev in številom bakterijskih celic. Ob času infekcije moramo poznati titer bakteriofagov in bakterij, da lahko dosežemo želeno razmerje (Ellis in Delbrück, 1939; Gutmann in sod., 2004).

Sambrook in sod. (1989) navajajo dva načina namnoževanja v večjem merilu. Pri prvem primeru okužbo izvedemo v manjšem volumnu tako, da koncentracijo celic z 10^9 CFU/ml okužimo s fagno suspenzijo z 10^7 PFU/ml in nato mešanico prenesemo v večji volumen svežega gojišča. Proses ustavimo po 8-12 urah inkubacije. Drugi način namnoževanja pa predvideva inokulacijo svežega gojišča z 1 ml prekonočne bakterijske suspenzije in inkubacijo do eksponentne faze in šele nato dodatek fagne suspenzije z 10^{10} PFU/ml. Inkubacija je dolga 3-5 ur. Kultura je v eksponentni fazni najbolj občutljiva za napad virusov, pride do hitre lize celice in dviga števila virusnih delcev (Bujanover, 2003.)

Stanley in sod. (2010) so optimizirali gojenje bakteriofaga M13 v 2 l bioreaktorju. Ugotovili so, da končni titer ni odvisen od MOI, pač pa je za dosego končnega titra potreben daljši čas pri nižjem MOI. Siquet in Calberg (1973) sta ugotovila, da produkcija

bakteriofaga $\phi \times 174$ v 20 l in 200 l bioreaktorju, da relativno dobre končne titre pri nizki MOI. Uporabila sta MOI 0,1 in 0,01.

2.3 NAMNOŽEVANJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU

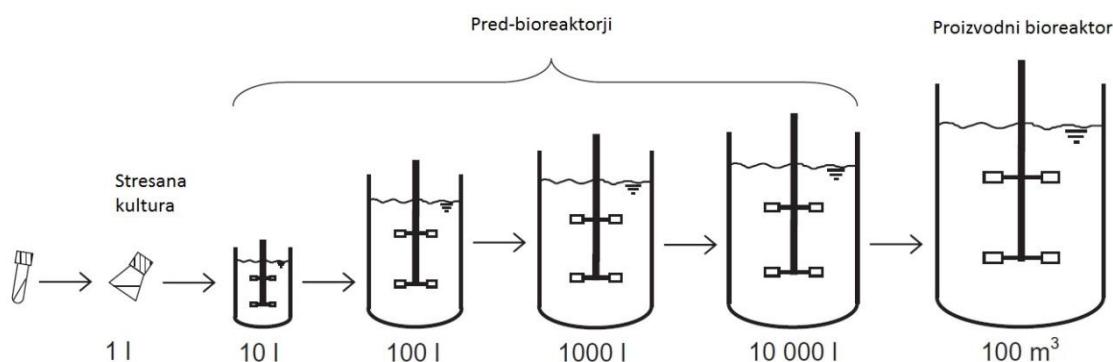
Submerzno kultivacijo ali kultivacijo kulture v tekoči fazi uvrščamo med najlažje vodljive bioprocese v biotehnologiji. Ti bioprocеси imajo prednost pred ostalimi tipi kultivacije, saj so razmere v bioreaktorju najbližje optimalnim. V grobem približku jih lahko štejemo za homogene. Tak pristop olajša postavljanje samega modela bioprosesa in njegovo tolmačenje. V praksi pa nam omogoča merjenje merljivih spremenljivk v samem sistemu s serijo elektrod, kar v mnogih nehomogenih sistemih ni mogoče (Raspor in Smole-Možina, 1993).

2.3.1 Bioprocес z enkratnim polnjenjem

Pri bioprocесu z enkratnim polnjenjem (šaržni, zaprt bioprocес) medij v bioreaktorju inokuliramo z mikrobnou kulturo, t.i. starter kulturo. Bioprocес traja določen čas, po končanem bioprocесu pa produkt poberemo (harvest). Zaprti bioprocес je proces pri katerem v bioreaktor na začetku dodamo reaktante in na koncu odvzamemo iz njega produkte. Pri tem procesu volumen ostane konstanten (Pavko, 1996). Zaprti proces je daleč najpogosteji način proizvodnje bakteriofagov z volumni od nekaj deset ml, do več deset litrov. Prednosti zaprtega procesa so visoka robustnost, enostavna kontrola in možnost določitve prvotnih pogojev infekcije, ki se nato ohranjajo s konstantnimi vrednostmi iz serije v serijo. V splošnem proizvodnja pod takimi pogoji vodi do ponovljivih in visokih bakteriofagnih titrov. Zaprti proces pa ima tudi nekatere pomanjkljivosti, in sicer razmeroma dolg časovni interval med koncem ene šarže in pričetkom nove, zaradi raznih priprav, čiščenja in sterilizacij (Sauvageau, 2010).

2.3.1.1 Večstopenjska generacija inokuluma

Industrijski zaprti bioprocеси lahko potekajo pri velikih proizvodnih volumnih (150-250 m³). Kadar imamo opravka z velikim proizvodnim volumnom je smiselna priprava inokuluma v več zaporednih stopnjah, kjer vsako naslednjo fazo inokuliramo s 5-10 % delovnega volumna bioreaktorja. Ta strategija zagotavlja optimalno uporabo produksijskega bioreaktorja z zmanjšanjem trajanja bioprocесa (Christi, 2010).



Slika 2: Večstopenjska generacija inokuluma za proizvodni bioreaktor (Christi, 2010). Starter kultura se uporabi za inokulacijo trdnega gojišča oz. za stresano kulturo. Po uspešni rasti se kultura uporabi za inokulacijo pred-bioreaktorja.

2.3.2 Mikrobna rast

Mikrobna rast v na novo inokuliranem zaprtem bioprocесu ima običajno naslednje faze. V lag fazi (faza prilagajanja) koncentracija celic ostane konstantna. Dolžina lag faze je odvisna od količine kulture uporabljenne za inokulum, fiziološkega stanja inokuluma in sprememb glede na predhodno gojenje (sestava gojišča, okoljski pogoji). Za visoko produktivnost sistema mora biti dolžina lag faze čim krajsa. Krajši čas za prilagoditev kulture dosežemo, ko so okoljski pogoji in sestava gojišča enaki v inokulumu kot v bioreaktorju, ko uporabimo veliko količino inokuluma in s tem zmanjšamo redčitveni šok in ko so celice v inokulumu v pozni eksponentni fazi rasti. Sledi eksponentna faza rasti, kjer se kultura razmnožuje s konstantno maksimalno specifično hitrostjo in celična biomasa narašča eksponentno. Stacionarna faza nastopi, ko se kultura zaradi pomanjkanja hranilnih snovi ali nakopičenja zaviralnih metabolitov ne more več razmnoževati. Fazo odmiranja povzroči stradanje in vedno več celic odmre ali razpade (Madigan in sod., 2000; Panikov, 1995).

2.3.2.1 Kinetika rasti v zaprtem bioprocесu

Slator je leta 1916 vpeljal mikrobno rastno konstanto, μ . Med eksponentno fazo rasti v dobro premešanem zaprtem bioreaktorju se koncentracija biomase spreminja po času:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \dots (4)$$

kjer je X koncentracija biomase pri času t , in μ je specifična hitrost rasti. Z integriranjem zgornje enačbe dobimo:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad \dots (5)$$

kjer je X_0 koncentracija biomase na začetku eksponentne rasti (Panikov, 1995; Paš in Raspor 2010). Podvojitveni oz. generacijski čas med eksponentno fazo rasti izračunamo po enačbi (Kelly in Rahn, 1932; cit. po Panikov, 1995):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \dots (6)$$

2.3.3 Bioreaktorji z mehanskim načinom mešanja

To skupino bioreaktorjev povezuje mehanski način mešanja bioprosesne brozge. Tipični predstavnik te skupine je mešalni bioreaktor. Reaktor je opremljen z več enakimi ali različnimi mešali na isti osi. Tipični bioreaktorji za submerzno kultivacijo so sestavljeni iz: reakcijske posode, plašča, izolacije, zaščitnega plašča, mesta za inokulacijo, s porti s senzorji za merjenje pH, temperature in kisika, mešala, razpršilca plina, mehanskih tesnil, motorja, šobe za žetev, mesta za vzorčenje s paro, steklene odprtine, odprtine za protipenilec, vstopnega mesta za plin, pokrova (Christi, 1992).

2.3.4 Razapljanje kisika

Pri mnogih bioprosesnih postopkih je razapljanje kisika stopnja, ki omejuje globalno hitrost procesa in s tem učinkovitost bioreaktorja (Doran, 1995). Zaradi zelo nizke topnosti kisika v vodi in drugih bioprosesnih medijih je glavni upor proti prenosu kisika v tekoči fazi. Zato lahko snovni tok kisika iz zraka v dobro premešan bioreaktor zapišemo z enačbo:

$$N_A = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad \dots (7)$$

kjer je N_A hitrost prenosa kisika na volumensko enoto brozge ($\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$), k_L je koeficient snovne prestopnosti v tekočini (m s^{-1}), a je stična površina med plinom in tekočino na volumensko enoto brozge ($\text{m}^2 \text{m}^{-3}$), C_{AL}^* 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).

Glede na podatke iz tabele (International ... , 2003) in ob upoštevanju Henryjevega zakona je topnost kisika v vodi pri tlaku zraka 1 atm in temperaturi 25 °C $8,69 \times 10^{-3}$ kgm $^{-3}$. Te vrednosti ni mogoče neposredno povezati z bioprocесним sistemom, saj ima pomemben vpliv na topnost kisika sestava medija (Hoffman in Goodman, 1982).

2.3.4.1 Poraba kisika v aerobnih procesih

Celice med aerobno kultivacijo porabljam kisik iz medija. Hitrost prenosa kisika iz plina v tekočino je lahko pri aerobnih procesih omejitvena stopnja celotnega biotehnološkega postopka. Intenzivnost porabe kisika v bioprocеснем sistemu je odvisna od koncentracije, vrste organizma, od fiziološke aktivnosti in od vira ogljika v mediju (Paš in Raspor, 2010; Doran, 1995). V bioprocесu z enkratnim polnjenjem se hitrost porabe kisika spreminja s časom zaradi vedno večje koncentracije celic. Specifična hitrost porabe kisika je hitrost porabe kisika na celico in je odvisna predvsem od biokemijske narave celice in od njene okolje. Hitrost porabe kisika na volumensko enoto brozge Q_O (mol O₂ m $^{-3}$ s $^{-1}$) lahko zapišemo kot:

$$Q_O = q_O X \quad \dots (8)$$

X koncentracija celic (g m $^{-3}$), q_O je specifična hitrost porabe kisike (mol O₂ g $^{-1}$ biomase $^{-1}$ s $^{-1}$).

Razliko med vnosom kisika v brozgo in porabo kisika z respiratornim celicam lahko zapišemo z naslednjo enačbo (Doran, 1995):

$$\frac{dc}{dt} = k_L a(C_{AL}^* - C_{AL}) - q_O X \quad \dots (9)$$

2.3.4.2 Merjenje raztopljenega kisika

Koncentracijo raztopljenega kisika v bioreaktorjih spremljamo s senzorjem za merjenje kisika (kisikova oziroma pO₂ elektroda). Kisikova elektroda je sestavljena iz polprepustne membrane in elektrolita z anodo in katodo. Kisik difundira skozi film tekočine na zunanj strani tik ob membrani ter nato skozi polprepustno membrano v notranjost senzorja, kjer poteče elektrokemijska reakcija. Izhodni električni tok je proporcionalen snovnemu toku kisika do katode, torej njegovi aktivnosti oziroma parcialnemu tlaku, zato izraz koncentracija kisika pomeni parcialni tlak kisika. Za pretvorbo parcialnega tlaka kisika v mediju je potrebno poznati topnost kisika v tekočini pri temperaturi in tlaku merjenja (Paš in Raspor, 2010; Doran, 1995).

2.3.4.3 Eksperimentalno določanje k_{LA}

V sistemih, ki vključujejo prenos snovi je v splošnem težko določiti kontaktno medfazno površino (a). Kontaktna medfazna površina je odvisna od velikosti in števila mehurčkov, na to pa vplivajo številni faktorji (sestava medija, hitrost mešanja, pretok plina). V praksi poenostavimo in določamo produkt k_{LA} , volumenski koeficient snovnega prestopa oziroma prenosa kisika. Koeficient lahko ocenimo na podlagi empiričnih korelacijskih iz literature, a je le na oceni korelacij težko napovedati dejanski k_{LA} v določenem bioreaktorju, zato koeficient k_{LA} običajno določamo eksperimentalno (Paš in Raspot, 2010; Doran, 1995).

Določanje k_{LA} v bioreaktorju je pomembno pri bioprocесih, kjer je potrebno zagotoviti dovolj raztopljenega kisika v bioprocесni brozgi. Na velikost k_{LA} vplivajo mehurčki, prepohovanje, mešanje in sestava medija. Za eksperimentalno določanje k_{LA} obstajajo številne metode. Pri izbiri metode moramo upoštevati uporabljen sistem za prezračevanje in mešanje, tip bioreaktorja, sestavo medija in vpliv mikroorganizmov (če so le ti prisotni) (Paš in Raspot, 2010; Doran, 1995).

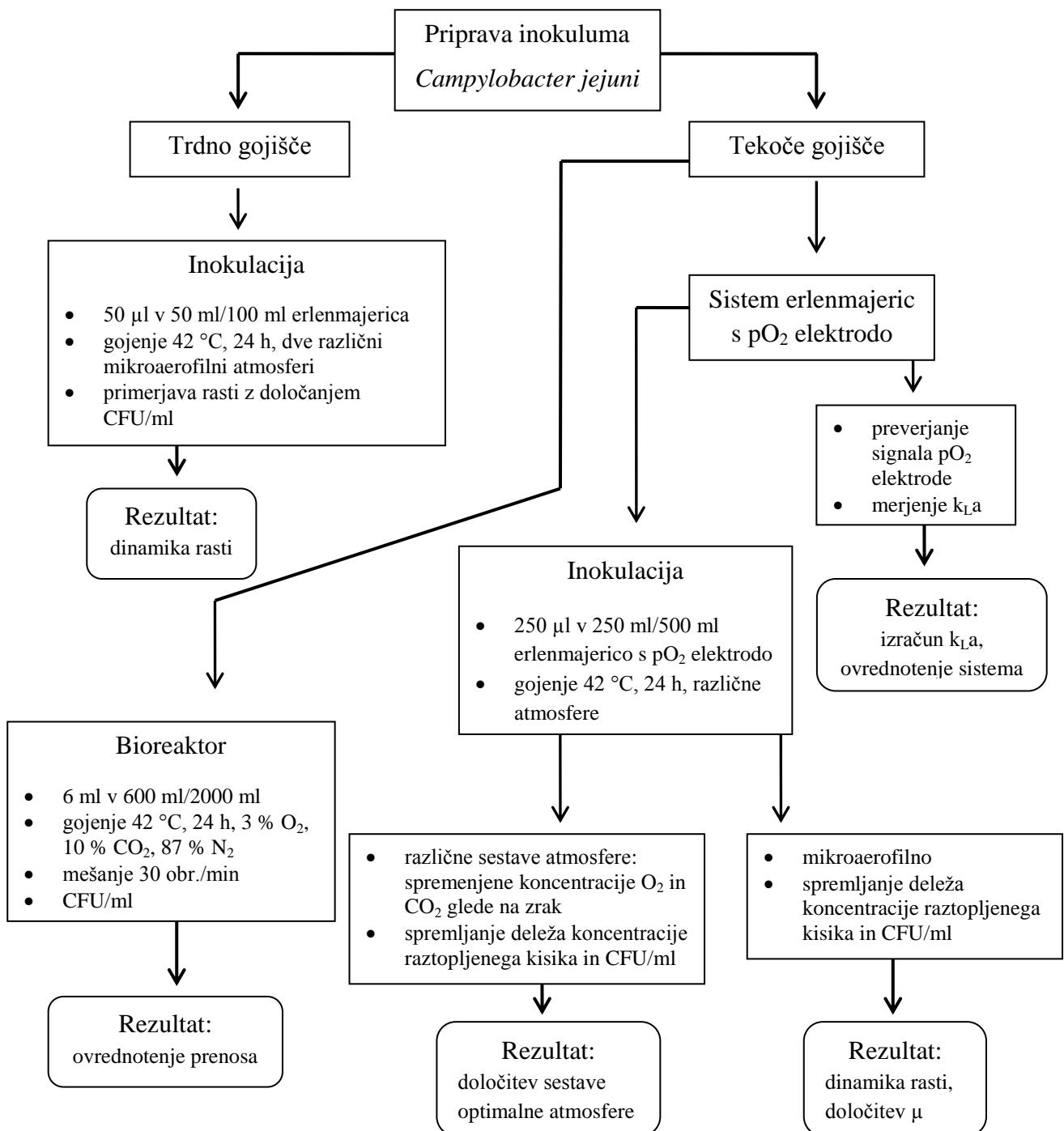
Statično razplinjevalno metodo je prvi opisal Wise (1951). Koncentracijo kisika v tekočini (voda, medij) znižamo s prepohovanjem tekočine z dušikom in vrednost raztopljenega kisika se približajo ničli. Deoksigenirano tekočino nato prepohujemo in povečanje koncentracije raztopljenega kisika merimo s kisikovo elektrodo. Povečanje koncentracije raztopljenega kisika opišemo z enačbo:

$$\ln(C_{AL}^* - C_{AL}) = -k_L a t \quad \dots (10)$$

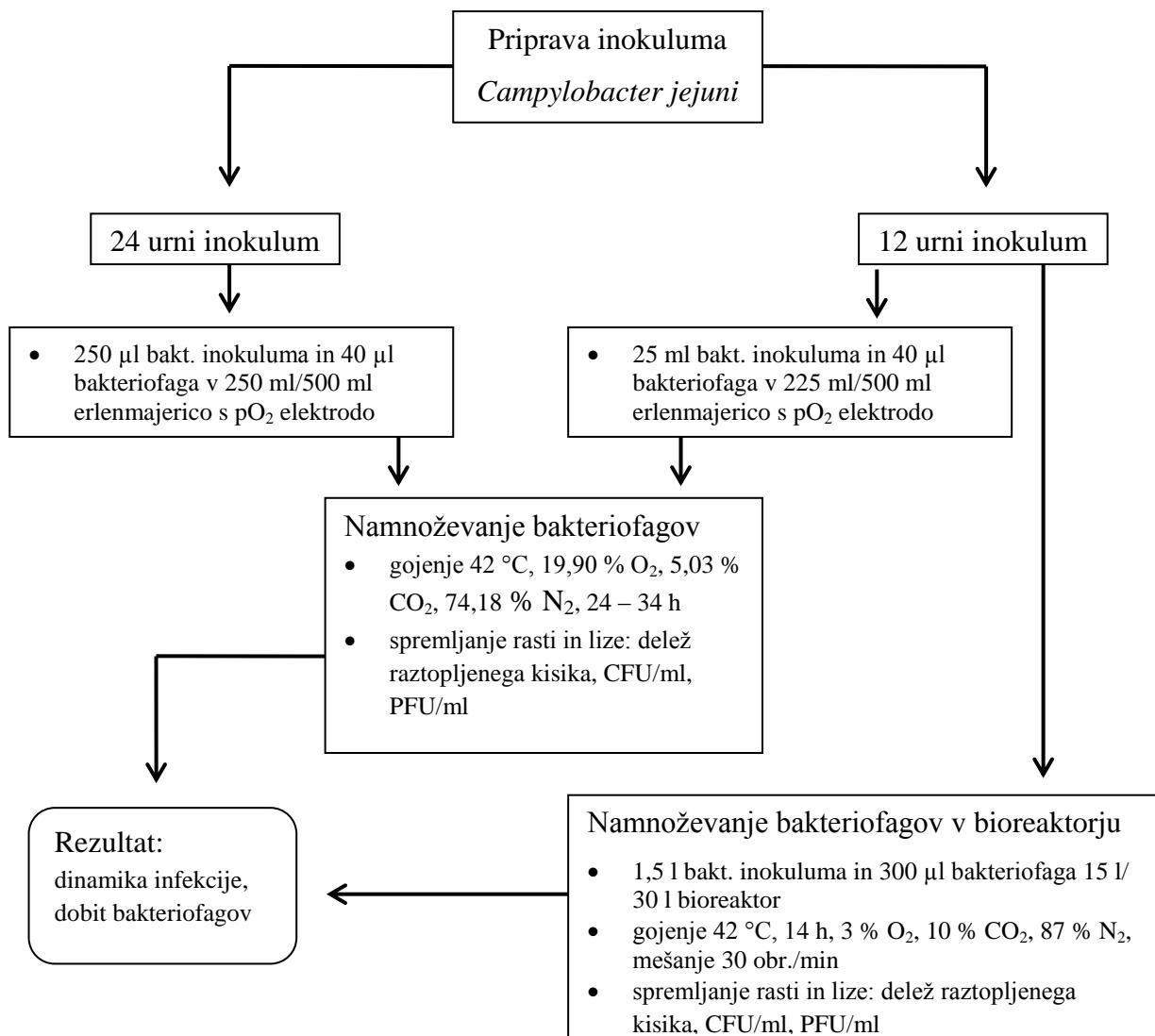
Grafični prikaz $\ln(C_{AL}^* - C_{AL})$ v odvisnosti od časa je premica, kjer je naklon enak $-k_{LA}$. Prednost te metode je, da je precej hitra-običajno traja 20 min. Metoda je uporabna za majhne volumne bioreaktorja, v velikih bioreaktorjih pa so omejitve zaradi zadrževalnih časov plina (Zhang, 2003).

3 MATERIALI IN METODE

V magistrskem delu smo uporabili različne materiale in metode, ki so opisane v pričujočem poglavju. Hodogram na sliki 3 prikazuje poskuse za prvi cilj naloge in hodogram na sliki 4 prikazuje poskuse za drugi cilj naloge.



Slika 3: Hodogram poskusa optimizacije rasti bakterije *C. jejuni*.

Slika 4: Hodogram poskusa namnoževanja bakteriofagov na gostiteljski bakteriji *C. jejuni*.

3.1 MATERIALI

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili spodaj naveden material za optimizacijo rasti bakterije *Campylobacter jejuni*, optimizacijo namnoževanja bakteriofagov in namnoževanja bakteriofagov v bioreaktorju.

3.1.1 Bakterijski sev

Pri eksperimentih smo uporabili bakterijski sev *Campylobacter jejuni* LBA65 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.1.2 Bakteriofag PC5

Uporabili smo litični bakteriofag PC5 iz zbirke Laboratorija za bioanalitiko (LBA).

3.1.3 Rastna gojišča za bakterije rodu *Campylobacter*

Za revitalizacijo, kvantifikacijo in spremljanje rasti bakterij rodu *Campylobacter* smo uporabili naslednja gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca.

3.1.3.1 Columbia krvni agar

Columbia krvni agar (Ellner in sod. 1966, cit. po The Oxoid ... , 2009; Skirrow, 1977) smo pripravili tako, da smo 19,5 g osnovnega medija (Oxoid: CM271) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali 15 min pri 121 °C in tlaku 1,2 bar. Gojišče smo ohladili na 50 °C in dodali 25 ml sterilne defibrilirane konjske, dodatek za rast (*Campylobacter* growth supplement, Oxoid: SR23E) in selektivnost (*Campylobacter* selective supplement, Oxoid: SR069). Gojišče smo razlili na petrijeve plošče (90 mm) in shranili na 4 °C do uporabe.

3.1.3.2 Abeyta-Hunt-Bark agar

Abeyta-Hunt-Bark agar (AHB) (Hunt in sod., 2001) smo pripravili tako, da smo 23,5 g osnovnega medija (AHB) (Oxoid: CM1136) in 1 g kvasnega ekstrakta raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo ohladili na 50 °C in dodali dodatek za rast in 5 ml 1 % raztopino TTC. Gojišče smo razlili na petrijeve plošče (90 mm in 70 mm) in shranili na 4 °C do uporabe.

3.1.3.3 Možgansko-srčni infuzijski bujon

Za shranjevanje sevov smo uporabili tekoče gojišče možgansko-srčni infuzijski bujon (BHI) (Rosenow, 1919, cit. po The Oxoid ... , 2009). Gojišče smo pripravili tako, da smo 18,5 g osnovnega medija (Merck: 1.10493.0500) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo ohladili na 50 °C in ga shranili na 4 °C do uporabe.

3.1.3.4 *Campylobacter* selektivni agar

Gojišče *Campylobacter* selektivni agar (CCDA) (Bolton in sod., 1984; Hutchinson in Bolton, 1984) smo pripravili tako, da smo 22,75 g osnovnega medija (Oxoid: CM0739) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo ohladili na 50 °C in dodali dodatek za selektivnost (CCDA, Oxoid: SR0155). Gojišče smo razlili na petrijeve plošče (90 mm) in shranili na 4 °C do uporabe.

3.1.3.5 Mueller Hinton bujon

Gojišče Mueller Hinton bujon (MHB) (Mueller in Hinton, 1941) smo pripravili tako, da smo 5,25 g osnovnega medija (Oxoid: CM0405) zatehtali v 500 ml erlenmajerice in dodali 250 mL deionizirane vode oz. tako, da smo zatehtali 10,5 g in dodali 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo shranili na 4 °C do uporabe.

Gojišče MHB za namnoževanje bakteriofagov (CMHB) smo modificirali z dodatkom dveh reagentov. Dodali smo 5 µl na ml 2 M MgSO₄ založne raztopine (končna koncentracija je 10 mM MgSO₄) in 1 µl na ml 1 M CaCl založne raztopine (končna koncentracija 1 mM CaCl).

3.1.4 Gojišča za namnoževanje in kvantifikacijo bakteriofagov

Za namnoževanje bakteriofagov smo uporabili gojišče CMHB, za kvantifikacijo bakteriofagov smo uporabili spodaj opisana gojišča. Gojišča smo pripravili po navodilih proizvajalca. Za pripravo redčitev za kvantifikacijo bakteriofagov smo uporabili solno magnezijev pufer.

3.1.4.1 NZCYM osnovni agar

Novozelandski kazamino kvasni (NZCYM) osnovni agar (Blatter in sod., 1977) smo pripravili tako, da smo 11 g NZCYM bujona (Sigma: N3643) in 6 g agarja (Sigma: A5054) (1,2 % w/v vsebnost agarja) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo razlili na petrijeve plošče (70 mm) in shranili na 4 °C do uporabe.

3.1.4.2 NZCYM mehki agar

Novozelandski kazamino kvasni (NZCYM) mehki agar (Blatter in sod., 1977) smo pripravili tako, da smo 11 g NZCYM bujona (Sigma: N3643) in 3,5 g agarja (Sigma: A5054) (0,7 % w/v vsebnost agarja) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo razdelili po 3 ml oz. 5 ml v 15 ml centrifugirke in ga shranili na 60 °C do uporabe.

3.1.4.3 Solno magnezijev pufer

Solno magnezijev (SM) pufer smo pripravili tako, da smo zatehtali 5,8 g NaCl (Merck: 1.06404.1000) in 1 g želatine (Sigma: 48723), dodali 4 ml 2 M MgSO₄ založne raztopine (Sigma: M2643), in 50 ml 1 M Tris (Merck: 1.08382.1000) in dopolnili do 1000 ml z

deionizirano vodo. Pufer smo sterilizirali. Ohlajen pufer smo v brezprašni komori razdelili po 50 ml v centrifugirke in shranili na 4 °C do uporabe.

3.1.5 Priprava reagentov

1 % TTC: 1 g TTC smo raztopili v 100 ml deionizirani vodi. 2 M magnezijev sulfat ($MgSO_4$): zatehtali smo 24,07 g $MgSO_4$ in raztopili v 100 ml deionizirane vode. 1 M kalcijev klorid ($CaCl_2$): zatehtali smo 11,1 g $CaCl_2$ in raztopili v 100 ml deionizirane vode. V brezprašni komori smo tako pripravljene raztopine filtrirali skozi 0,22 μm filter in shranili do uporabe na 4 °C.

3.1.6 Druge kemikalije

- set za barvanje po Grammu (Merck);
- 1 % uracil;
- deionizirana voda (dH_2O);
- 70 % etanol (Sigma).

3.1.7 Laboratorijski pribor in oprema

Splošni laboratorijski material:

- avtomatske pipete (Eppendorf);
- nastavki za avtomatske pipete (Sarstedt, Biospectra);
- 1,5 ml centrifugirke (Sarstedt);
- 15 in 50 ml centrifugirke (Sterlin);
- plastične cepilne zanke (Labortechnika Golias);
- petrijeve plošče (Labortechnika Golias);
- mikrotitrskie plošče (Iwaki);
- vrečke za mikroaerofilno atmosfero (Oxoid);
- vata (Sanolabor);
- laboratorijska steklovina (Duran);
- incidin in spitaderm (Ecolab);
- rokavice (Kimberly Clark) in laboratorijski plašč (Dastex).

Laboratorijska oprema:

- brezprašna komora (Iskra PIO);
- pH meter (Mettler toledo);
- tehnicka (Tehnicka Železniki);
- CO_2 inkubator, 42 °C (Sanyo);

- vodna kopel (Kambič WB-30);
- hladilnik (Gorenje, Bosch, Zanussi);
- zamrzovalnik, -80 °C (Heto Ultra Freeze);
- vrtinčnik (Tehnica Železniki);
- plinska jeklenka z mešanico plina 3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % (Istrabenz) in s CO₂ oz. N₂ (Istrabenz);
- anaerobni lonec (Oxoid, Ago 25A);
- centrifuga (Eppendorf);
- čitalec (Bioteck);
- programska oprema: MS Office; Gen5; MSHAKER;
- avtoklav (Sutjeska, SU 30);
- magnetno mešalo (Tehnica Železniki).

Oprema za gojenje kulture in namnoževanje bakteriofagov:

- večkanalni merilnik pH in kisika s programsko opremo MSHAKER (model: Monitshaker) in erlenmajerice s pH in pO₂ elektrodo (proizvajalec: BIA Podjetje za laboratorijsko in procesno opremo d.o.o.);
- laboratorijski bioreaktor domače izdelave sestavljen iz 2 l steklenice (Duran), mešala, mesta za inokulacijo in mesta za vzorčenje (Jafral d.o.o);
- 30 l bioreaktor Techfors S s programsko opremo SW Iris V5 (proizvajalec Infors HT) in povezan s sprekrotfotometrom (Iskra MA 9510).

3.2 METODE

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili metode, ki so plod dela raziskovalcev Laboratorija za bioanalitiko oz. smo jih vzeli iz literature in modificirali.

3.2.1 Priprava delovne banke bakterije *C. jejuni* LBA65

Bakterijski sev *C. jejuni* LBA65 je trajno shranjen v krionepruvetah pri -80 °C. Kulturo smo v brezprašni komori s cepilno zanko prenesli na plošče Columbia. Plošče smo inkubirali 24 h pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Po končani inkubaciji smo kulturo postrgali in resuspendirali v mešanici za shranjevanje vzorcev. Ena plošča kulture ustreza pripravi 1 ml mešanice, ki vsebuje: 0,2 ml 50 % glicerola, 0,6 ml BHI in 0,2 ml defibrilirane konjske krvi. Mešanico smo premešali in jo razdelili po 150 µl v krionepruvete.

3.2.2 Revitalizacija bakterij

Bakterijski sev *C. jejuni* LBA65 iz delovne banke smo v brezprašni komori s cepilno zanko prenesli na plošče Columbia in plošče inkubirali (24 h, 42 °C, mikroaerofilno).

3.2.3 Priprava inokuluma

Inokulum iz trdnega gojišča: Kulturo iz plošče Columbia smo postrgali v gojišče MHB do optične gostote 5.

Inokulum iz prekonočne kulture (24 urna kultura): Kulturo iz plošče Columbia smo resuspendirali v 50 ml gojišča MHB v erlenmajerici do optične gostote 0,090 do 0,120 in inkubirali (18-24 h, 42 °C, mikroaerofilno).

12 urni inokulum: Kulturo smo pripravili po postopku za prekonočno kulturo in po končani inkubaciji precepili 50 µl kulture v novo erlenmajerico s 50 ml gojišča in inkubirali (8-12 h, 42 °C, mikroaerofilno).

3.2.4 Metoda štetja kolonij

Z metodo štetja kolonij smo določali število kolonijskih enot (CFU/ml) v inokulumu in spremljali rast med gojenjem. Za preiskovane vzorce smo pripravili želene redčitve po Kochu. Redčitve smo prenesli na plošče z gojiščem AHB tako, da smo po trikrat odpipetirali 10 µl ustrezne redčitve na predhodno označeno mesto na plošči. Po končani inkubaciji (24 h, 42 °C, mikroaerofilno) smo prešteli kolonije in izračunali CFU/ml pri posamezni redčitvi po naslednji enačbi (ISO 4883, 1991):

$$N = \frac{\Sigma CxR}{0,01} \quad \dots (11)$$

Legenda:

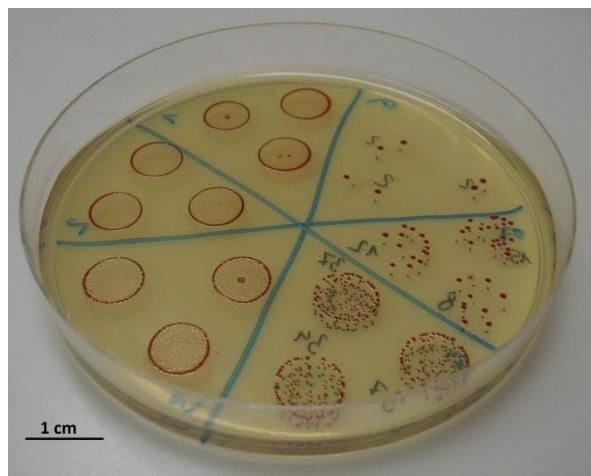
N: koncentracija celic (CFU/ml)

ΣC: povprečje vsote kolonij (delali smo v triplikatih)

R: redčitev

0,01: volumen vzorca v ml

Končno koncentracijo celic v CFU/ml smo izračunali kot povprečje N pri vseh števnih ploščah pri različnih redčitvah. Za števne plošče smo upoštevali število kolonij od 3 do 35.



Slika 5: Primer plošče AHB s triplikati posameznih redčitev *C. jejuni*.
Na sliki so razvidne števne in neštevne redčitve.

3.2.5 Priprava delovne banke bakteriofaga PC5

Bakteriofag PC5 smo namnožili s tako imenovano metodo »konfluentnih plošč«, ki smo jo modificirali po Adamsu (1959). Bakteriofag PC5 iz delovne banke Laboratorijsa za bioanalitiko smo redčili do 10^6 PFU/ml in ga razdelili po 100 μl v mikrocentrifugirke. Bakterijsko kulturo iz plošče Columbia smo resuspendirali v gojišču CMHB do optične gostote 2,5 in jo inkubirali 90 min, 42 °C, aerobno. Po končani inkubaciji smo 100 μl bakterijske kulture prenesli v mikrocentrifugirke k 100 μl PC5, dobro premešali na vrtinčniku in inkubirali 15 min, 42 °C, aerobno. Po inkubaciji smo vsebino mikrocentrifugirke odpipetirali v 5 ml NZCYM mehkega agarja, premešali na vrtinčniku in vsebino zlili na plošče NZCYM agar 90 mm. Suhe plošče smo inkubirali 24 h, 42 °C, mikroaerofilno. Na plošče smo dodali po 3 ml pufra SM, jih ovili s parafilmom in inkubirali na stresalniku pri 100 obr./min, 24 h, na sobni temperaturi, aerobno. Naslednji dan smo s pipeto pobrali pufer SM, kamor so se izločili bakteriofagi. Bakteriofagno suspenzijo smo centrifugirali 10 min pri 8000 g in jo filtrirali skozi 0,22 μm filter. S tem korakom smo odstranili ostanke bakterijskih celic in delno ostanke agarja. Bakteriofag PC5 smo razdelili v krioepruvete in shranili na -80 °C do uporabe. Tako pripravljenemu bakteriofagu smo določili titer (PFU/ml) z metodo štetja plakov.

3.2.6 Metoda štetja plakov

Z metodo štetja plakov smo določili titer bakteriofagov (PFU/ml). Uporabili smo modificirano metodo po Adamsu (1959). Za preiskovane vzorce smo pripravili želene redčitve po Kochu in jih odpipetirali po 100 μl v mikrocentrifugirke in dodali 100 μl prekonočne bakterijske kulture. Mikrocentrifugirke smo premešali in jih inkubirali 15 min, 42 °C, aerobno. Po inkubaciji smo vsebino mikrocentrifugirke odpipetirali v 3 ml NZCYM mehkega agarja, premešali in vsebino zlili na plošče NZCYM agar 70 mm. Po končani

inkubaciji (24 h, 42 °C, mikroaerofilno) smo prešteli plake in izračunali PFU/ml po naslednji enačbi:

$$N = \frac{\Sigma CxR}{0,1} \quad \dots (12)$$

Legenda:

N: koncentracija bakteriofagov (PFU/ml)
ΣC: povprečje plakov (delali smo v paralelkah)
R: redčitev
0,1: volumen vzorca v ml

Končni titer bakteriofagov v PFU/ml smo izračunali kot povprečje N pri vseh števnih ploščah pri različnih redčitvah. Za števne plošče smo upoštevali število plakov od 30 do 300.

3.2.7 Priprava mrežic za presevno elektronsko mikroskopijo

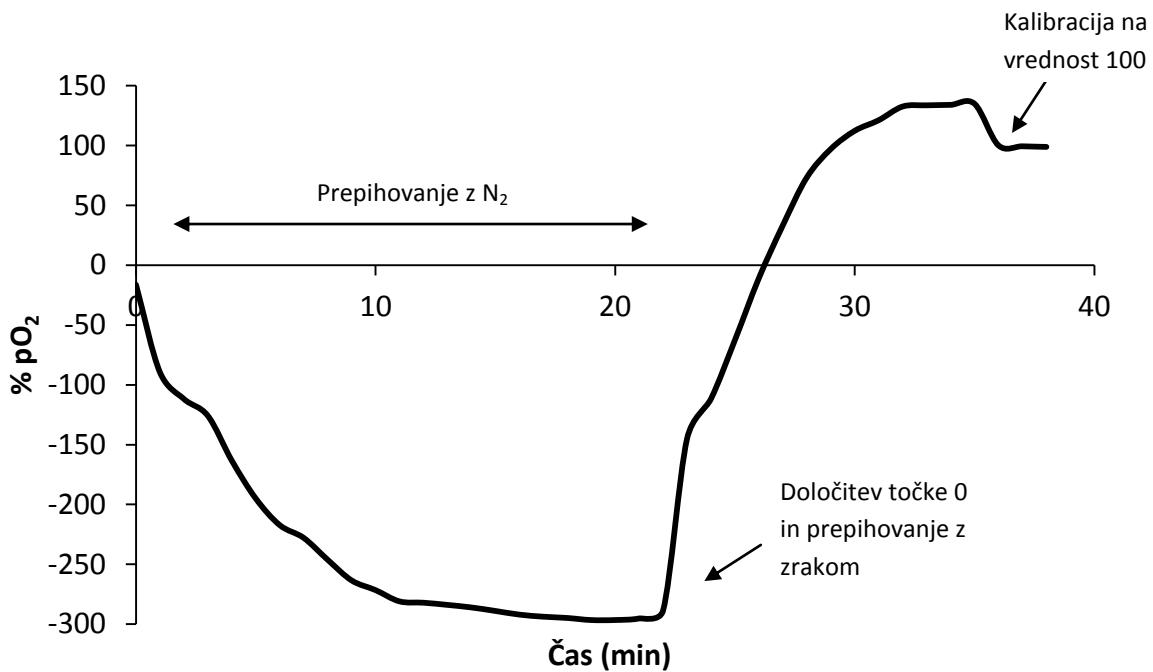
Na bakreno mrežico smo nanesli 20 µl vzorca in jo inkubirali 5 min. Mrežico smo posušili na filter papirju in jo sprali s 3 ml deionizirane vode. Na mrežico smo dodali eno kapljico 1 % uranil acetata in jo do suhega posušili na filter papirju in sobni temperaturi. Vzorce so pregledali na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

3.2.8 Kalibracija elektrod v erlenmajericah s pO₂ in pH elektrodo

V programu MSHAKER smo izbrali kalibracijo v dveh točkah, kjer se oba kalibracijska parametra (N in K) linearne odvisnosti določita na nove vrednosti.

Kalibracijo pH elektrod smo izvedli z dvema standardnima pufroma, pH 2 in pH 9. Elektrodo smo prestavili v pufer pH 2 in počakali, da se je signal stabiliziral in v programu označili da je prva točka kalibracije enaka vrednosti 2. Nato smo elektrodo prestavili v pufer pH 9 in enako počakali, da se je signal stabiliziral in označili drugo točko kalibracije kot 9.

Za kalibracijo pO₂ elektrode smo medij smo prepihovali z dušikom do ustaljene vrednosti. V programu smo označili, da je dobljena vrednost točka 0 in medij začeli prepihovati z zrakom do ustaljene vrednosti in določili točko 100 (MonitShaker..., 2002).



Slika 6: Primer kalibracije pO₂ elektrode.

V začetku smo medij prepohovali z dušikom in pri deležu koncentracije raztopljenega kisika -300 se je signal pO₂ elektrode ustalil. Sledi prepihovanje z zrakom do ustaljenega signala pO₂ elektrode in kalibracija na vrednost 100.

3.2.9 Merjenje k_{LA} po razplinjevalni metodi v 500 ml erlenmajericah in 30 l bioreaktorju

Koeficient prenosa kisika, k_{LA}, smo določili po razplinjevalni metodi (Wise, 1951). 500 ml erlenmajerico z 250 ml gojišča smo prepohovali s čistim dušikom. Ko smo iz gojišča odstranili ves kisik, smo erlenmajerico pustili na zraku in počakali, da se je nasičila z zrakom. Po nasičenju sledi prepihovanje z zrakom, da preverimo ali dosežemo nazaj začetno vrednost sto, ki smo jo določili s kalibracijo. Ta postopek smo ponovili trikrat. Koeficient prenosa kisika, k_{LA}, v bioreaktorju smo določili enako po razplinjevalni metodi. k_{LA} smo določili v 15 l vode in pri tem uporabili mešanje s hitrostjo 30 obr./min.

3.2.10 Izračun maksimalne specifične hitrosti rasti iz podatkov pO₂ elektrod

Maksimalno specifično hitrost rasti smo izračunali iz podatkov signala pO₂ elektrod po enačbi 9. Člen vnosa kisika, $k_L a(C_{AL}^* - C_{AL})$, smo zanemarili, ker smo dokazali da je ta člen proti porabi kisika zanemarljivo majhen (glej poglavje 4.1.3.3. stran 31). Za izračun smo uporabili naslednjo enačbo:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = -q_O X_0 e^{\mu t} \quad \dots (13)$$

Sledi:

$$\ln - \frac{dC_{AL}}{dt} = \ln(q_o X_0 e^{\mu t}) = \ln(q_o X_0) + \ln(e^{\mu t})$$

$$\ln - \frac{dC_{AL}}{dt} = \ln(q_o X_0) + \mu t$$

Maksimalna specifična hitrost rasti je naklon premice na grafu $\ln - \frac{dC_{AL}}{dt}$ v odvisnosti od časa. Začetna koncentracija celic (X_0) in specifična hitrost porabe kisika (q_o) sta konstanti.

4 REZULTATI

V poglavju so zbrani rezultati laboratorijskega dela, ki so bili pridobljeni v obdobju od aprila 2012 do februarja 2013 in v obdobju od junija 2013 do julija 2013. Rezultati so predstavljeni v obliki grafov in preglednic, nekateri podrobnejši rezultati pa so v poglavju Priloge. Predstavljeni so rezultati optimizacije rasti bakterije *C. jejuni*, optimizacije namnoževanja bakteriofagov na gostiteljski bakteriji *C. jejuni* in prenos namnoževanja bakteriofagov na gostiteljski bakteriji *C. jejuni* na bioreaktorski sistem. Rast bakterije *C. jejuni* smo spremljali z metodo določanja števila kolonijskih enot (CFU/ml), z merjenjem optične gostote in s spremeljanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika s pO₂ elektrodo. Sprostitev bakteriofagov, kot posledico lize gostiteljske bakterije *C. jejuni*, smo spremljali z metodo določanja plakov (PFU/ml) in s spremeljanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika s pO₂ elektrodo.

4.1 OPTIMIZACIJA RASTI BAKTERIJE *C. jejuni*

Pri proizvodnji bakteriofagov ključno vlogo igra uspešna rast gostiteljske celice. V naslednjih poglavjih smo spoznali rastne zahteve in dinamiko rasti bakterije *C. jejuni*, optimizirali pripravo inokuluma in izbrali optimalno atmosfero za rast. Gojenje je v vseh predstavljenih primerih potekalo pri temperaturi 42 °C.

4.1.1 Preverjanje možnosti gojenja bakterije *C. jejuni*

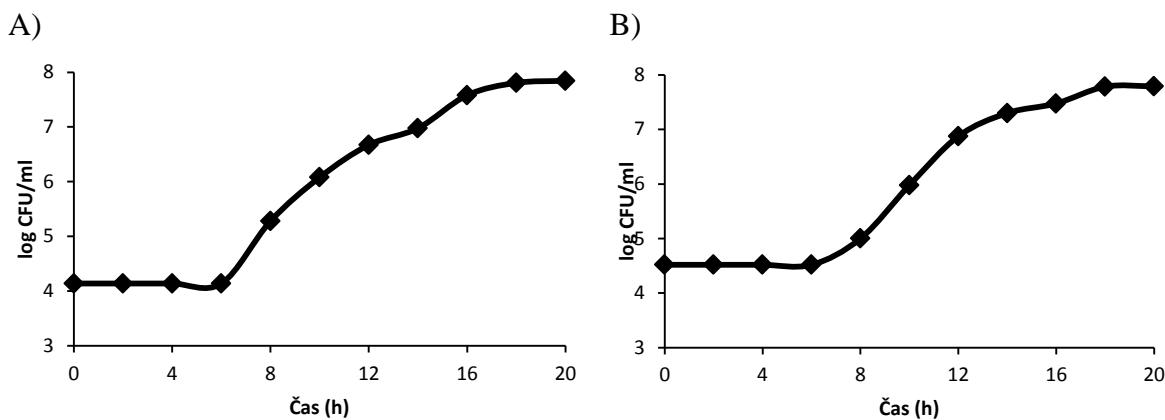
Prvi pogoj za uspešno gojenje bakteriofagov v bioreaktorju je rast bakterije *C. jejuni* v tekočem gojišču. Za gojenje smo uporabili 100 ml erlenmajerice s 50 ml gojišča MHB. V primeru A smo preverili možnost gojenja bakterije *C. jejuni* v tekočem gojišču v mikroaerofilni atmosferi (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂), ki smo jo zagotovili z uporabo CampyGen™ vrečk¹. V primeru B smo preverili možnost gojenja bakterije *C. jejuni* v tekočem gojišču v atmosferi² z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 % N₂, ki smo jo zagotovili z vpihovanjem 10 % čistega CO₂ v inkubator. Rast bakterije *C. jejuni* smo spremljali z merjenjem optične gostote in z določanjem števila kolonijskih enot (CFU/ml). V obeh primerih smo uporabili isti inokulum, ki smo ga pripravili iz trdnega gojišča.

V primeru mikroaerofilne atmosfere je bila začetna koncentracija celic $1,4 \times 10^4$ CFU/ml, v primeru atmosfere z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 % N₂ pa $3,3 \times 10^4$ CFU/ml. Po 20 urah smo dosegli najvišjo koncentracijo celic za primer mikroaerofilne atmosfere $6,2 \times 10^7$ CFU/ml oz. 7×10^7 CFU/ml za primer atmosfere z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂,

¹ Proizvajalec CampyGen™ vrečk navaja, da je ustvarjena mikroaerofilna atmosfera z uporabo vrečk sestavljena iz 5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂.

² Vrednosti so preračune glede na koncentracije plinov v zraku. Zanemarili smo vpliv argona in ostalih plinov v nižjih koncentracijah.

70,27 % N₂ (Slika 7). Dobljene vrednosti merjenja optične gostote so bile prenizke in kot take jih ni možno upoštevati kot zanesljive.



Slika 7: Dinamika rasti bakterije *C. jejuni* z določanjem števila kolonijskih enot.
A) mikroaerofilna atmosfera (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂); B) atmosfera z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 % N₂.

4.1.2 Spremljanje rasti s sistemom s kisikovo in pH elektrodo

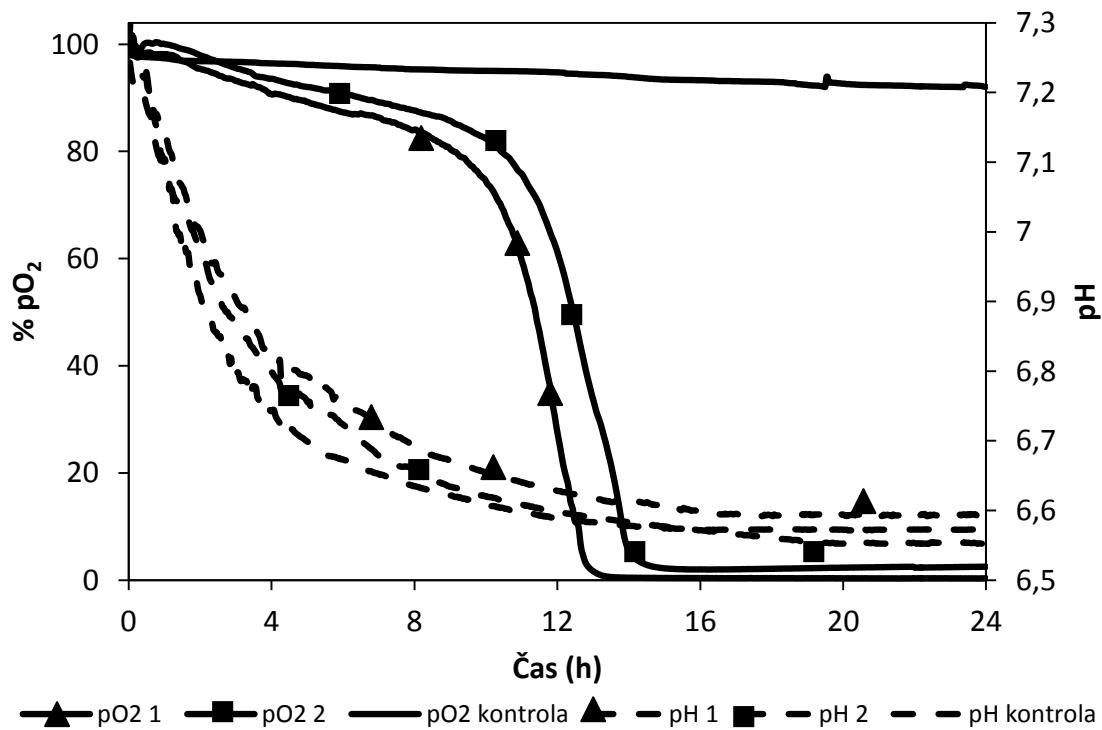
V prejšnjem poskusu smo ugotovili, da potrebujemo sistem, ki nam bo lahko sproti spremjal dinamiko rasti. Rast bakterije *C. jejuni* smo začeli spremljati v 500 ml erlenmajericah s kisikovo (pO₂) in pH elektrodo (slika 8). pO₂ in pH elektrode zajemajo podatke vsakih 60 s.



Slika 8: Spremljanje dinamike rasti bakterije *C. jejuni* v erlenmajericah s kisikovo in pH elektrodo.

Dinamiko rasti bakterije *C. jejuni* smo spremljali sproti s podatki iz pO₂ in pH elektrode (slika 9), z vzorčenjem pa smo preverjali koncentracijo celic z metodo določanja števila kolonijskih enot. Za inokulacijo smo uporabili inokulum iz trdnega gojišča. 250 ml medija

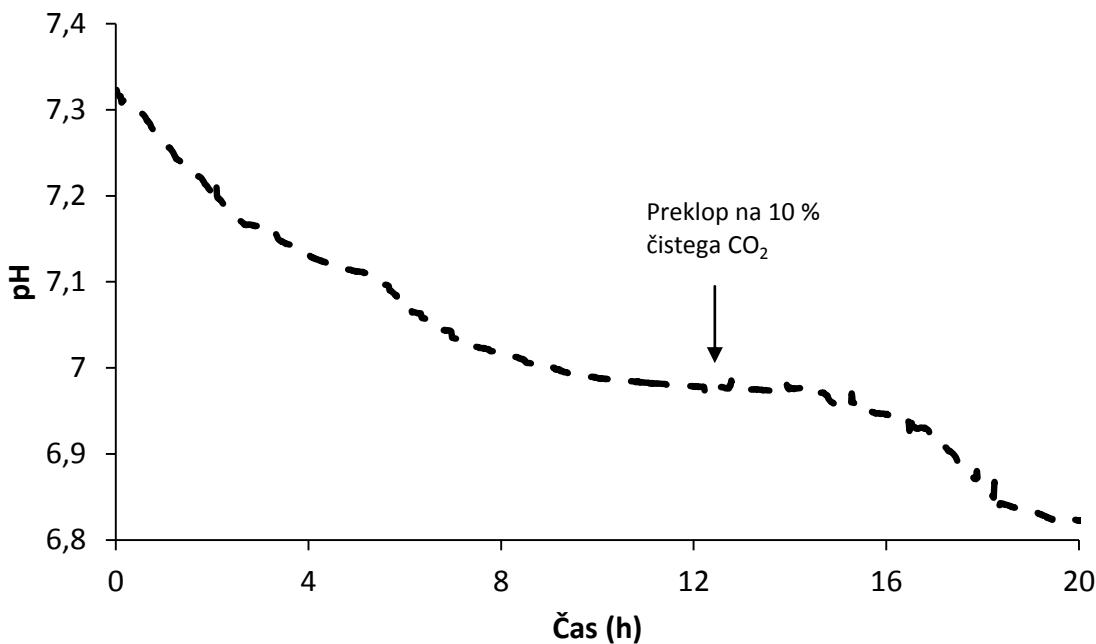
smo v paralelki inokulirali z 250 µl bakterijske suspenzije, tretja erlenmajerica pa je bila kontrola in je vsebovala 250 ml gojišča. Gojenje je potekalo v CO₂ inkubatorju z vpihanjem 10 % čistega CO₂. Začetna koncentracija celic je bila $8,4 \times 10^5$ CFU/ml v primeru 1 in 7×10^5 CFU/ml v primeru 2, končna pa 1×10^8 CFU/ml v primeru 1 oz. 9×10^7 CFU/ml v primeru 2. Delež koncentracije raztopljenega kisika merjen s pO₂ elektrodo se je 8 ur po inokulaciji rahlo zniževal in po 10 urah se je začel strmo zniževati. Delež koncentracije raztopljenega kisika se je 14 ur po inokulaciji ustalili na vrednosti blizu nič. Signal pO₂ elektrode je za kontrolo ostal nespremenjen na začetni vrednosti sto. S pH elektrodo smo online spremljali pH gojišča. pH je ob inokulaciji začel padati iz vrednosti pH 7,2 na vrednost pH 6,6 v vseh treh primerih – tudi v kontroli.



Slika 9: Spremljanje dinamike rasti s sistemom s pO₂ in pH elektrodo.

Delež koncentracije raztopljenega kisika (polna črta) ostane na začetni vrednosti v primeru kontrole (gojišče), medtem ko se zniža v primeru paralelke z inokulumom. Signali pH elektrod (prekinjena črta) kažejo enak trend tako v primeru kontrole kot v primeru paralelke z inokulumom.

Z enostavnim eksperimentom smo potrdili, da je sprememba pH posledica zakisanja gojišča s CO₂. V CO₂ inkubator smo najprej vpihovali 5 % čistega CO₂, nato pa smo ob času 12 h preklopili na vpihanje 10 % čistega CO₂ in spremljali spremembo pH gojišča (Slika 10).



Slika 10: Spremljanje spremembe pH gojišča pri vpihovanju različnih koncentracij čistega CO₂ v inkubator. Najprej smo vpihovali 5 % čistega CO₂, ob času 12 h pa smo preklopili na 10 % čistega CO₂.

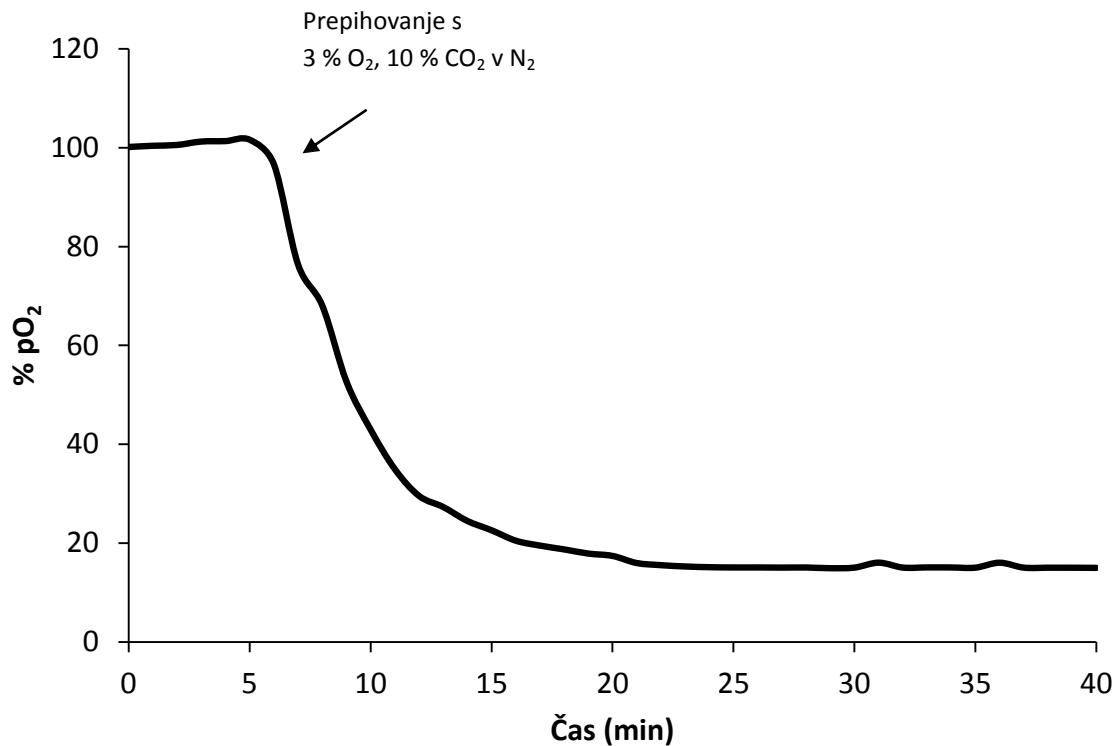
4.1.3 Ovrednotenje sistema s pO₂ elektrodami

Ugotovili smo, da nam bodo pO₂ elektrode lahko služile za spremljanje dinamike rasti. Da smo se prepričali, da je sistem s pO₂ elektrodami res ustrezен smo preverili kalibracijo elektrod, določili k_{LA} po razplinjevalni metodi in ovrednotili razmerje hitrosti prenosa kisika proti porabi kisika.

4.1.3.1 Preverjanje signala pO₂ elektrode

Kalibracija elektrod je ključnega pomena za natančne meritve. S tem eksperimentom smo preverili ustreznost kalibracije elektrod (slika 11). Elektrode smo kalibrirali v gojišču po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.8. Po kalibraciji v eni točki smo gojišče začeli prepihovati z mešanicom plina, ki je vsebovala 3 % O₂, 10 % CO₂ in 87 % N₂. Signal se nam je ustalil pri vrednosti 15 % pO₂. Elektrode so kalibrirane glede na zrak, ki vsebuje 20,95 % O₂. V mešanici je 3 % O₂ in ustreznost kalibracije smo preverili po naslednjem izračunu:

$$\frac{3 \% O_2}{20,95 \% O_2} * 100 = 14,31$$

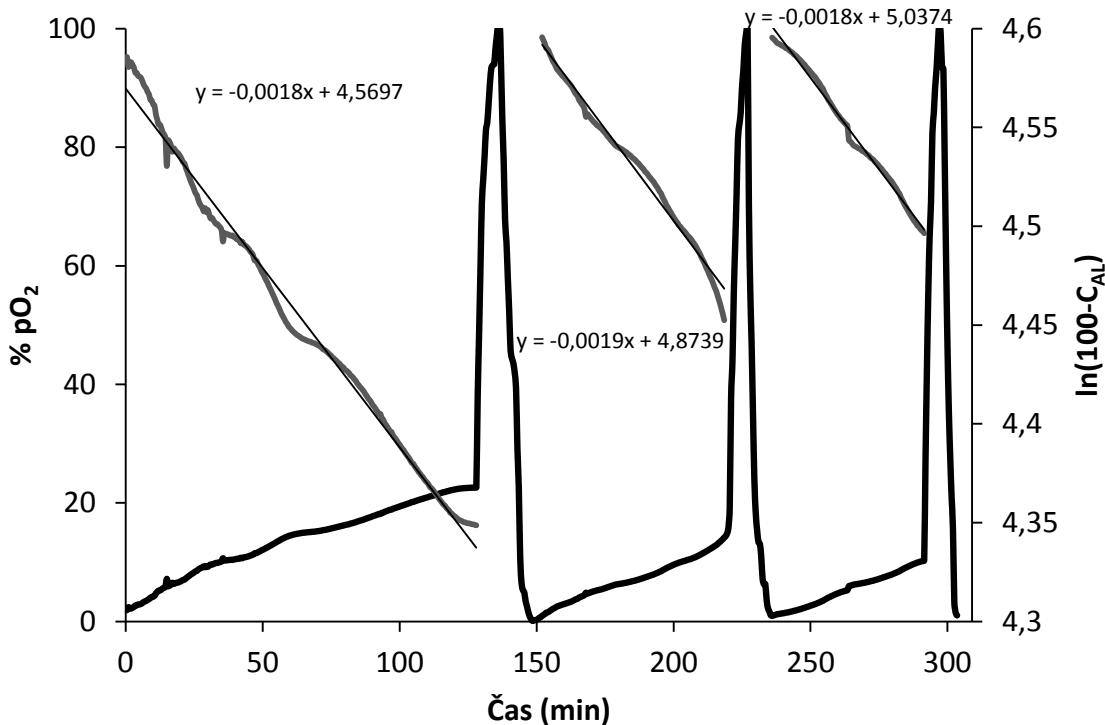


Slika 11: Preverjanje signala pO₂ elektrode.

Po kalibraciji v eni točki smo začeli gojišče prepihovati z mešanico plinov (3 % O₂, 10 % CO₂, 78 % N₂) in signal pO₂ elektrode se je ustalil pri 15 % koncentracije raztopljenega kisika v gojišču.

4.1.3.2 Merjenje k_{La} v 500 ml erlenmajericah

Koeficient prenosa kisika, k_{La}, smo določili v 250 ml medija z razplinjevalno metodo, ki je opisana v poglavju 3.2.9. Nasičenje gojišča z zrakom smo dosegli tako, da smo erlenmajerice pustili na zraku, po določenem času pa smo jih začeli prepihovati z zrakom, kjer smo takoj dosegli začetno vrednost sto določeno s kalibracijo. Koeficient prenosa kisika, k_{La}, smo izračunali po enačbi 10, kjer naklon premice predstavlja -k_{La}. Iz naklona premice treh meritev smo izračunali povprečje in določili k_{La} 0,0018 min⁻¹ (slika 12).



Slika 12: Določanje koeficienta prenosa kisika, k_{LA} , po razplinjevalni metodi.
 Iz naklona premice treh meritev smo izračunali povprečje in določili k_{LA} .

4.1.3.3 Velikost hitrosti prenosa kisika proti hitrosti porabe kisika

Zanimalo nas je ali je hitrost prenosa kisika, $k_L a(C_{AL}^* - C_{AL})$, manjša od hitrosti porabe kisika, $q_o X$. Namreč, če je hitrost prenosa kisika bistveno manjša od porabe, bi to pomenilo, da bi hitrost prenosa kisika lahko pri nadaljnjih izračunih podatkov iz pO_2 elektrod lahko zanemarili.

Za izračun smo vzeli podatek o topnosti zraka pri parcialnemu tlaku 1 atm in temperaturi 25 °C iz tabele in znaša $8,69 \text{ kg m}^{-3}$ (International..., 2003). Za specifični respiratorni koeficient za bakterijo rodu *Campylobacter* smo vzeli vrednost, kot jo navajajo Wainwright in sod. (2005) in znaša $1920 \text{ nmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Podatek o topnosti zraka smo pretvorili iz enote kg m^{-3} v $\text{nmol O}_2 \text{ ml}^{-1}$:

$$C_{AL} = \frac{8,69 \text{ kg m}^{-3}}{32 \text{ g mol}^{-1}} = 271 \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1}$$

Koncentracijo celic smo iz CFU/ml pretvorili v mg ml^{-1} . Za maso ene bakterijske celice smo vzeli 10^{-12} g , ki jo navajajo (Davis in sod., 1973, cit. po Mass ..., 2003). Za koncentracijo celic (X) smo vzeli 10^8 CFU/ml , to je najvišja koncentracija celic, ki smo jo

dosegli pri gojenju bakterije *C. jejuni*. Ker smo koncentracijo določili z uporabo redčitvene vrste lahko predpostavimo, da je 1 CFU enako 1 celici in dobimo:

$$X = 10^8 \text{ celica ml}^{-1} \times 10^{-12} \text{ g celica}^{-1} = 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$$

Za izračun hitrosti prenosa kisika glede na hitrost porabe kisika smo vzeli enačbo 9 in dobili:

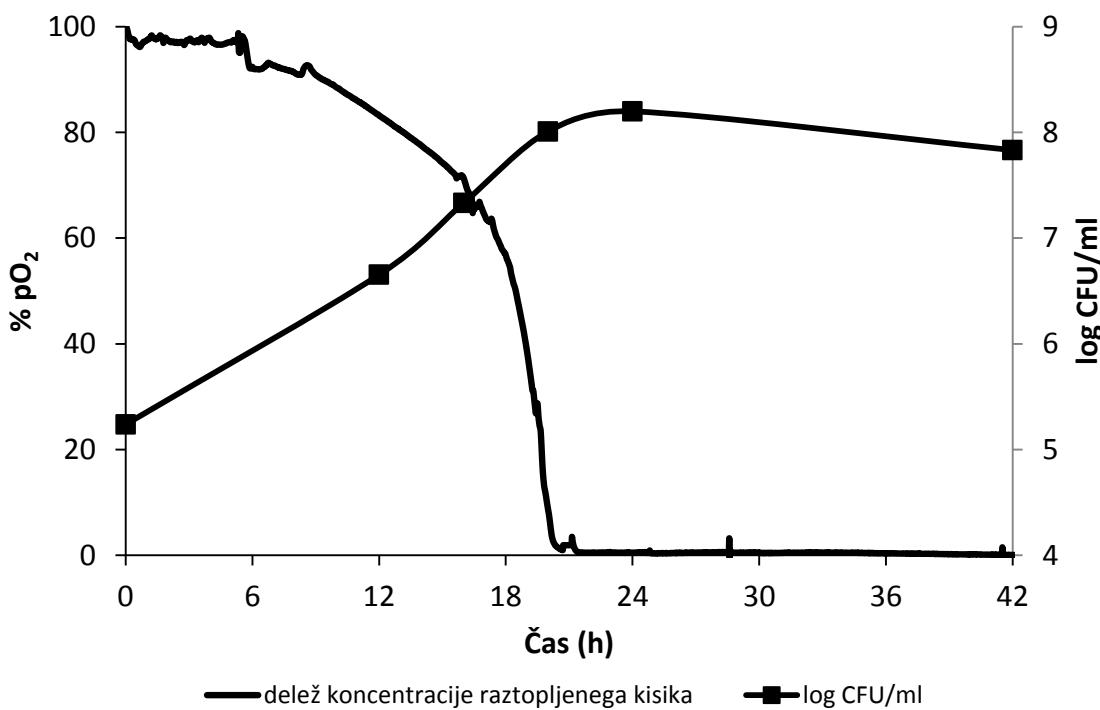
$$0,0018 \text{ min}^{-1} (271 \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} - 0) = 1920 \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \times 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$0,49 \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1} < 192 \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1}$$

Člena sta v razmerju 1 proti 392, kar pomeni, da pri nadalnjih izračunih lahko zanemarimo prvi člen, saj nam to ne bo bistveno vplivalo na končne vrednosti.

4.1.4 Povezava znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika s koncentracijo celic

Sklepali smo, da je zmanjšanje deleža koncentracije raztopljenega kisika merilo za dinamiko rasti mikroorganizma. Ta sklep smo ovrednotili z eksperimentom, kjer smo v pogostih časovnih intervalih določali število kolonijskih enot in dobljene koncentracije celic povezali s podatki o deležu raztopljenega kisika iz pO_2 elektrod (slika 13). Za inokulum smo uporabili prekonočno kulturo. Gojenje je potekalo v CO_2 inkubatorju z vpihanjem 10 % čistega CO_2 . Prvič smo vzorčili 12 h po inokulaciji, ko je kultura že prešla v eksponentno fazo rasti in se je začetna koncentracija celic iz $1,7 \times 10^5$ CFU/ml povečala na $4,5 \times 10^6$ CFU/ml. V tem času se je pričela tudi strma poraba raztopljenega kisika. 20 h po inokulaciji se je signal pO_2 elektrode ustalil na vrednosti blizu nič. Najvišjo koncentracijo celic smo dosegli 24 h po inokulaciji. Po enačbi 5 smo izračunali maksimalno specifično hitrost rasti iz podatkov CFU/ml in dobili $0,298 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$. Za izračun maksimalne specifične hitrosti rasti iz podatkov o deležu raztopljenega kisika iz pO_2 elektrod smo uporabili enačbo 13 in dobili $0,315 \text{ h}^{-1}$.

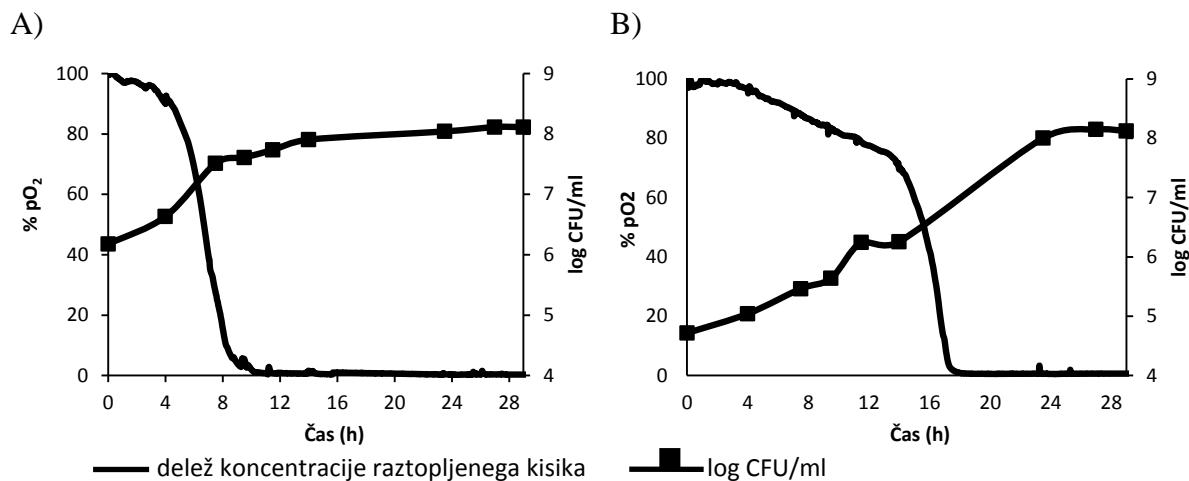


Slika 13: Povezava dinamike rasti bakterije *C. jejuni* z zmanjšanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika in z višanjem koncentracije celic.

Z metodo štetja kolonij smo določili začetek eksponentne faze rasti bakterije *C. jejuni* 12 h po inokulaciji, kar sovпадa s strmo poraba deleža raztopljenega kisika.

4.1.4.1 Vpliv volumna inokuluma na delež koncentracije raztopljenega kisika in dinamiko bakterijske rasti

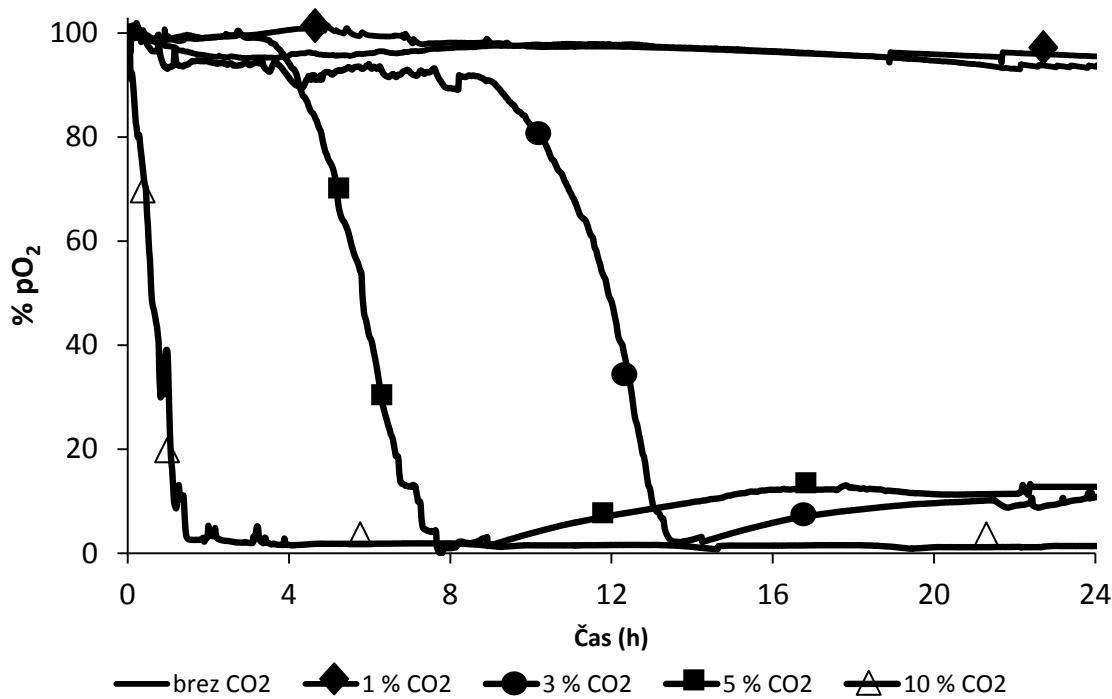
Z eksperimentom smo preverili vpliv volumna inokuluma na delež koncentracije raztopljenega kisika in dinamiko bakterijske rasti. Pripravili smo inokulum iz prekonočne kulture. Inokulirali smo z 8 ml (slika 14 A) oz. z 250 µl (slika 14 B). Gojenje je potekalo z vpihovanjem 10 % čistega CO₂ v inkubator. V primeru A se znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika na vrednost nič zgodi med 3,5 in 8,5 h po inokulaciji. V primeru B se delež koncentracije raztopljenega kisika začne rahlo zniževati med 3 in 13 h po inokulaciji, in se strmo začne zniževati med 13 in 17 h po inokulaciji. V primeru A je bila začetna koncentracija celic $1,5 \times 10^6$ CFU/ml in najvišje povišanje koncentracije celic smo določili med 4 in 8 h po inokulaciji. V primeru B je bila začetna koncentracija celic $5,2 \times 10^4$ CFU/ml in najvišje povišanje koncentracije celic smo določili med 14 in 24 h po inokulaciji. Po enačbi 5 smo izračunali maskimalno specifično hitrost rasti iz podatkov vzorčenja CFU/ml in za primer A dobili $0,303 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$, za primer B pa $0,316 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. Po enačbi 13 smo izračunali maksimalno specifično hitrosti rasti iz podatkov o deležu raztopljenega kisika iz pO₂ elektrod in dobili za primer A hitrost $0,318 \text{ h}^{-1}$, za primer B pa $0,342 \text{ h}^{-1}$.

Slika 14: Gojenje bakterije *C. jejuni* pri različnem volumnu inokuluma.

V primeru A je bil volumen inokuluma 8 ml, v primeru B pa 250 µl. Delež koncentracije raztopljenega kisika se hitreje zniža in koncentracija celic hitreje poviša v primeru večjega volumna inokuluma (primer A).

4.1.5 Optimizacija vpihovanja CO₂

Pri vseh prejšnjih eksperimentih smo v inkubator vpihovali 10 % čistega CO₂. Zanimalo nas je ali ima vpihovanje različnih koncentracij čistega CO₂ vpliv na rast. Naredili smo pet ločenih eksperimentov: gojenje na zraku in z vpihovanjem 1 %, 3 %, 5 % in 10 % čistega CO₂ (slika 15). Dinamiko rasti bakterije *C. jejuni* smo spremajali z merjenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika in z določanjem koncentracije celic na začetku in koncu gojenja. Pripravili smo inokulum iz prekonocne kulture *C. jejuni* in tako zagotovili, da je bil inokulum pri vsakem eksperimentu v enakem fiziološkem stanju. 250 ml gojišča smo inokulirali z 2 ml prekonocnega inokuluma. V primeru gojenja pri vpihovanju 1 % čistega CO₂ in gojenja na zraku signal pO₂ elektrode ostane na začetni vrednosti. V primeru gojenja bakterije *C. jejuni* pri vpihovanju 10 % čistega CO₂ pride do znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika takoj po inokulaciji. V primeru gojenja bakterije *C. jejuni* pri vpihovanju 5 % čistega CO₂ se delež koncentracije raztopljenega kisika začne zniževati 4 ure po inokulaciji, v primeru gojenja pri vpihovanju 3 % čistega CO₂ pa 9 ur po inokulaciji.



Slika 15: Primerjava znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika pri gojenju bakterije *C. jejuni* pri različnih koncentracijah vpihanega čistega CO₂ v inkubator.

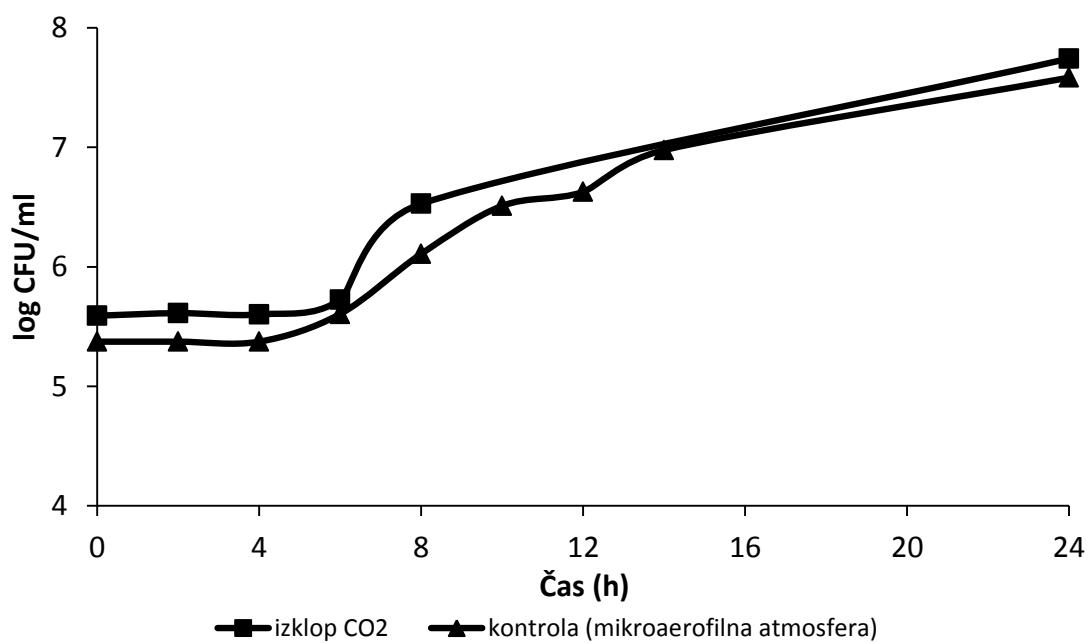
Pri gojenju bakterije *C. jejuni* na zraku in v primeru vpihanja 1 % čistega CO₂ delež koncentracije raztopljenega kisika ostane na začetni vrednosti. Do znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika pride najprej v primeru gojenja pri vpihanju 10 % čistega CO₂, sledita gojenji bakterije *C. jejuni* v primeru vpihanja 5 % in 3 % čistega CO₂.

V preglednici 1 je prikazana sestava atmosfere za posamezne koncentracije vpihanega čistega CO₂ v inkubator in koncentracije celic, ki smo jih dobili za posamezen eksperiment z metodo štetja kolonij. Pri vseh eksperimentih smo skušali zagotoviti enake začetne koncentracije celic v okviru eksperimentalne napake. Pri gojenju bakterije *C. jejuni* na zraku po 24 urah nismo dobili kolonij na AHB ploščah, ki jih uporabljamo za metodo štetja kolonij. V primeru gojenja pri vpihanju 1 % čistega CO₂ je prišlo do zelo počasne rasti bakterije *C. jejuni*. Pri gojenju pri 3 % vpihanega čistega CO₂ dosežemo najvišje povišanje koncentracije celic. V primeru gojenja pri 5 % in 10 % vpihanega čistega CO₂ zasledimo rast do nižje koncentracije celic v primerjavi s 3 % vpihanega čistega CO₂.

Preglednica 1: Sestava atmosfere za posamezne koncentracije vpihanega čistega CO₂ v inkubator in koncentracije celic, ki smo jih dobili za posamezen eksperiment z metodo štetja kolonij.

Koncentracija vpihanega čistega CO ₂	Sestava atmosfere	Koncentracija celic (CFU/ml)	
		t=0 h	t=24 h
brez CO ₂	20,95 % O ₂ , 0,03 % CO ₂ , 78,08 % N ₂	1x10 ⁶	0
1 % CO ₂	20,74 % O ₂ , 1,03 % CO ₂ , 77,29 % N ₂	9x10 ⁵	3x10 ⁶
3 % CO ₂	20,32 % O ₂ , 3,03 % CO ₂ , 75,74 % N ₂	1,4x10 ⁶	1,4x10 ⁸
5 % CO ₂	19,90 % O ₂ , 5,03 % CO ₂ , 74,18 % N ₂	1,2x10 ⁶	9x10 ⁷
10 % CO ₂	18,86 % O ₂ , 10,03 % CO ₂ , 70,27 % N ₂	2,5x10 ⁶	7x10 ⁷

Naredili smo še ločeni eksperiment z »izklopom CO₂«. Eksperiment je potekal tako, da smo prvih 8 ur gojili z vpihanjem 10 % čistega CO₂ v inkubator, nato pa smo izkloplili CO₂ in naprej gojili na zraku. Za kontrolo smo uporabili gojenje bakterije *C. jejuni* v mikraerofilni atmosferi (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂), ki smo jo zagotovili z uporabo CampyGen™ vrečk. Dinamiko rasti bakterije *C. jejuni* smo spremljali z določanjem števila kolonijskih enot. V obeh primerih smo uporabili prekonočni inokulum. Začetna koncentracija celic je bila za primer »izklopa CO₂« 3,9x10⁵ CFU/ml, za primer kontrole pa 2,4x10⁵ CFU/ml. Iz slike 16 je razvidno, da 24 ur po inokulaciji v obeh primerih dosežemo v okviru eksperimentalne napake enako koncentracijo celic.



Slika 16: Primerjava dinamike rasti bakterije *C. jejuni* v primeru »izklopa CO₂« in v mikraerofilni atmosferi.

Gojenje je potekalo prvih 8 ur v atmosferi z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 %, naslednjih 16 ur pa na zraku. Za kontrolo smo uporabili gojenje bakterije *C. jejuni* v mikraerofilni atmosferi (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂). V obeh primerih zasledimo rast do enake končne koncentracije celic.

4.2 OPTIMIZACIJA NAMNOŽEVANJA BAKTERIOFAGOV

V prejšnjih eksperimentih smo optimizirali rast bakterije *C. jejuni* in tako optimizirali pripravo inokuluma, volumen inokuluma in določili optimalno atmosfero za gojenje.

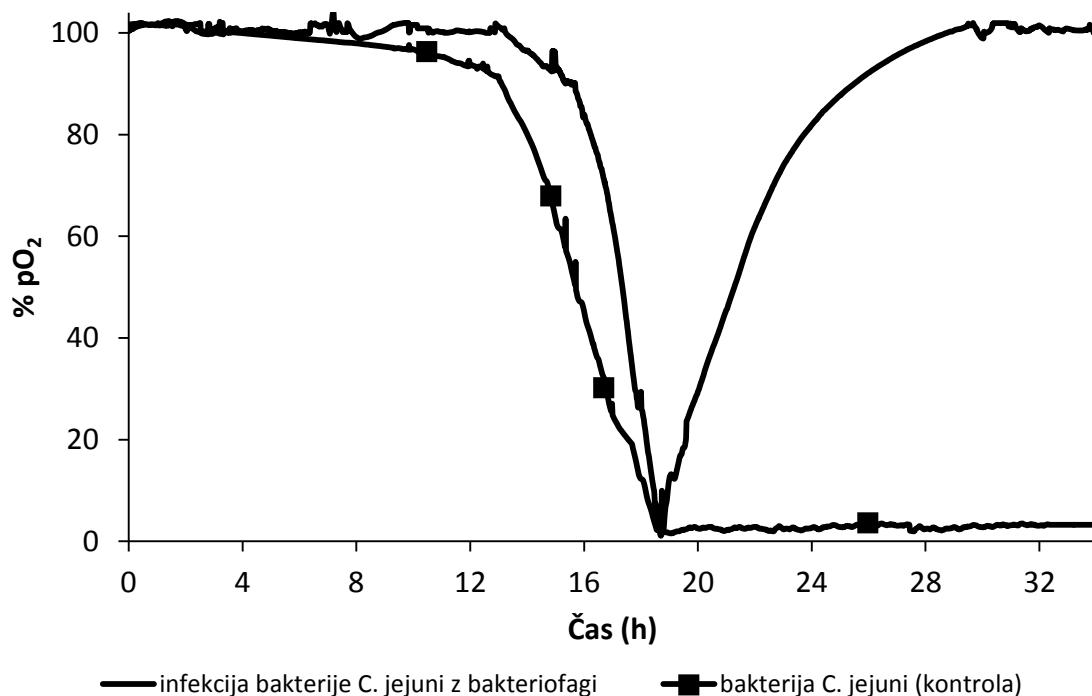
Optimizacijo namnoževanja bakteriofagov na gostiteljski bakteriji *C. jejuni* smo izvajali v erlenmajericah s sistemom s pO₂ elektrodo. Med eksperimentom smo sproti spremljali delež koncentracije raztopjenega kisika, in vzorčili in določali koncentracijo celic in titer bakteriofagov (PFU/ml). Poskusi so potekali pri 42 °C in pri vpihanju 5 % čistega CO₂ v inkubator. Pri namnoževanju bakteriofagov smo uporabili vrednost MOI 0,2-0,02. Volumen dodanega bakteriofaga smo preračunali po enačbi:

$$V_{faga} = \frac{CFU/ml \times V_{kulturne} \times MOI}{PFU/ml} \quad \dots (14)$$

4.2.1 Namnoževanje bakteriofagov s 24 urno gostiteljsko kulturo *C. jejuni*

Za inokulum smo uporabili 24 urno gostiteljsko kulturo *C. jejuni*. Namnoževanje bakteriofagov je potekalo v 250 ml gojišča CMHB kamor smo dodali 40 µl desetkrat redčenega bakteriofaga PC5 in 250 µl 24 urne kulture *C. jejuni*. Kontrolo za rast bakterije *C. jejuni* smo pripravili enako, le da smo namesto bakteriofaga PC5 dodali 40 µl pufrja SM.

Delež koncentracije raztopljenega kisika smo spremljali tako za infekcijo gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi, kot tudi za kontrolno-gojenje bakterije *C. jejuni* (slika 17). Znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika, ki nakazuje prehod v eksponentno fazo rasti, se zgodi v primeru kontrole 12 h po inokulaciji, v primeru infekcije *C. jejuni* z bakteriofagi pa 13 h po inokulaciji. V primeru kontrole delež koncentracije raztopljenega kisika po znižanju ostane na vrednosti blizu nič, medtem ko se delež koncentracije raztopljenega kisika v primeru infekcije *C. jejuni* z bakteriofagi dvigne nazaj na začetno vrednost.



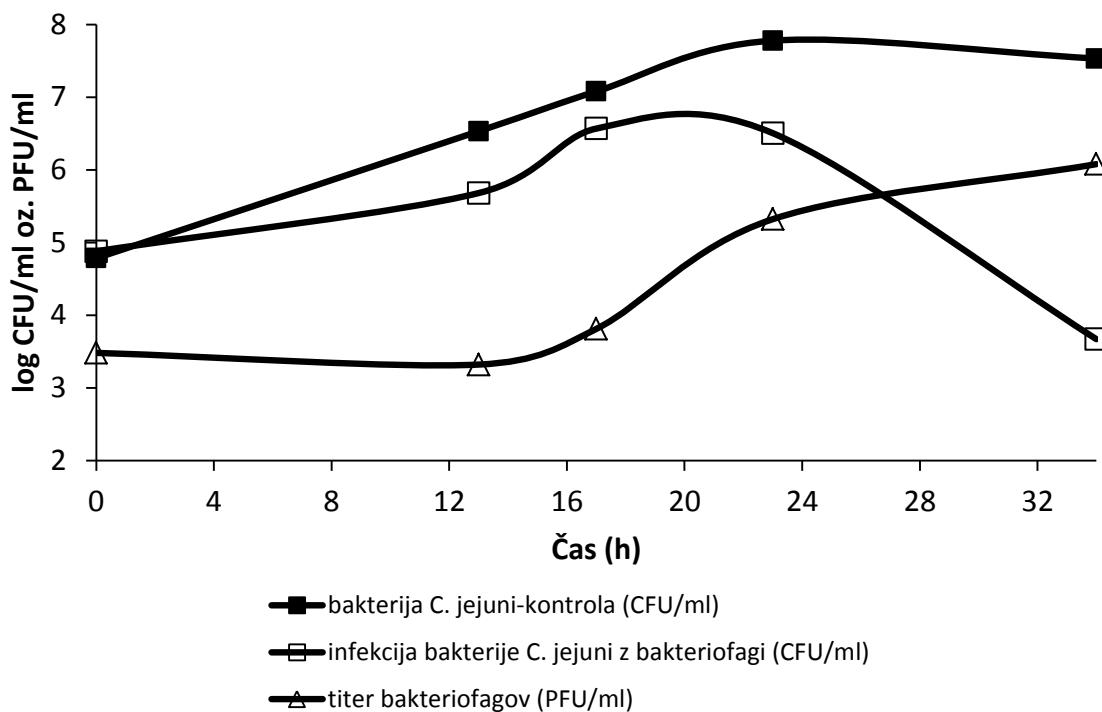
Slika 17: Primerjava deleža koncentracije raztopljenega kisika med infekcijo 24 urne gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi in med gojenjem bakterije *C. jejuni* (kontrola).

V primeru kontrole-gojenje bakterije *C. jejuni* je razvidno znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika kot posledica bakterijske rasti. V primeru infekcije gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi je razvidno znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika na vrednost nič in takojšnje zvišanje deleža koncentracije raztopljenega kisika na začetno vrednost.

Tekom eksperimenta smo vzorčili in določali koncentracijo celic in titer bakteriofagov (PFU/ml). V primeru kontrole-gojenje bakterije *C. jejuni* je bila začetna koncentracija celic $6,1 \times 10^4$ CFU/ml in najvišjo koncentracijo celic smo določili 23 h po inokulaciji 6×10^7 CFU/ml. Začetna koncentracija celic pri infekciji bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi je bila $7,4 \times 10^4$ CFU/ml, začetni titer bakteriofagov pa 3×10^3 PFU/ml. Titer bakteriofagov je začel naraščati 17 h po inokulaciji in takrat smo določili tudi najvišjo koncentracijo celic, ki je $3,7 \times 10^6$ CFU/ml. Končni titer bakteriofagov je bil $1,2 \times 10^6$ PFU/ml (slika 18). Po enačbi 5 oz. 13 smo izračunali maksimalno specifično hitrost rasti bakterije *C. jejuni* za kontrolo-gojenje bakterije *C. jejuni* in za infekcijo *C. jejuni* z bakteriofagi iz podatkov o koncentraciji celic oz. iz podatkov o deležu raztopljenega kisika (preglednica 2).

Preglednica 2: Maksimalna specifična hitrost rasti (h^{-1}) bakterije *C. jejuni* za kontrolo-gojenje bakterije *C. jejuni* in za infekcijo 24 urne kulture *C. jejuni* z bakteriofagi iz podatkov o koncentraciji celic (CFU/ml) oz. iz podatkov o deležu koncentracije raztopljenega kisika (% pO₂).

Primer	Maksimalna specifična hitrost rasti (h^{-1})	
	% pO ₂	CFU/ml
kontrola-bakterija <i>C. jejuni</i>	0,314	0,302±0,06
infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	0,320	0,230±0,04



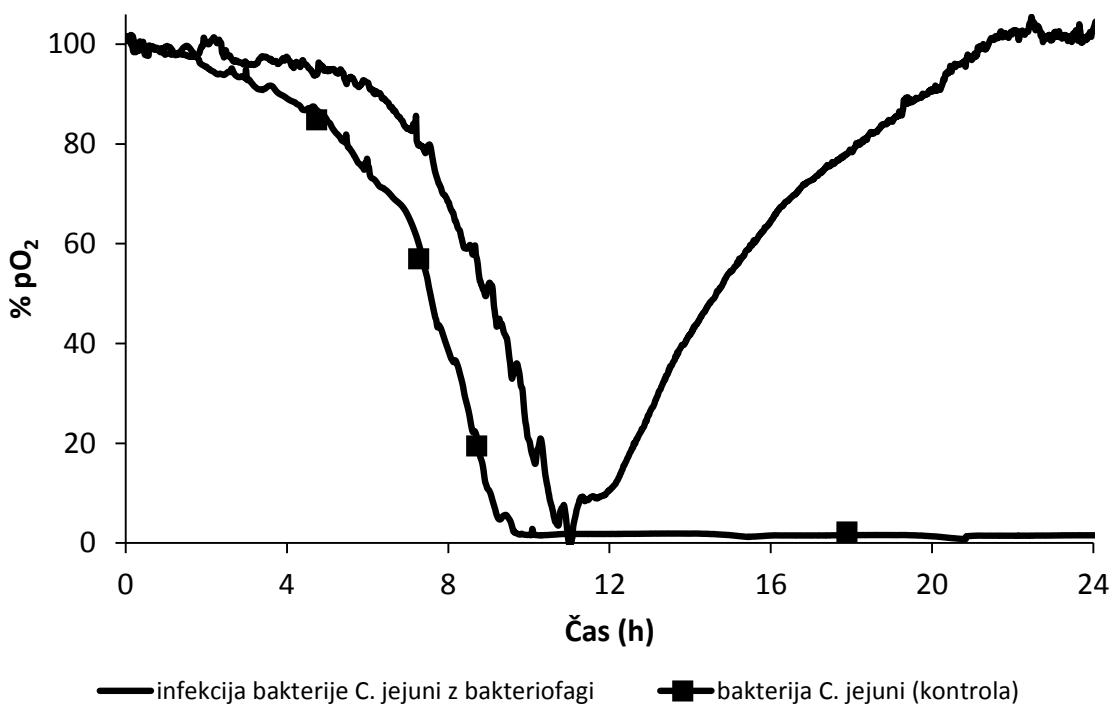
Slika 18: Primerjava dinamike rasti bakterije *C. jejuni* v primeru kontrole in v primeru infekcije 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.

Prikazana je koncentracija celic za kontrolo-bakterije *C. jejuni* (■) in koncentracija celic v primeru infekcije 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi (□). Sprostitev bakteriofagov iz gostiteljske celice za primer infekcije bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi je razvidna iz zelenih trikotnikov (Δ).

4.2.2 Namnoževanje bakteriofagov z 12 urno gostiteljsko kulturo *C. jejuni*

Za inkolum smo uporabili prekonočno kulturo, ki smo jo razredčili v svežem mediju do 10^5 CFU/ml in inkubirali 12 ur. Namnoževanje bakteriofagov je potekalo v 250 ml gojišča CMHB kamor smo dodali 40 µl desetkrat redčenega bakteriofaga PC5 in 25 ml (v 225 ml gojišča CMHB) 12 urne kulture *C. jejuni*. Kontrolo za rast bakterije *C. jejuni* smo pripravili enako, le da smo namesto bakteriofaga PC5 dodali 40 µl pufra SM.

Delež koncentracije raztopljenega kisika smo spremljali tako za infekcijo gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi, kot tudi za kontrolo-gojenje bakterije *C. jejuni* (slika 19). Znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika, ki nakazuje pospešeno podvojevanje celic, se zgodi v primeru kontrole 4 h po inokulaciji, v primeru infekcije bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi pa 5 h po inokulaciji. V primeru kontrole delež koncentracije raztopljenega kisika po znižanju ostane na vrednosti blizu nič, medtem ko se delež koncentracije raztopljenega kisika v primeru infekcije *C. jejuni* z bakteriofagi dvigne nazaj na začetno vrednost.



Slika 19: Primerjava deleža koncentracije raztopljenega kisika med infekcijo 12 urne gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi in med gojenjem bakterije *C. jejuni* (kontrola).

V primeru kontrole-gojenje bakterije *C. jejuni* je razvidno znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika kot posledica bakterijske rasti. V primeru infekcije gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi je razvidno znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika na vrednost nič in takojšnje zvišanje deleža koncentracije raztopljenega kisika na začetno vrednost.

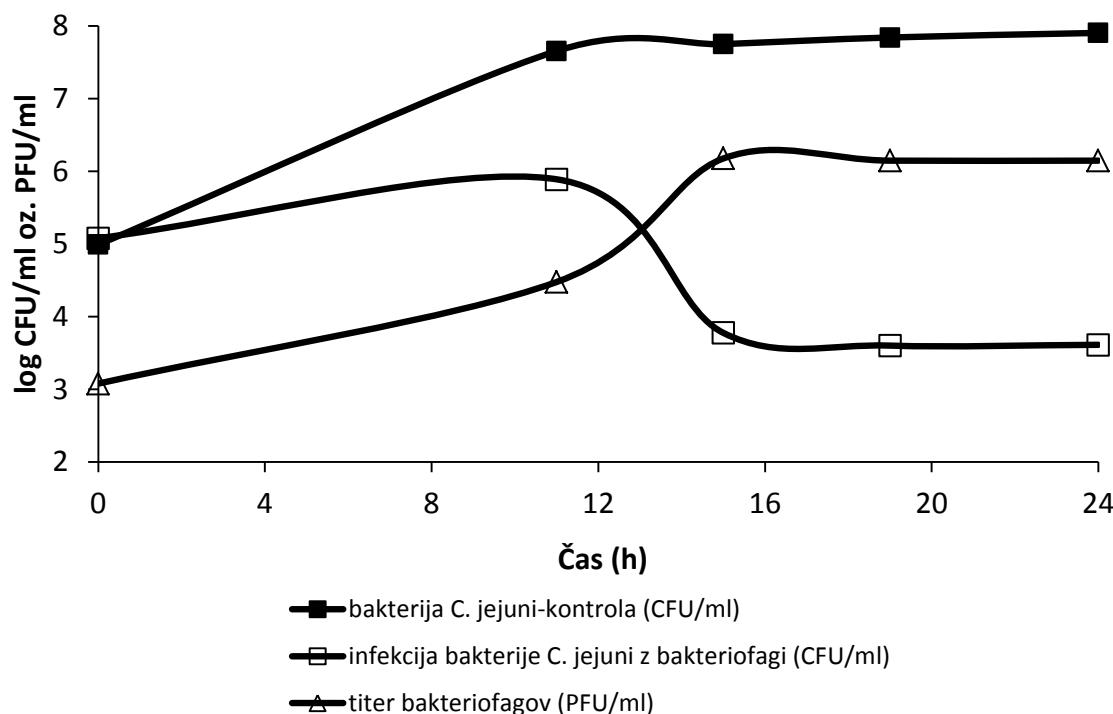
Tekom eksperimenta smo sprotno vzorčili in določali koncentracijo celic in titer bakteriofagov (PFU/ml). V primeru kontrole-gojenje bakterije *C. jejuni* je bila začetna koncentracija celic $9,8 \times 10^4$ CFU/ml in že 11 ur po inokulaciji smo določili koncentracijo celic $4,5 \times 10^7$ CFU/ml. Začetna koncentracija celic pri infekciji bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi je bila $1,2 \times 10^5$ CFU/ml, začetni titer bakteriofagov pa $1,2 \times 10^3$ PFU/ml. Titer bakteriofagov je začel naraščati po 11 urah po inokulaciji in 15 ur po inokulaciji smo dosegli končni titer bakteriofagov $2,4 \times 10^6$ PFU/ml (slika 20). Po enačbi 5 oz. 13 smo izračunali maksimalno specifično hitrost rasti bakterije *C. jejuni* za kontrolo-gojenje

bakterije *C. jejuni* in za infekcijo *C. jejuni* z bakteriofagi iz podatkov o koncentraciji celic oz. iz podatkov o deležu raztopljenega kisika (preglednica 3).

Preglednica 3: Maksimalna specifična hitrost rasti (h^{-1}) bakterije *C. jejuni* za kontrolo-gojenje bakterije *C. jejuni* in za infekcijo 12 urne kulture *C. jejuni* z bakteriofagi iz podatkov o koncentraciji celic (CFU/ml) oz. iz podatkov o deležu koncentracije raztopljenega kisika (% pO₂).

Primer	Maksimalna specifična hitrost rasti (h^{-1})	
	% pO ₂	CFU/ml
kontrola-bakterija <i>C. jejuni</i>	0,320	0,281±0,05
infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	0,350	0,194±0,01

V primeru infekcija bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi smo iz podatkov CFU/ml tokrat izračunali maksimalno specifično hitrost rasti, ki precej odstopa od kontrole-bakterija *C. jejuni*. Dobljena maksimalna specifična hitrost rasti je bila v tem primeru izračunana le iz dveh točk, ker je potem že prišlo do odmiranja bakterije *C. jejuni*, vzorčili pa smo samo ob času 0 in 8 ur in šele nato na vsake 4 ure.



Slika 20: Primerjava dinamike rasti bakterije *C. jejuni* v primeru kontrole in v primeru infekcije 12 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.

Prikazana je koncentracija celic za kontrolo-bakterije *C. jejuni* (■) in koncentracija celic v primeru infekcije 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi (□). Sprostitev bakteriofagov iz gostiteljske celice za primer infekcije bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi je razvidna iz zelenih trikotnikov (△).

4.3 PRENOS GOJENJA BAKTERIJE *C. jejuni* V 2 L BIOREAKTOR

Uporabili smo bioreaktor domače izdelave z volumnom medija 600 ml. Naredili smo tri ločene eksperimente: gojenje bakterijske kulture s 24 urnim inokulumom in z 12 urnim inokulumom in infekcijo 24 urne kulture *C. jejuni* z bakteriofagi. V medij smo vpihovali mešanico plina 3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂. Mešali smo s hitrostjo 30 obr./min.

Preglednica 4: V preglednici so zbrani podatki eksperimentov optimizacije gojenja v 2 l bioreaktorju. Prikazani so podatki o CFU/ml in PFU/ml za posamezen eksperiment.

Eksperiment	Inokulum	t=0	t=24
gojenje bakterije <i>C. jejuni</i>	24urni	$4,8 \times 10^5$ CFU/ml	$6,2 \times 10^7$ CFU/ml
	12urni	$2,1 \times 10^5$ CFU/ml	7×10^7 CFU/ml
infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	24urni	1×10^5 CFU/ml 1×10^4 PFU/ml	$3,1 \times 10^5$ CFU/ml $1,3 \times 10^6$ PFU/ml

4.4 PRIDOBIVANJE BAKTERIOFAGOV V 30 L BIOREAKTORJU

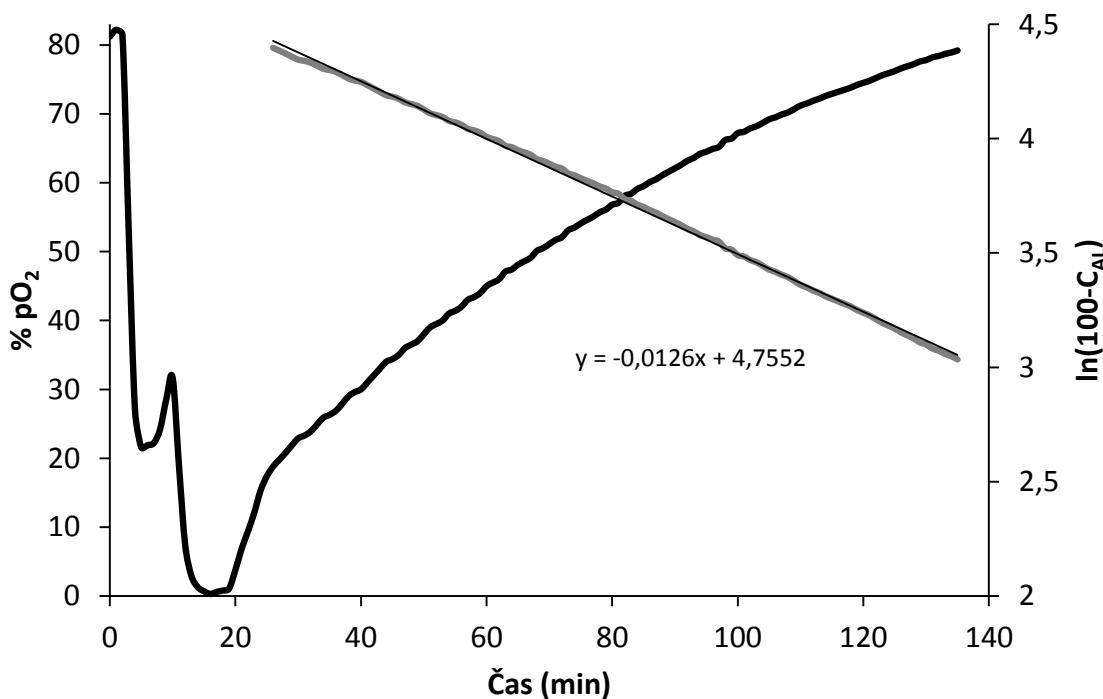
Za namnoževanje bakteriofagov v bioreaktorju smo uporabili 30 l bioreaktor Techfors-S povezan s spektrofotometrom za merjenje optične gostote.



Slika 21: Na sliki je 30 l bioreaktor Techfors-S s spektrofotometrom za merjenje optične gostote.

4.4.1 Merjenje k_{LA} in razmerje hitrosti prenosa kisika proti porabi kisika

Koeficient prenosa kisika, k_{LA} , smo v bioreaktorju v 15 l vode določili z razplinjevalno metodo, ki je opisana v poglavju 3.2.9. Koeficient prenosa kisika, k_{LA} , smo izračunali po enačbi 10, kjer naklon premice predstavlja $-k_{LA}$. Iz naklona premice smo določili $k_{LA} 0,0126 \text{ min}^{-1}$ (slika 22).



Slika 22: Določanje koeficienta prenosa kisika, $k_L a$, po razplinjevalni metodi.

Razplinjevalna metoda je opisana v poglavju 3.2.9. $k_L a$ smo izračunali po enačbi 11, kjer je naklon premice enak $-k_L a$.

Enako kot v poglavju 4.1.3.3. smo še za bioreaktorski sistem preverili velikost člena hitrosti prenosa kisika proti hitrosti porabe kisika. Izračun:

$$0,0126 \text{ min}^{-1}(250 \text{ nmol } O_2 \text{ ml}^{-1} - 0) = 1920 \text{ nmol } O_2 \text{ ml}^{-1} \times 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$3,175 \text{ nmol } O_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1} < 192 \text{ nmol } O_2 \text{ ml}^{-1}$$

Člena sta v razmerju 1 proti 60.

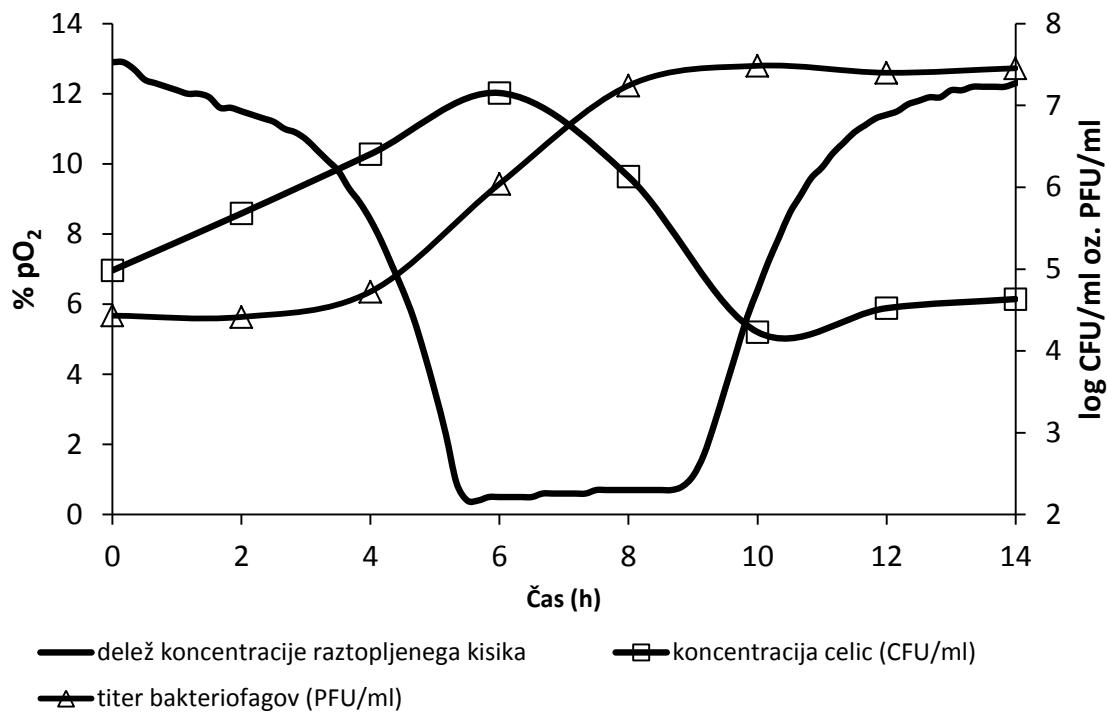
4.4.2 Namnoževanje bakteriofagov z 12 urno gostiteljsko bakterijo *C. jejuni* v bioreaktorju

Bakteriofage smo namnoževali pri temperaturi 42 °C, hitrosti mešanja 30 obr./min in gojišče smo prepihovali s 3 % O_2 , 10 % CO_2 in 87 % N_2 pri hitrosti 20-25 l/h. Delovni volumen je bil 15 l. Pred inokulacijo smo gojišče nasičili z mešanico plina in počakali, da se je delež koncentracije raztopljenega kisika ustalil na % pO_2 blizu 12 (glej 4.1.3.1; tudi v tem primeru je pO_2 elektroda kalibrirana na zrak). Sproti smo s pO_2 elektrodo spremljali delež koncentracije raztopljenega kisika in vrednosti optične gostote (slika 23, slika 24). Vzorčili smo na vsaki dve uri. Del vzorca smo takoj porabili za metodo določanja kolonijskih enot, del vzorca pa smo centrifugirali in supernatant shranili na 4 °C do analize določanja titra bakteriofagov (PFU/ml).

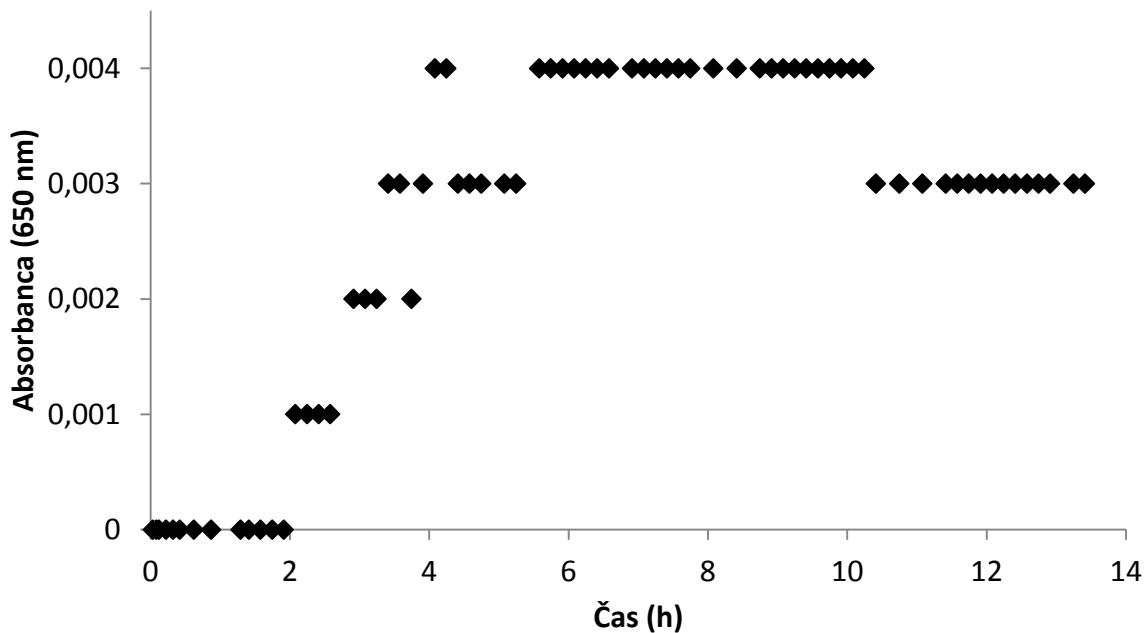
Za inokulum smo uporabili 24 urno kulturo, ki smo jo razredčili v svežem mediju do 10^5 CFU/ml in inkubirali 12 ur v mikroaerofilni atmosferi (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), ki smo jo zagotovili z uporabo CampyGen™ vrečk. Bioreaktor smo inokulirali z 1,5 l 12 urne kulture *C. jejuni* s koncentracijo celic 8×10^5 CFU/ml in dodali smo 300 µl bakteriofaga PC5. Razvidno je, da je v prvih šestih urah prišlo do hitrega podvojevanja bakterije *C. jejuni* in hitre porabe deleža koncentracije raztopljenega kisika. 6 ur po inokulaciji se je delež koncentracije raztopljenega kisika znižal do najnižje točke in 9 ur po inokulaciji je delež koncentracije raztopljenega kisika začel strmo naraščati nazaj na začetno vrednost. 10 ur po inokulaciji smo določili najnižjo koncentracijo celic $1,7 \times 10^4$ CFU/ml in najvišji titer bakteriofagov $3,1 \times 10^7$ PFU/ml. Koncentracija bakterij *C. jejuni* je 12 h po inokulaciji začela rahlo naraščati (slika 23). Delež koncentracije raztopljenega kisika je 14 h po inokulaciji dosegel začetno vrednosti, zato smo proces ustavili tako, da smo brozgo spraznili iz bioreaktorja in jo centrifugirali, sterilno filtrirali in shranili na 4 °C do nadaljnje uporabe. Iz podatkov pO₂ elektrode in CFU/ml smo določili maksimalno specifično hitrost rasti in generacijski čas (preglednica 5).

Preglednica 5: Maksimalna specifična hitrost rasti (h^{-1}) in generacijski čas (min) bakterije *C. jejuni* za infekcijo *C. jejuni* z bakteriofagi iz podatkov o koncentraciji celic (CFU/ml) oz. iz podatkov o deležu koncentracije raztopljenega kisika (% pO₂).

	% pO ₂	CFU/ml
Maksimalna specifična hitrost rasti	$0,810 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$	$0,832 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$
Generacijski čas	51 ± 3,5 min	50 ± 3,9 min



Slika 23: Primer infekcije 12 urne gostiteljske bakterije *C. jejuni* z bakteriofagom PC5 v 15 l bioreaktorju. V prvi faziji bioprosesa zasledimo hitro naraščanje koncentracije celic *C. jejuni* (□) kar sovпадa z zmanjševanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika (—). V drugi faziji bioprosesa pride do sprostitev bakteriofagov iz gostiteljske celice kar se odraži v naraščanju titra bakteriofagov (Δ) in naraščanju deleža koncentracije raztopljenega kisika.



Slika 24: Meritve optične gostote za namnoževanje bakteriofagov z 12 urno kulturo *C. jejuni*.

Kot je razvidno smo na meji detekcije, vseeno pa se kaže trend naraščanja koncentracije celic do 6 ur po inokulaciji.

5 RAZPRAVA

Skladno z namenom magistrskega dela smo optimizirali rast bakterije *C. jejuni* in optimizirali namnoževanje bakteriofagov na gostiteljski bakteriji. Najoptimalnejši proces namnoževanja bakteriofagov smo prenesli na bioreaktorski nivo.

5.1 OPTIMIZACIJA RASTI BAKTERIJE *C. jejuni*

Za proizvodnjo bakteriofagov je potrebno zagotoviti uspešno rast gostiteljske celice (Sauvageau in Cooper, 2010), kar smo v našem primeru zagotovili z optimizacijo inokuluma in optimizacijo procesnih parametrov.

5.1.1 Preverjanje možnosti gojenja bakterije *C. jejuni*

Primerjali smo rast bakterije *C. jejuni* v 50 ml tekoči kulturi v mikroaerofilni atmosferi (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) in v atmosferi z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂ in 70,27 % N₂. Čeprav v literaturi zasledimo podatke, da je optimalna atmosfera za rast bakterije *C. jejuni* mikroaerofilna sestavljena iz 5 % O₂, 10 % CO₂ in 85 % N₂ (Garenaux in sod. 2008; Park, 2002) smo pokazali, da naš bakterijski sev *C. jejuni* LBA65 raste enako dobro pri občutno višji koncentraciji kisika. V mikroaerofilni atmosferi kot tudi v atmosferi z višjo koncentracijo kisika smo dosegli enako povečanje koncentracije celic po 24 h rasti in enake prehode v eksponentno in stacionarno fazo (glej sliko 7 stran 27). S tem eksperimentom smo potrdili, da je rast bakterije *C. jejuni* v tekočem gojišču možna in da ni bistvene razlike v dinamiki rasti med gojenjem v mikroaerofilni atmosferi in v atmosferi z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂ in 70,27 % N₂. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da bomo za zagotavljanje ustrezne atmosfere uporabljali vpihovanje CO₂ v inkubator. Za izvajalca je vpihovanje CO₂ v inkubator enostavnnejše in predvsem cenejše. Za spremljanje bakterijske rasti je uporabna in zanesljiva metoda določanja števila kolonijskih enot, a je precej zamudna, saj podatke o koncentraciji celic dobimo šele naslednji dan. Izkazalo se je, da bakterija *C. jejuni* raste do zelo nizkih vrednosti optične gostote (600 nm) in kot take jih ni možno upoštevati kot zanesljive in ne moremo trditi ali je sprememba optične gostote posledica bakterijske rasti ali pa gre za napako meritve. Wright in sod. (2009) prav tako poročajo o nizki optični gostoti pri meritvah za določitev rastne krivulje bakterije *C. jejuni*.

5.2 SPREMLJANJE RASTI S SISTEMOM S pO₂ IN pH ELEKTRODO

V prejšnji točki smo izpostavili problematičnost določanja biomase z merjenjem optične gostote. Za optimizacijo rasti bakterije *C. jejuni* je ključnega pomena, da lahko pridobimo podatke o rasti takoj in ne šele naslednji dan, kot je to mogoče z metodo štetja kolonij. S sistemom s pO₂ in pH elektrodo smo sprotno spremljali dinamiko rast. Ugotovili smo, da v primeru kontrole (gojišče) signal pO₂ elektrode ostane nespremenjen, ker ni prisotne bakterijske kulture, medtem ko se v primeru inokuliranega medija signal spreminja (glej

sliko 9, stran 28). Sklepali smo, da nam pO₂ elektrode lahko pokažejo fiziologijo rasti mikroorganizma. Paš in Raspot (2010) navajata da se hitrost porabe kisika spreminja s časom zaradi vedno večje koncentracije celic. Prehod bakterijske kulture v eksponentno fazo rasti in posledično večje število celic se je izrazilo v povečani porabi kisika in posledično nižji koncentraciji kisika v mediju, kar se odrazi v spremembi signala pO₂ elektrode. Znižanje deleža raztopljenega kisika se zgodi 10 h po inokulaciji.

S pH elektrodami smo spremljali pH gojišča. Ugotovili smo, da se nam pH spremeni v vseh treh vzorcih, tudi v kontroli (gojišče) (glej sliko 10 stran 29). Sprememba pH ni posledica bakterijske rasti in ni merodajna za spremljanje fiziologije, pač pa je posledica zakisanja gojišča s CO₂. CO₂ se v vodi raztopi in tvori šibko ogljikovo kislino (H₂CO₃). Ogljikova kislina šibko in reverzibilno reagira z vodo in tvori oksonijev kation (H₃O⁺) in bikarbonatni ion (HCO₃⁻) (Roughton in Booth, 1938). Ta kemijska reakcija razloži zakaj se gojišču pH spremeni, ko v inkubator vpihujemo CO₂.

5.2.1 Ovrednotenje sistema s pO₂ elektrodami

S prepihovanjem medija z mešanico plinov (3 % O₂, 10 % CO₂ in 87 % N₂) smo preverili ustreznost kalibracije elektrod. Po prepihovanju se nam je signal ustalil na 15 % pO₂ (glej sliko 11 stran 30). Razmerje kisika med mešanico in zrakom je 14,31 %. Ker je vrednost deleža koncentracije raztopljenega kisika po prepihovanju skoraj enaka vrednosti deleža kisika med mešanico in zrakom, smo potrdili ustreznost kalibracije pO₂ elektrode.

V erlenmajerici z 250 ml medija in brez mešanja je vrednost k_La 0,0018 min⁻¹ (glej sliko 12 stran 31). Vrednost k_La je nizka, kar ni presenetljivo, saj pri merjenju nismo uporabili prepihovanja in mešanja. Na velikost k_La namreč v največji meri vplivajo prepihovanje, mešanje in sestava medija (Doran, 1995). Za primerjavo, Wainwright in sod. (2005) so v 200 ml vode z mešanjem pri 115 obr./min določili k_La 0,06 min⁻¹.

Z izračunom po enačbi 9 smo dokazali, da je hitrost prenosa kisika iz zračnih mehurčkov zanemarljivo nizka glede na hitrost porabe kisika mikroorganizma. Nizka hitrost prenosa kisika iz zračnih mehurčkov gre predvsem na račun nizke k_La, ker pri eksperimentih v erlenmajericah nismo uporabili mešanja in prepihovanja. Pri nadaljnjih izračunih iz krivulj pO₂ elektrod lahko zanemarimo hitrost prenosa kisika, ker nam te vrednosti ne bodo bistveno vplivale na hitrost porabe kisika mikroorganizma.

5.2.2 Povezava znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika s koncentracijo celic

Sklepali smo, da je znižanje koncentracije raztopljenega kisika merilo za dinamiko rasti mikroorganizmov. Pokazali smo sovpadanje znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika merjenega s pO_2 elektrodo z naraščanjem koncentracije celic. Na sliki 13 (glej stran 33) je za obe metodi (metoda določanja števila kolonijskih enot in merjenje deleža koncentracije raztopljenega kisika) razvidno sovpadanje prehoda v eksponentno fazo rasti. Podatki iz pO_2 elektrod nam jasno kažejo, da raztopljeni kisik porabijo mikroorganizmi za rast. S spremjanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika preko pO_2 elektrode lahko določimo prehod v eksponentno fazo rasti. Maksimalna specifična hitrosti rasti je bila $0,298 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ določena iz koncentracije celic, oz. $0,315 \text{ h}^{-1}$ določena iz vrednosti pO_2 elektrod. Konkel in sod. (2007) so izračunali maksimalno specifično hitrost rasti določeno iz koncentracije celic $0,46 \text{ h}^{-1}$ za sev *C. jejuni* F38011 oz. $0,231 \text{ h}^{-1}$ za sev *C. jejuni* 02-833L. Teh vrednosti sicer ne moremo direktno primerjati z našimi, saj so bili pogoji gojenja drugačni: Konkel in sod. (2007) so uporabili stresanje pri 60 obr./min in temperaturo gojenja 37°C , medtem, ko je bila naša temperatura gojenja 42°C in brez stresanja. Vsekakor pa se naše vrednosti maksimalne specifične hitrosti rasti ujemajo s podatki iz literature, kjer je maksimalna specifična hitrost rasti bakterije *C. jejuni* med $0,462 \text{ h}^{-1}$ in $0,138 \text{ h}^{-1}$ (Wilson in sod., 2009). V tej fazi smo tudi opustili pripravo inokuluma iz trdnega gojišča. Ugotovili smo, da pri pripravi inokuluma iz trdnega gojišča in merjenjem optične gostote ni mogoče zagotoviti enakega števila živih celic v enakem fiziološkem stanju. Podobnega mnenja so tudi Wright in sod. (2009). Z uporabo prekonočne kulture lahko zagotovimo enako število živih celic v enakem fiziološkem stanju in tako lažje primerjamo podatke posameznih gojenj.

Preverili smo vpliv volumna inokuluma na znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika in dinamiko bakterijske rasti. Madigan in sod. (2000) navajajo, da je dolžina lag faze odvisna od količine kulture uporabljene za inokulum, kar je skladno z našimi rezultati, kjer lag faze v primeru večjega volumna inokuluma praktično ni (glej sliko 14 stran 34). Z večjim volumnom inokuluma smo zmanjšali vpliv redčitvenega šoka v svežem gojišču. Seveda pa je pri tem potrebno upoštevati, da volumen inokuluma ne presega 10 % delovnega volumna bioreaktorja (Christi, 2010). Pri obeh volumnih inokuluma smo dosegli enako končno koncentracijo celic 10^8 CFU/ml . V tej točki je lahko prišlo do takšne porabe hrani, ki ne omogoča več podvojevanja celic oz. je omejitveni faktor koncentracija raztopljenega O_2 oz. CO_2 . Volumen inokuluma ne vpliva na maksimalno specifično hitrost rasti, ki je v obeh primerih $0,309 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$, ampak kot že rečeno vpliva na začetek eksponentne faze.

5.2.3 Optimizacija vpihovanja CO₂

Bakterija *C. jejuni* je mikroaerofilen mikroorganizem in ne raste na zraku (Park, 2002), kar smo potrdili s poskusom gojenja v tekočem gojišču na zraku (slika 15 stran 35). Ugotovili smo, da izpostavitev celic zraku za 24 h povzroči popolno izgubo kultivabilnosti. Popolnoma drugačne rezultate poroča Klančnik (2006), ki v svojem delu navaja ohranitev kultivabilnosti po izpostavitvi bakterije *C. jejuni* oksidativnemu stresu; poroča o skoraj enakem številu celic (CFU/ml) v kontroli in v 24 h izpostavljeni kulturi oksidativnemu stresu. V izpostavljeni kulturi oksidativnemu stresu poroča o 20 % izgubi živosti in o transformaciji celic iz spiralne v kokoidno obliko. V neugodnih okoljskih pogojih lahko celice preidejo iz tipične spiralne v kokoidno obliko (Parkhill in sod., 2000). Pri našem poskusu nismo preverjali živosti in pojav kokoidne oblike in je možno, da so celice pri gojenju na zraku izgubile zgolj kultivabilnost, ostale pa so žive. Pri poskusu »izklopa CO₂«, kjer smo prvih 8 ur gojili v atmosferi z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 % dalje pa na zraku, smo dosegli enako končno koncentracijo celic kot v primeru kontrole v mikroaerofilni atmosferi (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂), ki smo jo zagotovili z uporabo CampyGen™ vrečk (slika 16 stran 36). Rezultati nakazujejo, da obstaja možnost rasti bakterije *C. jejuni* na zraku, le da je v prvih urah oz. do prehoda v eksponentno fazo rasti potrebno zagotoviti višjo koncentracijo CO₂ in nižjo koncentracijo O₂ v primerjavi z deleži v zraku. Za potrditev te hipoteze pa bi bili potrebni še dodatni poskusi. Bolton in Coates (1983) sta preučevala zahteve kampilobaktrrov po CO₂ in O₂. Ugotovila sta, da je rast bakterije *C. jejuni* brez CO₂ zelo slaba oz. sploh ne pride do rasti. V prisotnosti 1-15 % CO₂ je bila rast dobra in se je rahlo povečevala z višjo koncentracijo CO₂. Bolton in Coates (1983) sta v atmosferi sestavljeni iz 21 % O₂ in 10 % CO₂ dosegla rast bakterije *C. jejuni*. Zaključila sta, da je CO₂ prav tako pomemben za rast kot O₂ in da so optimalne koncentracije za gojenje bakterije *C. jejuni* 5-10 % CO₂ in 10 % O₂.

Vpihanje 1 % čistega CO₂ v inkubator povzroči minimalno rast bakterije *C. jejuni*. Z vpihanjem 1 % CO₂ dobimo namreč atmosfero sestavljeno iz 20,74 % O₂, 1,03 % CO₂, 77,29 % N₂. Iz tega lahko sklepamo, da že minimalna spremembra v deležu O₂ oz. bolj verjetno CO₂ vpliva na kultivabilnost bakterije *C. jejuni*. V omenjenem primeru je signal pO₂ elektrode ostal nespremenjen, ker je bila rast skoraj neznatna in število celic premajhno, da bi porabo kisika lahko zaznale pO₂ elektrode in bi se odrazila v znižanju koncentracije raztopljenega kisika (slika 15 stran 35). Ugotovitve Boltona in Coatesa (1983) o pomembnosti CO₂ lahko razložijo naše rezultate, kjer smo dobili rahlo rast pri vpihanju 1 % čistega CO₂ in odsotnost rasti brez CO₂. Pri vpihanju 3 % čistega CO₂ je bila razlika med začetno in končno koncentracijo celic najvišja, do znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika pa je prišlo kasneje, kot v primeru vpihanja 5 oz. 10 % čistega CO₂. V prejšnjih eksperimentih (glej 4.1.4, 4.1.4.1) smo pokazali, da je za zaznavo znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika s pO₂ elektrodo potrebna določena koncentracija celic. Ta koncentracija celic je bila za tri neodvisne eksperimente

$3,7 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6$ CFU/ml. To lahko razloži nenadno znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika v primeru vpihovanja 10 % čistega CO₂, saj je bila začetna koncentracija celic že tako visoka ($2,5 \times 10^6$ CFU/ml), da so prisotnost celic takoj zaznale pO₂ elektrode in je zato v tem primeru takoj prišlo do znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika. 24 h po inokulaciji so celice že lahko prešle v fazo odmiranja zaradi pomanjkanja substrata oz. ustreznega plina in smo zato določili nižjo končno koncentracijo celic, kot pa v primeru vpihovanja 3 % čistega CO₂. Poskus optimizacije vpihovanja CO₂ nam tako ni popolnoma uspel, saj na podlagi dobljenih rezultatov ni možno zaključiti katera atmosfera je najbolj primerna za gojenje bakterije *C. jejuni*. Zanimivo pa je, da pri vpihovanju 3, 5 oz. 10 % čistega CO₂ dobimo občutno višjo koncentracije O₂ (20,32, 19,9 oz. 18,86 % O₂) od koncentracije 5 % O₂, ki se v literaturi najpogosteje omenja kot optimalna za rast bakterije *C. jejuni* (Garenaux in sod. 2008; Park, 2002).

5.3 OPTIMIZACIJA NAMNOŽEVANJA BAKTERIOFAGOV

Optimizirali smo postopek namnoževanja bakteriofagov specifičnih za bakterijo *Campylobacter* v tekočem gojišču in atmosferi z 19,9 % O₂, 5,03 % CO₂, 74,18 % N₂. Potek procesa smo spremljali sproti z merjenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika v procesni brozgi (glej sliko 17 stran 38 in sliko 19 stran 40). Kot smo že potrdili, delež koncentracije raztopljenega kisika nakazuje dinamiko rasti kulture in posledično tudi namnoževanje bakteriofagov. Pri kontroli-gojenje bakterije *C. jejuni* zasledimo enak trend znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika kot pa smo ga v prejšnjih poskusih gojenja bakterije *C. jejuni*. Pri infekciji bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi v prvi fazi bioprosesa zasledimo rast bakterije *C. jejuni* in posledično znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika na vrednost blizu nič. V drugi fazi bioprosesa pride do naraščanja deleža koncentracije raztopljenega kisika, ker ni več porabe kisika zaradi lize celic. Uspešna infekcija z bakteriofagi povzroči lizo celic pri kateri se sprostijo namnoženi bakteriofagi. Ugotovili smo, da s sledenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika merjenega s pO₂ elektrodami lahko napovemo čas lize in s tem sprostitev bakteriofagov. Ko delež koncentracije raztopljenega kisika začne ponovno naraščati, vemo da je proces končan in proces ustavimo s centrifugiranjem in sterilno filtracijo procesne brozge. Ugotovitev, da je metoda sledenja procesa z merjenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika primerna za spremljanje bioprosesa je pomembna, saj standardna metoda sledenja procesa (optična gostota) pri tej bakteriji ne da zadovoljivih rezultatov.

Primerjali smo namnoževanje bakteriofagov z uporabo gostiteljske 24 urne kulture oz. 12 urne kulture. V obeh primerih infekcije 24 urne oz. 12 urne kulture z bakteriofagi, pride do znižanja deleža koncentracije raztopljenega kisika eno uro kasneje v primerjavi s kontrolo-gojenje 24 urne oz. 12 urne kulture *C. jejuni* (glej sliko 17 stran 38 in sliko 19 stran 40). Ker smo v obeh primerih (infekcija kulture z bakteriofagi in kontrola-gojenje kulture *C. jejuni*) uporabili isti inokulum, je zamik posledica infekcije kulture z

bakteriofagi. Bakteriofagi so že povzročili lizo nekaterih celic, kar je povzročilo kratek zamik v znižanju deleža koncentracije raztopljenega kisika glede na kontrolo. Ugotovili smo da se celotni proces zaključi z 12 urno kulturo bistveno hitreje, v primerjavi s 24 urno kulturo (glej sliko 19 stran 40 in sliko 20 stran 41). Proces je bil z uporabo 12 urne kulture zaključen med 11 in 15 h po inokulaciji, z uporabo 24 urne kulture pa smo dosegli končni bakteriofagni titer šele 34 h po inokulaciji. Na tem mestu ne moremo zaključiti katero fiziološko stanje kulture je bolj primerno za namnoževanje bakteriofagov, dejstvo pa je da z uporabo 12 urne kulture zmanjšamo lag fazo in kultura hitreje oz. takoj preide v eksponentno fazo rasti in se tako nemudoma prične rast z maksimalno specifično hitrostjo rasti. Hitrost bioprosesa je povezana z maksimalno specifično hitrostjo rasti kulture. Uporaba 12 urne kulture za namnoževanje bakteriofagov je primernejša, saj končni titer bakteriofagov dosežemo hitreje. Krajši čas gojenja pomeni nižje stroške proizvodnje. V obeh primerih smo dobili končni titer bakteriofagov 10^6 PFU/ml. Podatki iz literature po lizi gostiteljske celice poročajo o sprostitvi na stotine novih virusnih delcev (Connerton in sod., 2011; Gutmann in sod., 2004). Morda nizek titer lahko predpišemo zahtevni fiziologiji gostiteljske bakterije rodu *Campylobacter*. Iz literature so znani podatki o visokih titrih predvsem za bakteriofage gostiteljske bakterije *Escherichia coli*. Možna pa je tudi naknadna inaktivacija bakteriofagov, ki se vežejo na površino liziranih bakterijskih celic.

5.4 PRENOS GOJENJA BAKTERIJE *C. jejuni* V 2 L BIOREAKTOR

Rezultati gojenja v erlenmajerici s pO_2 elektrodo so nam dali prve informacije o poteku infekcije. Tako gojenje ima določene pomanjkljivosti, kot sta odsotnost mešanja in vpihanje plina v inkubator in ne direktno v medij. Uporabili smo 2 L bioreaktor s hitrostjo mešanja 30 obr./min in vpihanjem 3 % O_2 , 10 % CO_2 in 87 N_2 . Zanimalo nas je, ali mešanje in preprihanje z optimalno mešanicijo plinov vpliva na rast same kulture in potek infekcije. Rezultati rasti kulture s 24 urnim in 12 urnim inokulumom so primerljivi z rezultati gojenja v erlenmajericah-po 24 h gojenja smo dosegli primerljivo končno koncentracijo celic (glej preglednico 4 stran 42). Pri namnoževanju bakteriofagov s 24 urno kulturo smo prav tako dosegli končni titer bakteriofagov 10^6 PFU/ml, s to razliko, da smo ga dosegli skoraj 10 ur prej kot pa v erlenmajerici. Hitreje dosežen končni titer lahko razložimo z uporabo mešanja. Z mešanjem smo omogočili več možnosti za trk bakteriofagov s celicami in višjo k_{LA} in posledično hitrejši prenos kisika. Za rast bakterije *C. jejuni* je pomembna ustrezna atmosfera in s hitrejšim prenosom kisika smo zagotovili več raztopljenega kisika v brozgi in s tem boljše pogoje za rast in višjo maksimalno specifično hitrost rasti.

5.5 PRIDOBIVANJE BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU

Razvoj fagne terapije je tesno povezano z učinkovitostjo in stroški proizvodnje bakteriofagov. Pri bakterijah rodu *Campylobacter* se je gojenje bakteriofagov izkazalo za omejujoči dejavnik za testiranje učinkovitosti v večjem merilu. Razvili smo enostaven proces v bioreaktorju, kjer namnožujemo bakteriofage z 12 urno kulturo in preko deleža koncentracije raztopljenega kisika merjenega s pO₂ elektrodo spremljamo potek infekcije in optimalno žetev produkta.

Uporabili smo kultivacijo v tekoči fazi, ki je najlažje vodljiv bioprocес, razmere v bioreaktorju pa so najbližje optimalnim (Raspor in Smole Možina, 1993). Bioprocес praktično nima lag faze, kar smo dosegli z večstopenjsko generacijo inokuluma, ki ne presega 10 % delovnega volumna (Christi, 2010) in z 12 urnim inokulumom. Fenomen bioprosesa je takojšen prehod v eksponentno fazo rasti in izredno visoka maksimalna specifična hitrost rasti ($0,832 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$), kar pomeni generacijski čas zgolj 50 min (preglednica 5 stran 44). Pri prejšnjih poskusih nismo dosegli podobne hitrosti rasti, takega generacijskega časa nismo zasledili niti v literaturi. Kot že omenjeno, so Wilson in sod. (2009) po pregledu do takrat objavljene literature zasledili generacijske čase za bakterijo rodu *Campylobacter* med 90 min in 5h. Neznačilno hitrost rasti za bakterijo rodu *Campylobacter* lahko prepisujemo optimalnim pogojem v bioreaktorju. Ker je *Campylobacter* mikraerofilen mikroorganizem, je pri bioprocесu potrebno zagotoviti optimalno razapljanje plinov (O₂ in CO₂). Razapljanje je stopnja, ki omejuje globalno hitrost procesa in s tem učinkovitost bioprosesa (Doran, 1995). Ustrezno količino raztopljenih plinov smo zagotovili z višjim k_{LA} ($0,0126 \text{ min}^{-1}$), kar smo dosegli z mešanjem in prepihovanjem. Z mešanjem smo preprečili posedanje celic in povečali možnost za trke med bakteriofagi in celicami.

Pri tem bioprocесu smo najhitreje dosegli končni titer bakteriofagov, ki je bil tudi naš najvišji dobljeni titer pri namnoževanju bakteriofagov v tekoči kulturi ($3,1 \times 10^7 \text{ PFU/ml}$) (glej slika 23 stran 45). Bioprocес namnoževanja bakteriofagov je bil zaključen 10 ur po inokulaciji, kar sovpada tudi z zvišanjem deleža koncentracije raztopljenega kiska. Najhitreje zaključen bioprocес je povezan z visoko maksimalno specifično hitrostjo rasti, ki je tesno povezana z zaključkom bioprosesa. Višji titer prav tako lahko prepisujemo visoki maksimalni specifični hitrosti rasti bakterije in posledično visoki bakterijski koncentraciji. Ko je začel titer bakteriofagov naraščati, je bila koncentracija celic še vedno 10^7 CFU/ml in tako dovolj velika gostota gostiteljskih celic na razpolago za infekcijo in nov cikel razmnoževanja bakteriofagov. Sargeant in sod. (1968) so ugotovili, da do določene celične gostote narašča titer bakteriofagov z gostoto celic. Pri proizvodnji bakteriofagov v bioreaktorju smo sproti spremljali optično gostoto z meritvami na vsakih 10 min (glej slika 24 stran 45). Pri meritvah smo na meji detekcije, vseeno pa se kaže trend

naraščanja koncentracije celic. Pokazali smo, da sprotno merjenje optične gostote s pogostimi časovnimi intervali omogoča oceno bakterijske rasti.

Ugotovili smo, da je namnoževanje bakteriofagov specifičnih za bakterijo *C. jejuni* v večjem merilu enostavnejše, ko je sprva kazalo. Dosegli smo zadovoljivo hitrost bioprosesa in dobit bakteriofagov. Kot smo ugotovili tudi sami, ima zaprt bioprocес pomankljivosti, ki jih Sauvageau (2010) navaja kot razmeroma dolg časovni interval med koncem ene šarže in pričetkom nove, zaradi raznih priprav, čiščenja in sterilizacij. Na tem mestu bi bil smiseln razvoj v postavitev kontinuirnega sistema za namnoževanje bakteriofagov.

6 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Delno smo potrdili hipotezo da je specifična hitrost rasti bakterije rodu *Campylobacter* v biopresusu z enkratnim polnjenjem odvisna od koncentracije raztopljenega kisika v mediju in sestave plinske mešanice. V bioreaktorju smo z optimalnimi pogoji dosegli visoko specifično hitrost rasti bakterije. Rezultati nakazujejo, da je specifična hitrost rasti najverjetneje odvisna od koncentracije O₂ in CO₂.
- Ovrgli smo hipotezo, da fiziološko stanje gostiteljske bakterije rodu *Campylobacter* vpliva na končno koncentracijo bakteriofagov v mediju. Fiziološko stanje gostiteljske bakterije vpliva na hitrost biopresusa. Z uporabo 12 urne kulture dosežemo takojšnjo rast z maksimalno specifično hitrostjo, s katero je povezana hitrost biopresusa.
- Pokazali smo, da je biopreses razvit v erlenmajericah mogoče učinkovito prenesti v bioreaktor. V bioreaktorju smo dosegli hitrejši zaključek biopresusa in višjo dobit bakteriofagov. Z uravnanimi okoljskimi pogoji smo dosegli višjo hitrost rasti in posledično boljšo produkcijo.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Bakterije rodu *Campylobacter* so glavni povzročitelji akutnega bakterijskega enteritisa pri ljudeh. Primarni izvor okužbe je zaužitje kontaminirane hrane živalskega izvora. Večina okužb je blagih in minejo same od sebe, lahko pa se pojavijo daljše okužbe, ki zahtevajo uporabo antibiotikov. Bakterije rodu *Campylobacter* so vedno bolj odporne na klinično pomembne antibiotike. Alternativo za zdravljenje bakterijskih okužb predstavlja fagna terapija z uporabo *Campylobacter* specifičnih bakteriofagov. V delu smo optimizirali gojenje bakterije *C. jejuni*. Rast bakterije *C. jejuni* je namreč predpogoj za uspešno namnoževanje bakteriofagov. Z eksperimenti v prvem delu naloge smo določili optimalne pogoje rasti, in sicer: uporaba prekonočnega inokuluma in atmosfera sestavljena iz 3-20 % O₂, 3-10 % CO₂ v dušiku. Ugotovili smo, da bakterija *C. jejuni* enako dobro raste v širokem razponu O₂ in CO₂, pri tem pa je pomembno, da z mešanjem in prepihanjem zagotovimo ustrezni prenos in razapljanje O₂ in CO₂. Ker standardna metoda sledenja procesa (optična gostota) pri tej bakteriji ne da zanesljivih rezultatov, smo razvili metodo sledenja procesa z merjenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika. S to metodo lahko sprotno spremljamo dinamiko rasti bakterije *C. jejuni* in določimo prehod v eksponentno fazo rasti. V drugem delu naloge smo optimizirali postopek za namnoževanje bakteriofagov. Razvoj fagne terapije je namreč tesno povezan z učinkovitostjo in stroški proizvodnje bakteriofagov. Pri bakterijah rodu *Campylobacter* se je gojenje bakteriofagov izkazalo za omejujoči dejavnik za testiranje učinkovitosti v večjem merilu. Za namnoževanje bakteriofagov smo kot optimalno določili uporabo 12 urne gostiteljske kulture. Pri namnoževanju bakteriofagov v prvi fazi bioprosesa zasledimo rast bakterij *C. jejuni* in posledično znižanje deleža koncentracije raztopljenega kisika zaradi porabe kisika pri podvojevanju bakterij. V drugi fazi bioprosesa pride do lize celic in odsotnost porabe kisika zaznamo z naraščanjem deleža koncentracije raztopljenega kisika. Ugotovili smo, da s sledenjem deleža koncentracije raztopljenega kisika lahko napovemo čas lize in s tem sprostitev bakteriofagov. Ko delež koncentracije raztopljenega kisika začne ponovno naraščati, vemo da je proces končan in proces ustavimo s centrifugiranjem in sterilno filtracijo procesne brozge. Pri prenosu optimalnega bioprosesa na bioreaktorski nivo smo z ustreznim mešanjem in prepihanjem dosegli visoko maksimalno specifično hitrost rasti. V bioreaktorju smo dosegli tudi najvišji titer pri namnoževanju bakteriofagov v tekočem gojišču. Pokazali smo, da je namnoževanje bakteriofagov specifičnih za bakterijo *C. jejuni* v večjem merilu možno in dokaj enostavno. Dosegli smo zadovoljivo hitrost bioprosesa in končni titer bakteriofagov. Razvili smo enostaven proces v bioreaktorju, kjer namnožujemo bakteriofage z 12 urno kulturo in preko deleža koncentracije raztopljenega kisika merjenega s pO₂ elektrodo spremljamo potek infekcije in optimalno žetev produkta.

7.2 SUMMARY

Campylobacter spp. are the main cause of acute enteritis in humans. Primary source of infection is consumption of contaminated food of animal origin. Most of the infections are mild and disappear on their own. The use of antibiotics is required if the infections last longer. *Campylobacter* spp. are becoming more resistant to clinically significant antibiotics. The alternative for treating bacterial infections is phage therapy with the use of *Campylobacter* specific bacteriophages. We optimized the cultivation of bacterium *C. jejuni*, since the growth of bacteria is a prerequisite for successful propagation of bacteriophages. For optimal growth conditions we determined the use of overnight inoculum and the atmosphere consisting of 3-20 % of O₂ and 3-10 % of CO₂ in nitrogen. Bacterium *C. jejuni* grows equally well in a wide range of O₂ and CO₂. It is important that we provide an appropriate transfer and dissolution of O₂ and CO₂ with stirring. Since a standard method of monitoring process (optical density) in this bacterium does not give reliable results, we developed a method of monitoring process with measuring the proportion of dissolved oxygen concentration. Using this method we can monitor the progress of growth of bacteria *C. jejuni* and determine the transition into exponential growth phase. Development of phage therapy is related to efficiency and cost of production of bacteriophages. Cultivation of bacteriophages using bacteria *Campylobacter* spp. proved to be a limiting factor for performance testing on a larger scale. We determined a 12 hour culture as optimal for propagation of bacteriophages. In the first phase of the bioprocess of propagation of bacteriophages we detected growth of bacteria *C. jejuni* and consequently the reduction of the proportion of dissolved oxygen concentration due to oxygen consumption in replication of bacteria. In the second phase of the bioprocess the lysis of the cells occurred and the absence of oxygen consumption was detected by the increase of the proportion of dissolved oxygen concentration. We established that by monitoring the proportion of dissolved oxygen concentration, we can predict the time of lysis and consequently the release of bacteriophages. When the proportion of dissolved oxygen concentration starts to increase again, it indicates that the process is completed, therefore we stop it by centrifugation and sterile filtration of process broth. When optimal bioprocess was transmitted to bioreactor level, with proper stirring and aeration, we achieved such a high maximum specific growth rate that it can not be found in any literature. The highest titer at propagation of bacteriophages in liquid medium was also achieved in the bioreactor. We have shown that the propagation of bacteriophages specific for the bacteria *C. jejuni* on a larger scale is possible and quite simple. We achieved a satisfactory rate of bioprocess and the final titer of bacteriophages. We developed a simple process in a bioreactor, where we propagate bacteriophages with a 12 hour culture and we monitor the course of infection and the optimal harvest of the product through the proportion of dissolved oxygen concentration measured by pO₂ electrode.

8 VIRI

- Abedon S.T., Herschler T.D., Stopar D. 2001. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 9: 4233-4241.
- Ackerman H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154, 4: 245-251
- Adams M.H. 1959. *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers, INC: 620 str.
- Atterbury R.J., Connerton P.L., Dodd C.E.R., Rees C.E.D., Connerton I.F. 2003. Isolation and characterisation of *Campylobacter* bacteriophage from retail poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 8: 4511-4518
- Barrow P.A., Soothill J.S. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 5, 7: 268-271
- Blatter F. R., Williams B.G., Blechl A.E., Denniston-Thompson K., Faber H.E., Furlong L.A., Grunwald D.J., Moore D.D., Schumm J.W., Sheldon E.L., Smithies O. 1977. Charon phages: Safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science*, 196: 161-169
- Bolton F.J., Coates D. 1983. A study of the oxygen and carbon dioxide requirements of thermophilic campylobacters. *Journal of Clinical Pathology*, 36, 7: 829-834
- Bolton F.J., Hutchinson D.N., Coates D. 1984. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 19, 2: 169-171
- Brown D.T., Anderson T.F. 1969. Effect of host cell wall material on the adsorbability of cofactos-requiring T4. *Journal of Virology*, 4, 1: 94-108
- Bujanover S. 2003. Production of bacteriophage compositions for use in phage therapy. US patent application WO200452274: 37 str.
- Cairns B.J., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., Payne R.J.H. 2009. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage–host dynamics and their application to phage therapy. *Plos Pathogens*, 5, 1: 1000253, 1-10
DOI:10.1371/journal.ppat.1000253
- Calendar R. 1988. *The bacteriophages*. New York, Springer: 614 str.
- Campbell A. 1961. Conditions for existence of bacteriophages. *Evolution*, 15: 153-156

Carla M., Carvalho C.M., Santos S.B., Kropinski A.M., Ferreira1 E.C., Azeredo J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. V: Bacteriophages. Kurtboke E. (ed.). Rijeka, InTech: 179-214

Carvalho C. M., Gannon B. W., Halfhide D. E., Santos S. B., Hayes C. M., Roe J. M., Azeredo J. 2010. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. BMC Microbiology 10, 232: 1-10
DOI:10.1186/1471-2180-10-232

Cheetham B.F., Katz M.E. 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. Molecular Microbiology, 18, 2: 201-208

Christi Y. 2010. Fermentation technology. V: Industrial biotechnology. Soetaert W., Vandamme E. J. (eds.). Weinheim, Wiley-VCH: 149-171

Christi Y. 1992. Build better industrial bioreactors. Chemical Engineering Progress, 88, 1: 55-58

Connerton P.L., Timms A.R., Connerton I.F. 2011. *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. Journal of Applied Microbiology, 111, 2: 255-265

Cuervo A., Carrascosa J.L. 2012. Bacteriophages: structure. Encyclopedia of life science, Chichester, John Wiley & Sons: 1-12
DOI: 10.1002/9780470015902.a0024053

Dekeyser P., Gossuin-Detrain M., Butzler J.P., Sternon J. 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. Journal of Infection Disease, 125: 390-392

Doran P.M. 1995. Bioprocess engineering principles. London, Academic Press: 439 str.

Doyle M.P., Roman D.J. 1981. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. Applied and Environmental Microbiology, 43, 3: 561-565

Duckworth D.H. 1976. Who discovered bacteriophage? Bacteriological Reviewes, 40, 4: 793-802

Eisenstark A. 1967. Bacteriophage techniques. V: Methods in virology, vol 1. Maramorosh K., Koprowski H. (eds.). New York, Academic Press: 449-524

Ellis E.L., Delbrück M. 1939. The growth of bacteriophage. Journal of General Physiology, 22, 3: 365-384

Foster G., Holmes B., Steigerwalt A. G., Lawson P. A., Thorne P., Byrer D. E., Ross H. M., Xerry J., Thompson P. M., Collins M. D. 2004. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov, isolated from marine mammals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 6: 2369–2373

Garénaux A., Jugiau F., Rama F., Jonge R., Denis M., Federighi M., Ritz M. 2008. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. Current Microbiology, 56, 4: 293–297

Guttman B., Raya R., Kutter E. 2004. Basic Phage Biology. V: Bacteriophages: biology and applications. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 28-66

Hendrix R.W., Smith M.C., Burns R.N., Ford M.E. Hatfull G.F. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 5: 2192–2197

Hoffman P.S., Goodman T.G. 1982. Respiratory physiology and energy conservation efficiency of *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology, 150, 1: 319-326

Holt J.G., Krier N.R., Sneath P.H.A., Staky J.T., Williams S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore, Maryland, Williams & Wilkins: 799 str.

Hunt M., Abeyta C., Tran T. 2001. Campylobacter. V: Bacteriological analytical manual. Jackson G.J., Merker R.I., Bandler R. (eds.). Silver spring, U.S. Food and Drug Administration: 1-21
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>
(avgust 2013)

Hutchinson D.N., Bolton F.J. 1984. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. Journal of Clinical Pathology, 37, 8: 956-957

International critical tables of numerical data, physics, chemistry and technology. 2003. Washburn, E.W. (ed.) 1 st. electronic ed. New York, National Research Council, Knovel: 3414 str.
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=735&VerticalID=0 (avgust 2013)

ISO 4833. 1991. Microbiology general guidance for the enumeration of microorganisms colony count technique at 30°C: 5 str.

- Jackson R.J., Elvers K.T., Lee L.J., Gidley M.D., Wainwright L.M., Lightfoot J., Park S.F., Poole R.K. 2007. Oxygen reactivity of both respiratory oxidases in *Campylobacter jejuni*: the cydAB genes encode a cyanide-resistant, low-affinity oxidase that is not of the cytochrome bd type. *Journal of Bacteriology*, 189: 1604-1615
- Khanna M.R, Bhavsar S.P, Kapadnis B.P. 2006. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 84-90
- Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 136 str.
- Konkel M.E., Christensen J.E., Dhillon A.S., Lane A.B., Hare-Sanford R., Schaberg D.M., Larson C.L. 2007. *Campylobacter jejuni* strains compete for colonization in broiler chicks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2297-2305
- Krueger A.P. 1931. The sorption of bacteriophage by living and dead susceptible bacteria. *Journal of General Physiology*, 14: 493–503
- Lee A., Smith S.C., Coloe P.J. 1998. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*, 61: 1609-1614
- Loc Carrillo C., Atterbury R .J., El-Shibiny A., Connerton P. L., Dillon E., Scott A., Connerton I. F. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6554–6563
- Luangtongkum T., Jeon B., Han J., Plummer P., Logue C. M., Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4, 2: 189-200
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed. Upper Saddle River, Prentice Hall: 991 str.
- Man S.M. 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 8: 669–685
- MonitShaker user manual ver 1.5. 2002. Ljubljana, BIA d.o.o., Podjetje za laboratorijsko in procesno opremo: 36 str.

Mass of a Bacterium. 2003. The Physics Factbook™. Elert G. (ed.). Brooklyn, Midwood High School at Brooklyn College: 1 str.
<http://hypertextbook.com/facts/2003/LouisSiu.shtml> (julij 2013)

Mueller J.H., Hinton J. 1941. A Protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 48: 330-333

Panikov N.S. 1995. Microbical growth kinetics. London, Chapman and Hall: 392 str.

Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G. 2000. The genome sequence of the food borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature, 403: 665-668

Park S. F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 74, 3: 177-188

Paš M., Raspor P. 2010. Praktikum iz osnov biotehnologij. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 str.

Pavko A. 1996. Masne bilance in načini vodenja bioprocесов. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur). Ljubljana, Bia: 425-436

Raspor P., Smole-Možina Sonja. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, Bia: 148 str.

Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. 1996. *Campylobacter*. V: Microorganisms in foods 5. Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B (eds.). London, ICMSF, Blackie Academic and Professional: 45-65

Roughton J.W., Booth H. 1938. The catalytic effect of buffers on the reaction $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$. Biochemical Journal, 32, 11: 2049-2069

Sails A. D., Wareing R.A., Bolton F. J. Fox A.J., Curry A. 1998. Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages. Journal of Medical Microbiology, 47: 123-128

Salama S.M., Bolton F.J., Hutchinson D.N. 1989. Improved method for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteriophages. Letters in Applied Microbiology, 8: 5-7

- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press: 600 str.
- Sauvageau D. 2010. Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophage. Montreal, McGill University, Department of chemical engineering: 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
- Sargeant K., Yeo R.G., Lethbridge J.H., Shooter K.V. 1968. Production of bacteriophage T7. *Applied Microbiology*, 16, 10: 1483-1488
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P. A., Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a food borne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2, 200: 1-12
- Siquet-Descans F., Calberg-Bacq C.M. 1973. Large scale production of bacteriophage φ x 174. *Biotechnology and Bioengineering*, 15: 927-932
- Skirrow M.B. 1977. *Campylobacter enteritis*: a »new« disease. *British Medical Journal*, 2, 6078: 9-11
- Smith H.W., Huggins M.B., Shaw K.M. 1987. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves in their environment. *Journal of General Microbiology*, 133: 1127-1135
- Stanley E., Branston S., Keshavarz-Moore E., Ward J. 2010. Fermentation of M13 and lambda bacteriophages. V: The Bacteriophage in Biology, Biotechnology and Medicine, Hertfordshire, 26. February 2010: poster
- Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris G.J. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3: 649-659
- Summers C.W. 2004. Bacteriophage research: early histories. V: *Bacteriophages: biology and applications*. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 5-27
- The Oxoid manual. 2006. Bridson E.Y. (ed.). 9th ed. Hampshire, Oxoid Limited: 624 str.
- van der Vlugt R.A.A., Verbeek M. 2008. Bacteriophages: therapeutics and alternative applications. Bilthoven, Commissie genetische modificatie: 75 str.
- Velayudhan J., Kelly D.J. 2002. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*, 148: 685-694

- Walker R.I., Caldwell B.M., Lee E.E., Guerry P., Trust T.J., Ruiz-Palacios G.M. 1986. Pathophysiology of *Campylobacter enteritis*. Microbiological Reviews, 50: 81-94
- Wainwright L. M., Elvers K. T., Park S. F. 2005. A truncated haemoglobin implicated in oxygen metabolism by the microaerophilic food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. Microbiology, 151: 4079-4091
- Wang I.N., D.E. Dykhuizen, Slobodkin L.B. 1996. The evolution of phage lysis timing. Evolutionary Ecology, 10: 545-558
- Wang I.N., Deaton J., Young R. 2003. Sizing the Holin Lesion with an endolysin- β -galactosidase fusion. Journal of Bacteriology, 185, 3: 779-787
- Wiggins B.A., Alexander M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. Applied and Environmental Microbiology, 49, 1: 19–23
- Wilson D.J., Gabriel E., Leatherbarrow A.L.J., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Hart C.A., Diggle P.J., Fearnhead P. 2009. Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. Molecular Biology and Evolution, 26, 2: 385–397
- Wise W.S. 1951. The measurement of the aeration of culture media. Journal of General Microbiology, 5: 167-177
- Wright A.J., Grant J.A., Hurd D., Harrison M., Guccione J. E., Kelly J. D., Maskell J. D. 2009. Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* in vitro growth reveals a stationary-phase physiological switch. Microbiology, 155: 80-94

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Alešu Podgorniku za strokovno pomoč, nasvete in neskončne debate.

Somentorju prof. dr. Petru Rasporju in recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina se zahvaljujem za konstruktivno kritiko naloge.

Zahvaljujem se sodelavcem Laboratorija za bioanalitiko, ki so me uvedli v zanimivi svet raziskovanja. Posebna zahvala gre Niki Janež za pomoč, znanje, potrpežljivost in dobro voljo.

Hvala Mateju Šerganu za tehnično pomoč pri pripravi bioreaktorjev. Hvala mag. Simoni Juvan za hiter pregled oblikovne ustreznosti naloge.

Podjetju BIA d.o.o. se zahvaljujem za opremo MonitShaker. Hvala Franciju Smrekarju (Jafral d.o.o.) za izposojo in pripravo bioreaktorja.

Hvala najbližnjim za podporo.

PRILOGE

V poglavju priloge so rezultati v obliki preglednic, ki so v magistrskem delu prikazani slikovno. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti dveh paralelk s standardnim odklonom in kot relativni standardni odklon.

Priloga 1: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med gojenjem bakterije *C. jejuni* v mikraerofilni atmosferi (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) in atmosferi z 18,86 % O₂, 10,03 % CO₂, 70,27 % N₂. Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Mikraerofilna atmosfera 5% O ₂ , 10 % CO ₂ , 85 % N ₂		Atmosfera z 19 % O ₂ , 10 % CO ₂ , 70 % N ₂	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	1,41 x 10 ⁴ ± 2,72 x 10 ³	19,29	3,33 x 10 ⁴ ± 2,82 x 10 ³	8,57
2	1,41 x 10 ⁴ ± 2,72 x 10 ³	19,29	3,33 x 10 ⁴ ± 2,82 x 10 ³	8,57
4	1,41 x 10 ⁴ ± 2,72 x 10 ³	19,29	3,33 x 10 ⁴ ± 2,82 x 10 ³	8,57
6	1,41 x 10 ⁴ ± 2,72 x 10 ³	19,29	3,33 x 10 ⁴ ± 2,82 x 10 ³	8,57
8	1,94 x 10 ⁵ ± 3,51 x 10 ⁴	19,11	1,01 x 10 ⁵ ± 2,82 x 10 ⁴	28,28
10	1,22 x 10 ⁶ ± 1,44 x 10 ⁵	11,79	9,56 x 10 ⁵ ± 1,45 x 10 ⁴	1,57
12	4,75 x 10 ⁶ ± 9,92 x 10 ⁵	21,06	7,53 x 10 ⁶ ± 1,33 x 10 ⁶	18,86
14	9,51 x 10 ⁶ ± 4,21 x 10 ⁵	4,47	2,05 x 10 ⁷ ± 8,11 x 10 ⁶	39,19
16	3,86 x 10 ⁷ ± 1,14 x 10 ⁷	28,28	3,01 x 10 ⁷ ± 5,64 x 10 ⁶	18,25
18	6,42 x 10 ⁷ ± 6,46 x 10 ⁶	9,72	6,16 x 10 ⁷ ± 3,14 x 10 ⁶	5,08
20	7,01 x 10 ⁷ ± 1,41 x 10 ⁷	20,20	6,21 x 10 ⁷ ± 5,61 x 10 ⁶	9,12

Priloga 2: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med spremljanjem dinamike rasti bakterije *C. jejuni* s sistemom s pO₂ in pH elektrodo.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Primer 1		Primer 2	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	8,41 x 10 ⁵ ± 5,66 x 10 ⁴	6,73	7,00 x 10 ⁵ ± 7,07 x 10 ⁴	10,10
24	1,02 x 10 ⁸ ± 2,47 x 10 ⁷	24,15	9,04 x 10 ⁷ ± 1,34 x 10 ⁷	15,01

Priloga 3: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu povezave dinamike rasti *C. jejuni* z zmanjšnjem deleža koncentracije raztopljenega kisika s koncentracijo celic.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	1,73 x 10 ⁵ ± 4,67 x 10 ⁴	26,98
12	4,50 x 10 ⁶ ± 7,78 x 10 ⁵	17,28
16	2,15 x 10 ⁷ ± 3,46 x 10 ⁶	16,11
20	1,02 x 10 ⁸ ± 7,07 x 10 ⁶	6,93
24	1,58 x 10 ⁸ ± 3,18 x 10 ⁷	20,14
42	6,79 x 10 ⁷ ± 6,36 x 10 ⁶	9,37

Priloga 4: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu preverjanja vpliva volumna inokulumna na delež koncentracije raztopljenega kisika in dinamiko bakterije *C. jejuni*.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	8 ml inokulum		250 µl inokulum	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	$1,50 \times 10^6 \pm 2,83 \times 10^5$	18,86	$5,21 \times 10^4 \pm 5,66 \times 10^3$	10,88
4	$4,30 \times 10^6 \pm 5,66 \times 10^5$	13,16	$1,15 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^4$	30,74
7,5	$3,25 \times 10^7 \pm 6,36 \times 10^6$	19,58	$2,90 \times 10^5 \pm 9,19 \times 10^4$	32,25
9,5	$4,08 \times 10^7 \pm 7,07 \times 10^6$	17,25	$4,35 \times 10^5 \pm 7,42 \times 10^4$	17,17
11,5	$5,45 \times 10^7 \pm 1,31 \times 10^7$	24,11	$1,76 \times 10^6 \pm 3,54 \times 10^5$	20,20
14	$8,05 \times 10^7 \pm 7,78 \times 10^6$	9,66	$1,80 \times 10^6 \pm 1,41 \times 10^5$	7,86
23,5	$1,10 \times 10^8 \pm 2,26 \times 10^7$	19,85	$1,00 \times 10^8 \pm 3,54 \times 10^7$	33,67
27	$1,30 \times 10^8 \pm 4,24 \times 10^7$	32,64	$1,40 \times 10^8 \pm 3,18 \times 10^7$	23,14
29	$1,30 \times 10^8 \pm 1,41 \times 10^7$	10,89	$1,33 \times 10^8 \pm 2,83 \times 10^7$	21,76

Priloga 5: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu optimizacije koncentracije vpihanega čistega CO₂ v inkubator.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Vpihanje čistega CO ₂	Čas 0 h		Čas 24 h	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0 % CO ₂	$1,00 \times 10^6 \pm 1,41 \times 10^5$	13,47	0	
1 % CO ₂	$9,00 \times 10^5 \pm 1,27 \times 10^5$	14,14	$3,00 \times 10^6 \pm 7,78 \times 10^5$	25,50
3 % CO ₂	$1,40 \times 10^6 \pm 1,77 \times 10^5$	12,41	$1,40 \times 10^8 \pm 2,80 \times 10^7$	20,20
5 % CO ₂	$1,20 \times 10^6 \pm 2,83 \times 10^5$	23,57	$9,00 \times 10^7 \pm 6,36 \times 10^6$	7,03
10 % CO ₂	$2,50 \times 10^6 \pm 7,08 \times 10^5$	28,28	$7,00 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^7$	17,05

Priloga 6: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri eksperimentu gojenja bakterije *C. jejuni* v primeru »izklopa CO₂« in v primeru gojenja v mikroaerofilni atmosferi-kontrola (5% O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂).

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Izklop CO ₂		Mikroaerofilna atmosfera	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	$3,90 \times 10^5 \pm 1,06 \times 10^5$	27,20	$2,37 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$	23,57
2	$4,10 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$	10,35	$2,37 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$	23,57
4	$4,00 \times 10^5 \pm 3,75 \times 10^4$	9,29	$2,37 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$	23,57
6	$5,30 \times 10^5 \pm 4,95 \times 10^4$	9,25	$2,37 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$	23,57
8	$3,37 \times 10^6 \pm 9,97 \times 10^5$	29,36	$1,28 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^5$	32,64
10	/	/	$3,23 \times 10^6 \pm 4,95 \times 10^5$	15,22
12	/	/	$4,23 \times 10^6 \pm 2,79 \times 10^5$	6,73
14	/	/	$9,48 \times 10^6 \pm 5,66 \times 10^5$	5,95
24	$5,53 \times 10^7 \pm 6,36 \times 10^6$	11,68	$3,83 \times 10^7 \pm 1,34 \times 10^7$	34,89

Priloga 7: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) pri gojenju bakterije *C. jejuni*-kontrola in pri infekciji 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Bakterija <i>C. jejuni</i> -kontrola		Infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	$6,15 \times 10^4 \pm 4,95 \times 10^3$	8,05	$7,60 \times 10^4 \pm 6,36 \times 10^3$	8,32
13	$3,40 \times 10^6 \pm 9,90 \times 10^5$	29,12	$4,80 \times 10^5 \pm 1,27 \times 10^5$	26,51
17	$1,20 \times 10^7 \pm 2,90 \times 10^6$	24,26	$3,70 \times 10^6 \pm 1,13 \times 10^6$	30,58
23	$6,00 \times 10^7 \pm 2,80 \times 10^6$	4,71	$3,20 \times 10^6 \pm 4,95 \times 10^5$	15,22
34	$3,40 \times 10^7 \pm 6,01 \times 10^6$	17,81	$4,70 \times 10^3 \pm 3,18 \times 10^2$	6,73

Priloga 8: Povprečno število plakov (PFU/ml) pri infekciji 24 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	
	Povp. št. plakov ± SD (PFU/ml)	RSD (%)
0	$3,04 \times 10^3 \pm 9,19 \times 10^2$	30,14
13	$2,10 \times 10^3 \pm 4,24 \times 10^2$	20,9
17	$6,50 \times 10^3 \pm 7,78 \times 10^2$	11,87
23	$2,10 \times 10^5 \pm 5,59 \times 10^4$	26,66
34	$1,20 \times 10^6 \pm 2,90 \times 10^5$	24,26

Priloga 9: Povprečno število celic (CFU/ml) pri infekciji 12 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi. Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Bakterija <i>C. jejuni</i> -kontrola		Infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	
	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)
0	$9,80 \times 10^4 \pm 1,70 \times 10^4$	17,32	$1,20 \times 10^5 \pm 3,36 \times 10^4$	28,89
11	$5,51 \times 10^7 \pm 5,45 \times 10^6$	12,58	$7,75 \times 10^5 \pm 1,27 \times 10^5$	16,46
15	$5,61 \times 10^7 \pm 1,12 \times 10^7$	21,09	$5,99 \times 10^3 \pm 7,35 \times 10^2$	12,29
19	$6,92 \times 10^7 \pm 2,12 \times 10^7$	31,20	$4,00 \times 10^3 \pm 6,38 \times 10^2$	15,71
24	$8,00 \times 10^7 \pm 1,41 \times 10^7$	17,68	$4,10 \times 10^3 \pm 8,49 \times 10^2$	20,69

Priloga 10: Povprečno število plakov (PFU/ml) pri infekciji 12 urne bakterije *C. jejuni* z bakteriofagi.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Infekcija bakterije <i>C. jejuni</i> z bakteriofagi	
	Povp. št. plakov ± SD (PFU/ml)	RSD (%)
0	$1,20 \times 10^3 \pm 2,93 \times 10^2$	24,61
11	$3,00 \times 10^4 \pm 7,64 \times 10^3$	25,06
15	$1,50 \times 10^6 \pm 2,90 \times 10^5$	19,39
19	$1,40 \times 10^6 \pm 5,16 \times 10^5$	36,22
24	$1,40 \times 10^6 \pm 8,49 \times 10^4$	5,89

Priloga 11: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) in povprečno število plakov (PFU/ml) med namnoževanjem bakteriofagov z gostiteljsko bakterijo *C. jejuni* v bioreaktorju.

Podane so povprečne vrednosti dveh paralelk.

Čas (h)	Povp. št. celic ± SD (CFU/ml)	RSD (%)	Povp. št. plakov ± SD (PFU/ml)	RSD (%)
0	$9,65 \times 10^4 \pm 4,95 \times 10^3$	5,13	$2,75 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^3$	11,52
2	$4,79 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$	5,91	$2,63 \times 10^4 \pm 2,51 \times 10^3$	9,54
4	$2,54 \times 10^6 \pm 4,14 \times 10^5$	16,27	$5,30 \times 10^4 \pm 5,66 \times 10^3$	10,67
6	$1,42 \times 10^7 \pm 7,07 \times 10^5$	4,98	$1,06 \times 10^6 \pm 1,34 \times 10^5$	12,73
8	$1,35 \times 10^7 \pm 4,53 \times 10^5$	33,52	$1,73 \times 10^7 \pm 3,54 \times 10^5$	2,05
10	$1,70 \times 10^4 \pm 4,24 \times 10^2$	2,5	$3,05 \times 10^7$	/
12	$3,32 \times 10^4 \pm 7,42 \times 10^3$	22,33	$2,51 \times 10^7 \pm 4,14 \times 10^6$	17,15
14	$4,28 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^4$	333	$2,69 \times 10^7 \pm 3,89 \times 10^6$	14,48