



***Streptomyces* biofilm kialakítása kapilláris membrán bioreaktorban történő felhasználásra**

Szerző: Vonyó Viktória Zoltána

Témavezető: Lajtai-Szabó Piroska, PhD hallgató

Mérnöki Kar, Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató
Intézet

A pályamunka lezárásának dátuma: 2024.11.06.

Tartalomjegyzék

1. Absztrakt	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. Streptomyces coelicolor	2
2.2. Másodlagos anyagcsere-termékek – Aktinorodin	4
2.3. Biofilm kialakulása	5
2.4. Szakaszos és folyamatos üzemű technológiák	7
2.5. Membrán Gradosztát Reaktor – MGR.....	9
2.6. Kapilláris membránok	11
3. Célkitűzés	12
4. Anyagok és módszerek.....	13
4.1. Felhasznált anyagok	13
4.2. Mikroorganizmus.....	13
4.3. Alkalmazott módszerek	14
4.3.1. Mikroorganizmus és tápközegek	14
4.3.2. Inokulálási segédanyagok	14
4.3.3. Kémcső kapilláris berendezések kialakítása	15
4.3.4. Inokulálás	17
4.4. Vizsgálati módszerek.....	17
4.4.1. Fényképek vizuális meghatározása	17
4.4.2. Főkomponens-analízis	18
5. Eredmények.....	20
5.1. Az eredményes kísérletek számát korlátozó nehézségek	20
5.2. Biofilm színváltozása	21
5.3. Kapilláris kísérletek eredményei	23
5.3.1. Főkomponensek meghatározása és elemzése	25
5.3.2. Minták elemzése a főkomponensek felhasználásával	27

6. Összefoglalás, konklúzió.....	29
7. Irodalomjegyzék.....	31

1. Absztrakt

A természetben fellelhető mikroorganizmusok számos metabolit előállítására képesek. Ezek közül a szekunder metabolitok különleges figyelmet érdemelnek. Antibakteriális, vírusellenes és egyéb, a gyógyszeripar számára hasznos tulajdonságuk miatt fontos alapanyagok. A biotechnológia ennek érdekében az ipar számára különböző módszereket, technológiákat fejleszt.

Egy ígéretes megoldást jelenthet az általában szakaszos üzemű technológiákat alkalmazó gyógyszeripar számára az úgynevezett membrán gradosztat reaktor (MGR). Ez a bioreaktoroknak egy speciális típusa, mely lehetővé teszi a másodlagos anyagcsere-termékek folyamatos üzemű termelését. A reaktor központi elemeként szolgáló membrán felületére rögzül a termelő törzs által alkotott, egybefüggő biofilm. Ennek a kialakítása, vagyis a membrán inokulálása nagy kihívást jelent.

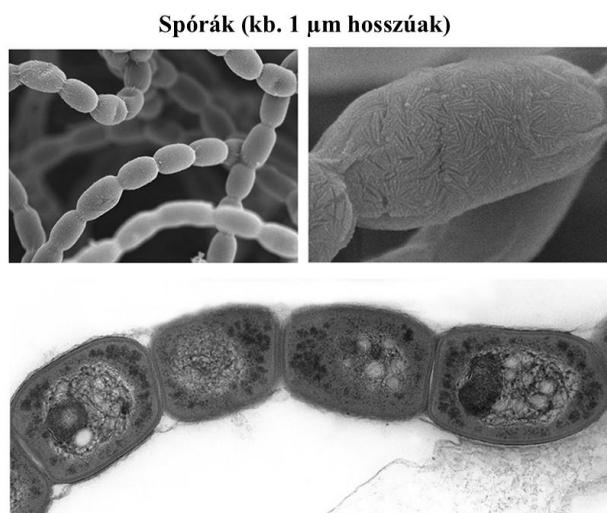
Munkám során a *Streptomyces coelicolor* baktériummal végeztem vizsgálatokat. Ez a faj egy aktinorodin nevű másodlagos anyagcsere-terméket állít elő, amely vírus-, tumorellenes és antibakteriális hatásairól ismert. Feladatom közé tartozott egy olyan kísérleti berendezés kidolgozása, amely jól reprezentálja az MGR reaktor működését, összeállítása viszonylag egyszerű, több párhuzamos mérés végezhető el vele, és jól nyomon követhető a biofilm állapota. Az összeállított berendezés egy kémcsőből és a benne elhelyezett kapilláris szálból állt, a betáplálás a kémcsőhöz rögzített fecskendőn keresztül valósult meg. Emellett a biofilm rögzítését segítő anyagokat teszteltem, melyek befolyásolták a sejteknek a membrán felületére történő megtapadását. A vizsgált paraméterek közé tartozott a kötőanyagok típusa – agar, tween 80 és cellulózgumi, vagyis CMC – és azok különböző koncentrációjának alkalmazása. A biofilmek eltérő fejlődését (biofilm vastagodása, szín változása) fotózással dokumentáltam, a fényképeket számítógépes program segítségével analizáltam.

A kísérletek azt bizonyítják, hogy a biofilm segédanyag nélkül és annak alkalmazásával is kialakul. Viszont az egyes beállítási pontok eltérést mutatnak a biofilm vastagságában és fejlődésének ütemében, valamint a membrán borítottságában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Streptomyces coelicolor*

A *Streptomyces* nemzetségbe tartozó fajok aerob, Gramm-pozitív, kemoorganotróf baktériumok. Ebből kifolyólag nincs szükségük vitaminokra, növekedési faktorra, csupán szerves szénforrásra, szervetlen nitrogénforrásra és ásványi sókra. A nemzetséghez tartozó legtöbb mikroba mezofil, vagyis 10-37°C-os hőmérséklet-tartományban nő, azonban vannak olyan tagjai, amelyek termofilak. Ez utóbbiak a 45-55°C-os hőmérséklet-tartományt kedvelik igazán. Megfelelő növekedési pH-tartományuk 6,5 és 8,0 értékek közé esik. Szárazsággal szemben ellenállóak, így kevesebb nedvességet igényelnek. Viszont nagyon érzékenyek a sok vizet tartalmazó környezetre. [1] A Streptomyceták elsődleges élőhelye a talaj, ahonnan nagy számban lehet őket izolálni. Képesek lebontani az összetett és nehezen kezelhető növényi és állati eredetű polimereket, makromolekulákat (pl.: cellulóz, kitin, keratin, keményítő stb.). [2]



2.1. ábra *Streptomyces coelicolor* spórák [3]

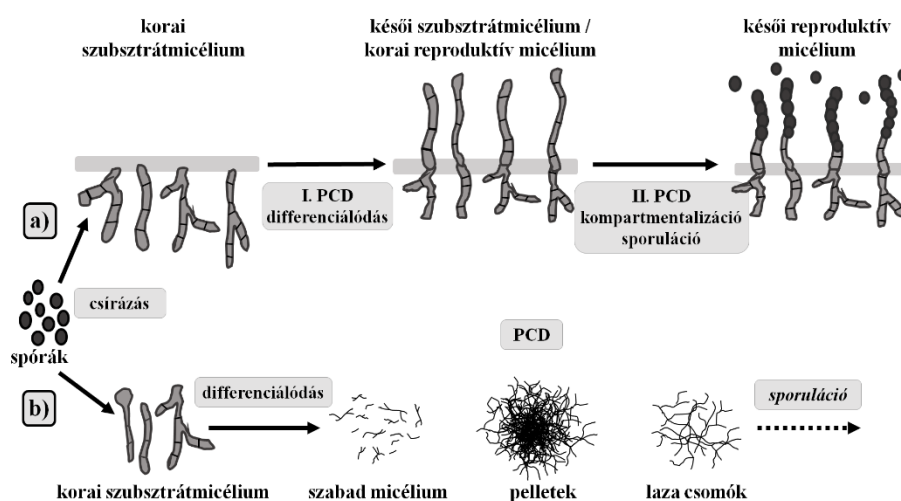
Morfológiai és mikrobiológiai hasonlóságot mutatnak a gombákkal, de rendszertani besorolásúak szerint baktériumok. [4] Fonalakat és spórákat képeznek (2.1. ábra), melyek általában 1 μm vagy annál kisebb átmérőjűek. [1] A talajban kifejezett micéliumos növekedést mutatnak. [2] Komplex életciklussal rendelkeznek, ebbe bele tartozik a programozott sejthalál (angolul programmed cell death, röviden PCD) és a sporuláció. [5] Az életciklus a spóra megtelepedésével veszi kezdetét. A tápanyagban gazdag közeg hatására a spóra kilép a nyugalmi állapotból, csíracöveket képez, ezzel elindul a csírázás folyamata. A csíracövek

csúcsnyúlással növekednek, de nem szenvednek bináris osztódást a sejtek. A csövek meghosszabbodnak, elágazások keletkeznek, ami fonalakból álló hálózatot (másnéven szubsztrátmicéliumot) fog eredményezni. Ezzel képes lesz a mikroba ráőni az agar felületére és belsejében növekedni. További növekedés hatására a micélium sejtek egy része PCD-n megy keresztül. A megmaradó életképes sejtek többmagvú micéliummá, vagyis léghifákká fognak differenciálódni, melyek később szinkron sejtosztódással monoploid kompartmenteket hoznak létre. A spórák ezekből a kompartmentekből fognak létrejönni. A spórák hidrofób láncokat alkotnak, melyeket mikroszkóppal kitűnően meg lehet figyelni. [1] [5]

A leírtak alapján a mikroba életciklusa 4 fő szakaszra bontható [1]:

- (I) Kezdeti magosztódási fázis.
- (II) Elsődleges micélium.
- (III) Másodlagos micélium és léghifák.
- (IV) Spórák kialakulása.

Streptomyces coelicolor esetén megfigyelhető, hogy a mikroba más életciklus-fejlődésen megy keresztül folyadék (szubmerz) és szilárd (felszíni) (2.2.ábra) tápközeg esetén. [4]



2.2. ábra A *Streptomyces* általános életciklusa szilárd (a) és folyékony (b) kultúrákban [4]

Ahogy a 2.2.ábrán is látható, a legszembetűnőbb eltérés a két tápközeg között, hogy folyadék kultúra esetén kimarad a második programozott sejthalál. Későbbi növekedések folyamán a folyadék kultúrában három különböző morfológiát vehet fel a mikroba:

1. Szétszórt micélium (többnyire egysejtűként viselkedik);
2. Laza micéliumhálózatok (gyakori nevük szőnyeg vagy csomók);
3. Pelletek (sűrű micéliumstruktúra tápanyaghiányos központtal).

A tápanyaghiányos közeg stresszfaktorként jelenik meg, de ilyen stressz lehet az oxigénhiány, más mikroorganizmus jelenléte is. Ennek következtében elindul a másodlagos anyagcsere-termékek képződése. [4]

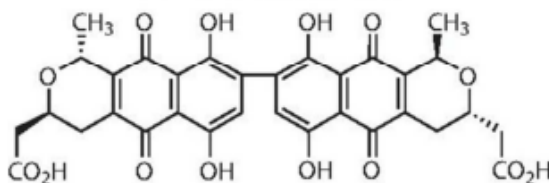
2.2. Másodlagos anyagcsere-termékek – Aktinorodin

A másodlagos metabolitok olyan szerves vegyületek, amelyek nem vesznek részt közvetlenül egy szervezet életciklusában, nincsenek hatással a fejlődésére és szaporodására. Ezek a szerves vegyületek négy dologban mutatnak eltérést az elsődleges metabolitokhoz képest [1]:

- (I) Nélkülözhetők a növekedéshez.
- (II) Termelésük környezeti körülményektől függ, mint például a talaj típusa.
- (III) Sokszor szorosan összefüggő molekulák csoportjaiként termelődnek.
- (IV) Gyakran előfordulhat ezeknek az összetevőknek a túltermelődése.

A *Streptomyces* nemzetség tagjai rendkívül fontos szerepet töltenek be a biotechnológiában, mivel a klinikai antibiotikumok közel kétharmada és számos más bioaktív vegyület is tőlük eredeztethető. [5] Legfontosabbak az antibakteriális, gombaellenes, vírusellenes és tumor ellenes tulajdonságú másodlagos metabolitjaik, mint például a *S. coelicolor* által termelt, antibiotikus hatású aktinorodin. [1]

Az aktinorodin (2.3.ábra), egy kék/vörös színű, redox-aktív másodlagos metabolit, amely bakteriosztatikus és pH-érzékeny tulajdonságairól ismert. Modellvegyületként hasznosítják, bár még nem kellően ismert biológiai aktivitása és hatásmechanizmusa. [6]



2.3. ábra Aktinorodin szerkezeti képlete [6]

Ennek a szerves molekulának három kiemelkedő kémiai tulajdonságát állapították meg. Elsőként pigmentációját kell megemlíteni, ami pH-függő: savas tartományban vörös, bázikus körülmények között kék színű. Másodszor megvizsgálták, hogy redox-aktív, és redox-ciklusos reakciókban is részt vehet. A kinoncsoportok redukciójával elektronokat hoz létre, ami kölcsönhatásba képes lépni a molekuláris oxigénnel szuperoxid-gyök anionokat ($O_2^{\cdot-}$) eredményezve. Ezekből a gyökökből később olyan reaktív anyagok keletkezhetnek, mint például a hidrogén-peroxid (H_2O_2). Végül harmadszor kimutatták, hogy organokatalizátorként működik in vitro oxidatív reakciókban. Katalizálja az L-aszkorbinsav és az L-cisztein konverzióját, miközben H_2O_2 termelődik. A H_2O_2 felhalmozódása a bakteriocid hatás egyik feltételezett mechanizmusa. [6]

Vizsgálatok során, mikor a *S. coelicolor* mikroorganizmust stresszfaktoroknak tették ki (pl.: tápanyag-limitáció vagy alacsonyabb pH-jú közegbe helyezték), megindult az aktinorodin termelődése. 4,5-5,5 pH-n intracelluláris vörös antibiotikum termelődött. Magasabb pH-tartományban (6,0 és 7,5) azonban megjelent a kék aktinorodin is, amely nem csak intracelluláris, de extracelluláris formában is termelődött. Utóbbi sokkal előnyösebb az antibiotikum kinyerése szempontjából, hiszen nem kell sejtroncsolást végezni.

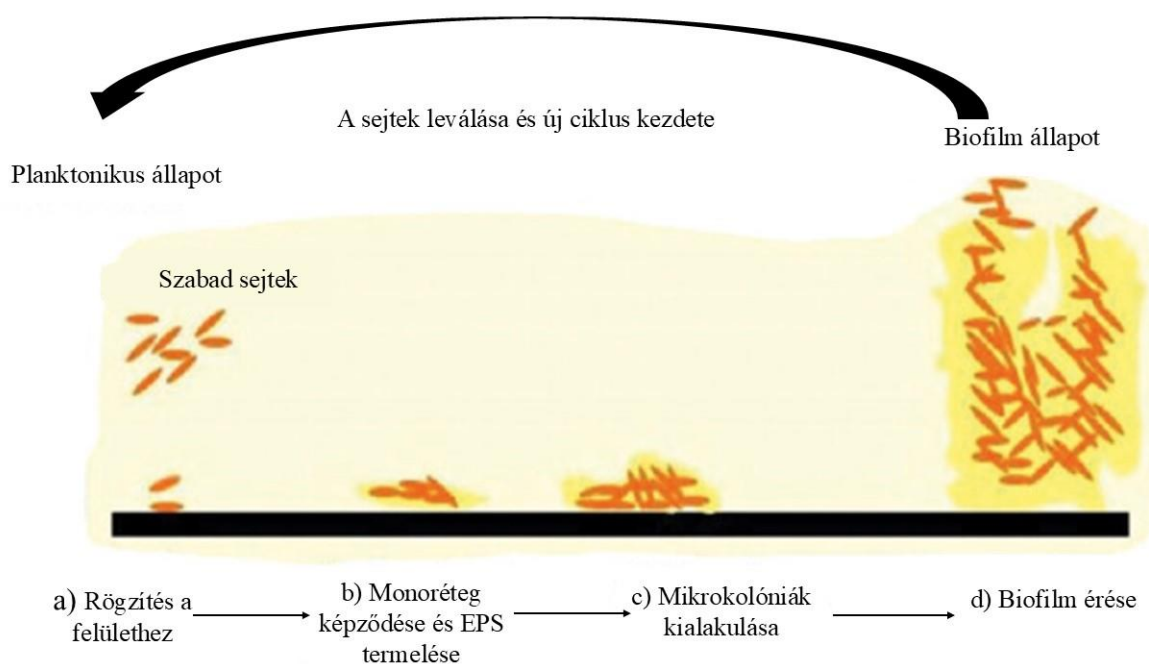
A két antibiotikum vizsgálata során kiderült, hogy a kék színű az aktinorodin laktonszármazéka, amit γ -aktinorodinnak neveztek el. Kimutatható, hogy a végső pH-érték szabja meg, hogy melyik fajta aktinorodin termelődik nagyobb mennyiségben. 5-ös pH-értéken az intracelluláris aktinorodin termelődik nagyobb mennyiségben, ezzel szemben a γ -aktinorodin elsősorban 7-es pH-értéken keletkezik, és mind intra-, mind extracellulárisan jelen van. [7]

2.3. Biofilm kialakulása

A baktériumok, különösen a *Streptomyces coelicolor* mikroorganizmus biofilm-képződése és felületekhez való megtapadásának ismerete elengedhetetlen, hiszen célom egy ilyen biofilm felnövesztése és fejlődésének figyelemmel kísérése egy membrán kapilláris szálon.

A biofilm nem más, mint mikroorganizmusok jól szervezett és együttműködő közössége. Azok a sejtek, amelyek ilyen társulásokban élnek, több előnnyel rendelkeznek az önálló telepeket alkotó társaikhoz képest, például nagyobb a túlélési esélyük különböző környezeti stressz hatások esetén (pl.: pH változás, UV-sugárzás, ozmotikus sokk stb.), illetve a komplex, nehezen felvehető tápanyagokat könnyebben hasznosítják. [8]

A biofilm kialakulásának folyamatát a **2.4. ábra** szemlélteti.



2.4. ábra Biofilm képződése [8]

Az **2.4. ábrán** jól látható, hogy elsőként a sejtek reverzibilisen megkötődnek a felülethez és rögzülnek (a). Ezt követi a monoréteg kialakulása, ami már irreverzibilisen kötődik a felülethez. Ez a kötődés indukálja az extracelluláris mátrix képződését (b). (Az ábrán látható EPS az angol extracellular polymeric substances, vagyis extracelluláris polimer anyagok rövidítése.) Később a mikrokolóniák képződése figyelhető meg (c). Következő szakaszban elindul a biofilm érése, melynek során a jelenlévő poliszacharidok következtében jellegzetes struktúrát vesz fel (d). Utolsó lépésben az egyes sejtek elkezdnek leválni a biofilmről. Jól látható, hogy a biofilm növekedési ciklusa egy összetett folyamat. [8]

A biofilm kötődési folyamatának megértéséhez meg kell vizsgálni a sejtfelszín és a szubsztrátum tulajdonságait is. A szubsztrátum lehet hidrofób vagy hidrofil tulajdonságú. A durvább, nagyobb fajlagos felületű felszíneken a biofilm sokkal gyorsabban kialakul. Mivel a *S. coelicolor* spórái erősen hidrofób sajátosságúak, a hidrofób felületen könnyebben megtapadnak, ami kedvez a biofilm kialakulásának. A sejtfelszínen lévő flagellák, pílusok, fimbriák szintén befolyással bírnak a kötődés kialakításának sebességére. [9]

A biofilmben lévő sejtek extracelluláris mátrixba (EPS) ágyazódnak. Az EPS anyagok fő alkotóelemei poliszacharidok, fehérjék és nukleinsavak. A mátrix funkciója roppant sokrétű:

védelmet és mechanikai stabilitást biztosít, de segíti a felületekhez való tapadást is. A mobilitás szabályozása és a sejtek átmeneti immobilizálása is feladatai közé tartozik. A *Streptomyces* nemzetség tagjainak különleges képessége, hogy alapvető építőelemkészlet felhasználásával morfológiailag és funkcionálisan is eltérő mátrixok megalkotására képesek. Továbbá hidrofób felületeken is képesek megtapadni, mint a növényi levelek és természetesen a talaj szemcséi. [10]

A 2.1-es fejezetben leírtak alapján *S. coelicolor* felépítéséből és életciklusából adódóan vegetatív és léghifákkal rendelkezik. Amíg a vegetatív hifák hidrofíl tulajdonságúak, addig a léghifák hidrofóbak, vagyis víztaszítóak. Ennek oka, hogy egy további külső felületi réteg (mátrix) alakul ki. Ezt pálcikarétegnek is szokták nevezni. Ennek a rétegnek a hidrofób oldalát vékony fibrillák, vagyis chaplin fehérjék borítják be. A chaplin fehérjéknek két típusa ismert: egy rövidebb kb. 55 aminosavból álló fehérje (ChpD-H) és egy hosszabb, nagyjából 230 aminosav hosszúságú fehérje (ChpA-C). Ezek a fehérjék a sejten kívül helyezkednek el, és viszonylag kemény, nem fiziológiás körülményekkel szembesülnek. Ezekben a körülményekben a fehérjék spontán módon felveszik a számukra kinetikailag elérhető legkisebb szabad energiájú alakját, konformációját. [10]

2.4. Szakaszos és folyamatos üzemű technológiák

A gyógyszeriparban mai napig a szakaszos technológiák dominálnak, melyekre jellemző, hogy egy-egy gyógyszerhatóanyag előállítása sok részlépésben történik, és az egy batch (szakasz) során kinyert termék mennyisége is kicsi. A teljes gyártás során pontosan ugyanazt a műveletsorozatot ismétlik újra és újra, amíg elegendő izolált anyagot nem állítanak elő. Szakaszos gyártás során általában egyszerre csak egy műveleti egységet végeznek el. Ezzel szemben a folyamatos üzemű technológiáknál számos reakció és elválasztó művelet zajlik egyidejűleg, ezáltal javul a berendezések kihasználtsága, nagyobb termelési kapacitás érhető el

Az elmúlt években számos előrelépés történt a folyamatos gyártási technológiák bevezetésére ezen a területen. Elsősorban technikai, minőségi, biztonsági és gazdasági előnyök miatt végeztek beruházásokat nagyobb gyógyszeripari vállalatok a folyamatos üzemű technológiák bevezetése érdekében [11].

Folyamatos üzemmód előnyei [11]:

- Könnyebb kezelhetőség: a szükséges hőmérséklet, nyomás, keverés könnyebben megvalósítható folyamatos üzemmód esetén.
- „State of Control” (helyzetellenőrzés): szakaszos üzemmódban az egyes sarzsok között előfordulhatnak kisebb-nagyobb különbségek, míg egy precízen szabályozott folyamatos gyártás során minimalizálható a termékminőség ingadozása.
- Nagyobb termelési kapacitás: a szakaszos üzemmódra jellemző leállás, újraindítás és egyéb holtidők itt nem lépnek fel, így nagyobb teljesítmény érhető el.
- Gazdaságosság: a nagyobb teljesítmény, valamint a berendezések hatékonyabb kihasználása gazdasági előnyt is jelent.
- Biztonságtechnikai előny: folyamatos üzemmódban kisebb reaktor is elegendő, ezáltal az egyszerre kezelendő veszélyes, toxikus anyagok mennyisége is kisebb, továbbá a reaktor hűtése is könnyebb, kisebb a túlmelegedés veszélye.

A folyamatos üzemű technológiák megvalósításának a gyógyszeriparban azonban vannak nehézségei, akadályai, amit át kell hidalni. Ide sorolhatóak az alábbiak [11]:

- Gyógyszeriparban termelt hatóanyagok teljes gyártási mennyisége kicsi, ezért a folyamatos üzemmód által kínált nagyobb termelési kapacitás kevésbé lényeges szempont.
- Rövid a termék szabadalmi élettartama, ennyi idő alatt nem éri meg a potenciálisan hatékonyabb folyamatos üzemmód kidolgozása.
- Fokozott fejlesztési terhek és különleges technikai kihívások lépnek fel (új berendezésekre, eljárások kidolgozására, szakmai továbbképzésekre, szemléletváltásra lenne szükség).
- Kutatási és gyártási hálózat fejlesztése szükséges.

A folyamatos üzemű antibiotikum-előállításra kínál lehetséges alternatívát a membrán gradosztat reaktor, melyet a következő fejezetben ismertetek.

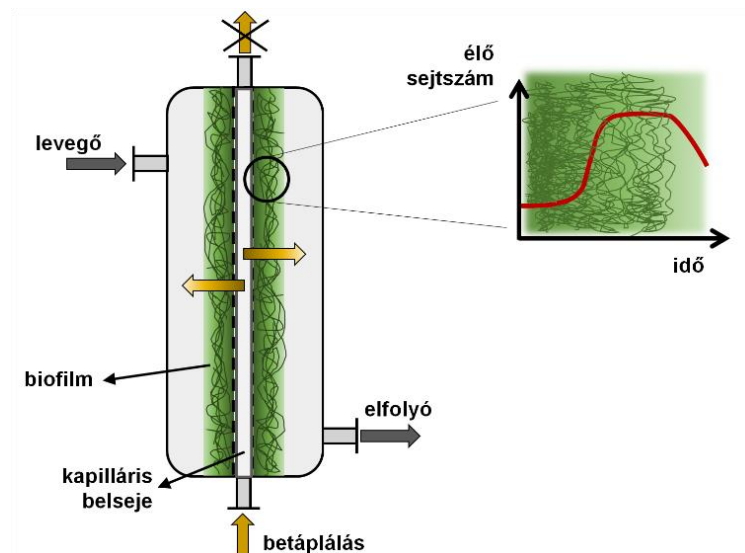
2.5. Membrán Gradosztát Reaktor – MGR

Az első gradosztát reaktort a természetben előforduló ökoszisztémák utánzására tervezték, ahol kialakul az oldott anyagok koncentrációjának gradiense. [12] Lovitt és Wimpenny olyan bioreaktor kaszkádot alkottak, ahol kétirányú térfogatcsere történt az egymást követő reaktorok között. Két komponens ellenáramban volt jelen, emiatt a reaktor elemeiben más-más koncentrációk alakultak ki a steady-state-ben. A rendszerükben vizsgált mikroorganizmusok közé tartozott a *Bacillus subtilis*, *Paracoccus denitrificans* és a *Clostridium butyricum*. [12] Azokban a reaktorokban, ahol elégséges volt a két komponens mennyisége, a mikroorganizmusok felszaporodtak, számuk Gauss-görbe szerű eloszlást mutatott az optimumban és annak környezetében. A szerzők a konklúzióban említik, hogy a rendszer tovább fejleszthető membránok alkalmazásával.

A fent említett jelenségek alapján felmerült az a lehetőség, hogy a térbeli koncentrációgradienseket alkalmazni lehetne szekunder metabolitok folyamatos előállítására, mivel ezek termelődése általában tápanyaghiány következtében alakul ki.

Leukes és munkatársai [13] 1999-ben *Phanerochaete chrysosporium* gomba felhasználásával kifejlesztettek egy membrán gradosztát reaktort (MGR), amiben egy poliszulfon membrán radiális irányú pórusaiban növesztették fel a mikroorganizmus biofilmjét. Ugyanezzel a mikrobával Sheldon és Small 2005-ben végeztek kísérleteket [14], de már kapilláris kerámia membránnal is fejlesztettek ki az MGR rendszert. Azokra a rendszerekre használják az MGR kifejezést, ahol egy szintetikus kapilláris ultraszűrő membránon, mint hordozó mátrixon rögzül a biofilm. [15]

Talajlakó mikroorganizmusok (mint amilyen a *Streptomyces coelicolor*) esetén a szilárd felületeknek technológiai jelentőségük van. A szilárd fázisú fermentációk esetén maga a szubsztrát szolgáltatja a szerkezeti stabilitást. Az MGR rendszer esetében ezt a szerkezeti stabilitást a tápanyagot nem tartalmazó, inert membrán biztosítja, melynek külső felületén történik a sejtek rögzítése. A tápoldat a membrán lumen oldali részén áramlik (2.5. ábra), majd a pórusain keresztül diffundál a külső felületére, ahol megtörténik a tápanyagfelvétel. A levegő (oxigén) a köpenytérben veszi körbe a mikroorganizmust. Ebből kifolyólag az MGR szerkezete jó megközelítés a mikroorganizmus természetes élőhelyének szimulálására. A biofilm egyes rétegei eltérő korúak, mivel eltérő mennyiségű tápanyaghoz jutnak hozzá a tápanyagfelvétel lehetőségéből adódóan.



2.5. ábra Egyszálas MGR vázlatos ábrázolása (Lajtai-Szabó Piroska és mtsai. publikációjában [4] található ábra bővítése a biofilmre jellemző mikrobanövekedési kinetikával)

A biofilm szubsztrát-ellátottsága csökken, minél távolabb helyezkedik el a membrántól (2.5. ábra). Három zóna alakul ki, amelyek eltérnek mind morfológiailag, mind pedig fiziológiailag:

1. zóna: jellemzően elegendő tápanyaghoz jut, szaporodási és növekedési ütem megfelelő;
2. zóna: növekedési stacionárius fázisban van;
3. zóna: hanyatlási fázisban van.

Mivel állandó a tápanyaggradiens, ezért egyidejűleg képes kialakulni a másodlagos metabolit termelődése és a sejtmegújulás a biofilmben. A másodlagos anyagcsere termék képződése a tápanyagszegény állapot (stressz faktor) miatt alakul ki a biofilm 3. zónájában. [4]

A szakirodalomban jelenleg kevés olyan publikáció található, amely erről a reaktortípusról szól. Még kevesebb azoknak a tudományos cikkeknek a száma, ami kifejezetten a *S. coelicolor* alkalmazását fejti ki az MGR reaktorokban.

2.6. Kapilláris membránok

A membrán definíció szerint nem más, mint egy permszelektív gát két fázis között. Elsősorban elválasztásra alkalmazzák, de bizonyos típusai – elsősorban a pórusos membránok – kialakításuknak köszönhetően szilárd hordozóként is szolgálhatnak biofilmes technológiákban, így a membrán gradosztat reaktorban is. Az MGR központi eleme egy kapilláris membránmodul, ennek a felületén alakul ki a biofilm. A membránmodul számos kapilláris membránt tartalmaz, aminek köszönhetően biztosítani képes a nagy fajlagos felületet. A membránok felépítésüket tekintve rendelkeznek egy belső ultraszűrő hártával, amit egy porózus mikroszűrő hordozóréteg vesz körbe. A biofilm kialakulását, megtapadását a nagy fajlagos felületű, ujjszerű üregek és mikrohüvelyek biztosítják. A sejtek átjutását a lumenben áramló steril tápoldatba a belső ultraszűrő hártá akadályozza meg. Az ultraszűrő membránok pórusmérete 1 nm és 500 nm közötti. Ennél a típusnál a legnagyobb a térfogategységre jutó effektív membrán felület. Hátrányuk, hogy roppant érzékenyek az eltömődésre. Ez a hátrány a dolgozatban bemutatott kísérlet, illetve az MGR szempontjából előny, hiszen pont az a célunk, hogy a telepek jól el tudják tömni a membrán pórusait és megvalósuljon a gradosztat működési elve. [4]

A megtapadás egyik kulcseleme a pórusokban és a membrán felületén való eltömődés. Az eltömődés kétféle mechanizmussal történhet meg: a sejtek a pórusok belsejében vagy a membránok felületén tapadnak meg. A megtapadt sejtek további sejteket képesek adszorbeálni, így nagyszerű alapot adhatnak a biofilm kialakításának. A membránban lévő pórusok szabálytalan alakúak és mélységük is eltérő lehet. Ennek köszönhetően a sejt képes megrekedni a pórus azon részén, ahol mérete közel azonos a pórus adott pontjában mért átmérőjével. Ezt *blinding*-nak is nevezik amikor a pórus „vakká” válik. Abban az esetben, ha az eltömődés teljes akkor *plugging*-ról van szó. [16]

Minden membrán-bioreaktor tervezésénél kulcsfontosságú tényező a reaktorban lévő membrán szerkezete. Maximális felületet és a lehető legjobb feltételeket kell biztosítani a biofilm kialakításához. Sheldon és munkatársai kutatásokat végeztek *Phanerochaete chrysosporium* spórákkal. [14] Céljuk egy olyan membrán kiválasztása volt, amely alkalmas a spóra immobilizálására, a biofilm kialakítására és extracelluláris termékek termelésére. Eredményként megállapították, hogy a sejtek immobilizálására a poliszulfon membrán mellett a kerámia membrán is kitűnően alkalmazható [17]

A 2.1. táblázatban látható az MGR rendszerekben alkalmazott kapilláris membránok jellemzői.

2.1. táblázat: MGR reaktorokban alkalmazott kapillárisok jellemzői. [15]

Paraméterek	Anyag	
	Poliszulfon	Kerámia titán-oxid
Külső átmérő (m)	0,0012	0,0029
Belső átmérő (m)	0,0009	0,0019
Falvastagság (m)	$\pm 200 \cdot 10^{-6}$	0,001
Külső átlagos pórusméret (μm)	11	3
Belső átlagos pórusméret (nm)	-	0,9
Felszakítási nyomás (kPa)	1400	8000
Üzemi pH	4 - 11	0 – 14
Maximális üzemi hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$)	50	350

3. Célkitűzés

A kutatásom célja olyan kísérleti elrendezés megalkotása volt, mely jól modellezi a membrán gradosztat reaktort, és alkalmas nagyszámú párhuzamos mérés elvégzésére. A modellrendszer felhasználásával tesztelni tudtam különböző inokulálási segédanyagokat, illetve megfigyelni azoknak a biofilm kialakulására gyakorolt hatását. Az eredmények alapján kiválasztható azon segédanyag típusa és koncentrációja, melynek alkalmazásával a lehető legnagyobb borítottság és biofilm-vastagság érhető el.

4. Anyagok és módszerek

Az alábbiakban a kísérletek során felhasznált anyagokat, rögzítési és analitikai módszereket mutatom be.

4.1. Felhasznált anyagok

A vizsgálatokhoz szükséges anyagokat a **4.2. táblázat** tartalmazza.

4.2. táblázat: Alkalmazott anyagok

Vegyszer neve	Gyártó	Minőség
Maláta	VWR	Mikrobiológiai célra
Húspepton	VWR	Mikrobiológiai célra
Szacharóz	VWR	Mikrobiológiai célra
Nátrium-klorid	Lachner	A.R.
Tween 80 (Poliszorbát)	Reanal	A.R.
CMC (karboximetil-cellulóz)	Lumea	Étkezési célra / Emberi fogyasztásra
Agar	Miero Trade	Bakteriológiai célra
Neomagnol	Gyógyszertári	-
Hidrogén-klorid	VWR	Ph. Eur.

4.2. Mikroorganizmus

A kiválasztott *Streptomyces coelicolor* A3(2) törzset a DSMZ (Németország) törzsbankból szereztük be. A törzset ferde agaros tenyészetekként tartottuk fenn. A biofilm kialakításához szükséges spóraszuszpenziókat, melyekkel az inokulálást végeztem, ezekből készítettem el.

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. Mikroorganizmus és tápközegek

A kísérletek során egy alap tápoldatot használtam. A tápoldat összetétele a következő volt: malátakivonat 10 g/L, húspepton 10 g/L, szacharóz 20 g/L. Sterilizálás során a cukrot (szacharózt) külön kellett sterilizálni, mivel magas hőmérsékleten a cukrok és a fehérjék között olyan kötések alakulnak ki, melyeket a mikroorganizmusok nem képesek lebontani. [18] A mikroorganizmus törzs fenntartásához szükséges ferde agar egy ún. SCM (*Streptomyces coelicolor* maintenance) táptalaj volt, amely a következő összetevőkből állt: glükóz 4,0 g/L, élesztőkivonat 4,0 g/L, malátakivonat 10,0 g/L, kalcium-karbonát 0,5 g/L, agar 20 g/L. A táptalaj sterilizálása ugyanolyan módon valósult meg, mint a tápoldaté.

4.3.2. Inokulálási segédanyagok

Kísérletek során a sejtadhézió elősegítése érdekében, vagyis azért, hogy a biofilm erősebben kötődjön a membrán felületéhez, segédanyagokat alkalmaztam. Ezek a segédanyagok elterjedten jelen vannak a mikrobiológiai gyakorlatban és az élelmiszeriparban. Ezek az anyagok a *Streptomyces c*-ra nem toxikusak. [19] [20]

Felhasznált segédanyagok:

- Agar: Az agar lehűlve képes megszilárdulni, ezt a tulajdonságát használtam ki. Inokulumhoz hozzáadva a spóraszuszpenzió vékony rétegben képes megtapadni a membrán szál felületén.
- Tween 80 (Poliszorbát): A spóra és a membránfelület eltérő hidrofobicitásuk miatt nehezen alkotnak kölcsönhatást egymással. Ennek kiküszöbölése érdekében alkalmaztam a tween 80-at, aminek felületaktív tulajdonsága van.
- CMC (karboximetil-cellulóz vagy cellulózgumi): Az agarhoz hasonló tulajdonságai miatt esett a választásom erre az anyagra, vagyis ez is egyfajta „ragasztóanyagként” szolgált.

A spóraszuszpenzió alapját a 9 g/L-es NaCl-oldat, vagyis fiziológiás sóoldat képezte. Ebbe került bele a megfelelő koncentrációval jelenlévő, kiválasztott segédanyag és természetesen a lemosott spórák. Összehasonlításként segédanyag nélküli, vagyis csak fiziológiás sóoldatot és a lemosott spórákat tartalmazó méréseket is végeztem. A **4.3. táblázat tartalmazza** a vizsgált komponenseket és az alkalmazott koncentrációjukat.

4.3. táblázat, Segédanyag és alkalmazott koncentrációjuk

Segédanyag neve	Koncentráció [g/L]	Jelölés	Koncentráció [g/L]	Jelölés	Koncentráció [g/L]	Jelölés
Agar	1,0	A1	3,0	A3	5,0	A5
CMC	2,0	C2	5,0	C5	8,0	C8

4.3.3. Kémcső kapilláris berendezések kialakítása

A kísérletek elvégzéséhez hidrofób kapilláris membránokat alkalmaztam. Mivel az erősen hidrofób membrán pórusain nem tudtuk átnyomni a tápoldatot a feltöltés során, ezért kevésbé hidrofób sajátságot kellett elérni. Ennek érdekében a membránokat 1-2 hétig 1M-os HCl-oldatban áztattam. A kezelt kapillárisokat 8 cm hosszú darabokra vágtam.

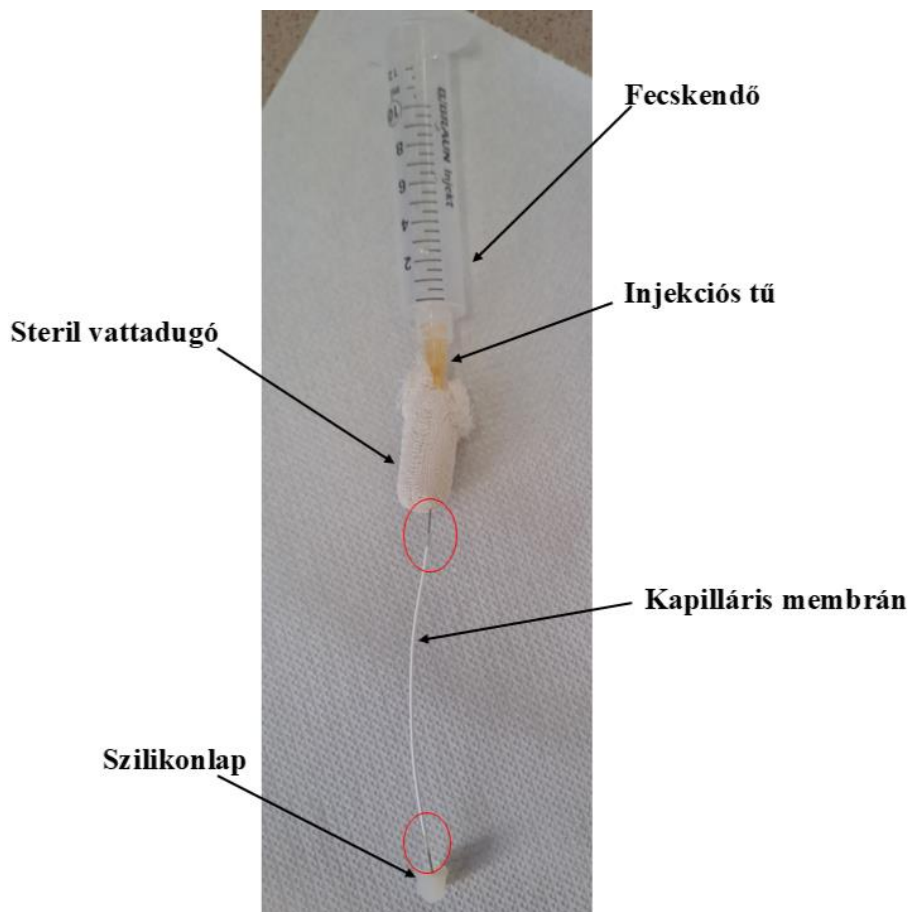
Levágott kb. 1,5 cm hosszú injekciós tűhegyeket (Medoject ®, 0,5x42 mm, 25Gx1 1/8") bevezettem a kapillárisok végébe az **6. ábrán** látható módon. Bunsen-égővel felforrósított fémcipesszel megfogtam a kiálló tű darabot, a hő hatására a kapilláris ráolvadt a tűre. A megfelelő zárás, rögzítés érdekében olvasztott viasszal bevontam a csatlakozási pontot. A tűhegygel ellátott kapillárisokat 2%-os Neomagnol-oldatban sterilizáltam. (**4.1. ábra**)



4.1. ábra Injekcióstű kapilláris illesztés, olvadt membrán és tű (bal), viaszbevonat (jobb)

Autoklávban 121°C-on, 21 percig sterilizáltam a kísérletekhez szükséges tápoldatot, eszközöket. A kémcsövek aljára kb. 1-2 mL desztillált vizet pipettáztam, hogy a kísérlet során

biztosítsam a mikrobák számára a kellően párás környezetet. A kémcsőhöz tartozó steril vattadugón átszúrtam az injekciós tűt (Medoject ®, 0,5x42 mm, 25Gx1 1/8”), amire a neomagnolban sterilizált kapillárist rögzítettem. A steril kémcsőbe belehelyeztem a vattadugóval ellátott kapillárist. A tápoldat adagolása a vattadugón átszúrt fecskendőtü segítségével valósult meg. Minden kapilláris esetén a tápoldat mennyisége 5 mL volt. **(4.2. ábra)** A fecskendőt steril vattadugóval zártam le. Ez biztosította a rendszer sterilitását, illetve elég légmozgást biztosított ahhoz, hogy a tápoldat fogyása akadálymentesen történjen.



4.2. ábra Összeállított modellrendszer

A szabadon maradt, kiálló tűhegyet a kapilláris végén steril szilikonlappal zártam le. Ezzel megakadályoztam, hogy a tápoldat teljes mennyisége távozzon a kapillárison, továbbá segített, hogy a kapilláris szál ne tapadjon a kémcső falához. Ezt követően elvégeztem a kapillárisok inokulálását.

4.3.4. Inokulálás

Egy kiválasztott ferde agaros tenyészetbe steril 20 mL fiziológias sóoldatot pipettáztam, amely tartalmazta a vizsgált segédanyagot megfelelő koncentrációban. Steril oltókaccsal óvatosan lekapartam a tenyészet felszínén jelenlévő spórákat. A tápoldattal feltöltött és lezárt végű kapillárisokat az inokulumot tartalmazó kémcsőbe mártottam néhány másodpercig, majd visszahelyeztem a steril kémcsövekbe. Az inokulált kapillárisokat 28 °C-os termosztátba helyeztem, naponta fotózással nyomon követtem és dokumentáltam a biofilm növekedését és változását.

4.4. Vizsgálati módszerek

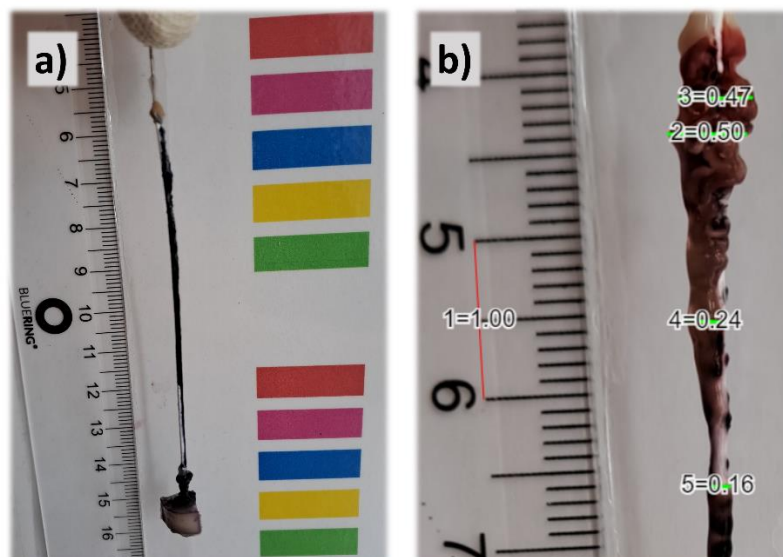
4.4.1. Fényképek vizuális meghatározása

A kísérletek során a biofilmek fejlődését fotózással dokumentáltam. Figyelemmel kísértem, hogy milyen ütemben változik az egyes beállítások esetén a biofilm vastagsága és színe. Mivel a fényképezés esetenként eltérő távolságból, illetve különböző fényviszonyok mellett történt, az ebből származó hibák minimalizálása érdekében a membránokat mindig azonos háttér előtt fényképeztem. **(4.3. ábra a) része)** Egy fehér papír jobb oldalára ismert RGB-kódú színskálát nyomtattam, majd lelamináltam, bal oldalára pedig egy vonalzót ragasztottam. A laminálás növelte a stabilitást, valamint lehetővé tette a háttér fertőtlenítését 70%-os etanol-oldattal, így a membránokat akár a kémcsőből kivéve is fotózhattam a lamináris boxban.

Az alkalmazott háttérnek köszönhetően lehetőség van a biofilm színét a színskálához viszonyítva pontosan meghatározni, kiküszöbölve a fényképezés módjából (fényviszonyok, készülék paraméterei stb.) fakadó torzításokat. Ahogy azt a 5.2. fejezetben bemutatom, az egyes beállítások közti színbeli különbség végül nem tette indokolttá a színváltozás ilyen módon történő analízisét, de segített az értékelést kevésbé szubjektívvé tenni. (A színskálás elemzéshez nyolc beállítási ponttal, minden esetben három párhuzamossal, illetve mintánként hat képpel számolva 144 kép színét kellene meghatározni RGB-kódokra bontva, ráadásul a fejlődés korai szakaszában két-három jellemző színt is meg lehet állapítani.)

A biofilm vastagságát egy online program [21] segítségével analizáltam **(4.3. ábra b) része)**. Az elemzés első lépéseként ki kell jelölni két pontot a képen, ezek távolságát veszi egységnyinek a program (piros vonal a képen), majd a megméréndő szakasz végpontjait kijelölve megkapjuk annak hosszát az egységhez viszonyítva. A háttérben elhelyezett vonalzó

ismert hosszúságú szakaszát egységként használva könnyen meghatározható a biofilm vastagsága.



4.3. ábra Vonalzó és színskála alkalmazása a képek analízise során

4.4.2. Főkomponens-analízis

A kísérlethez kialakított mérési modellből származó változók száma (mint például a biofilm borítottsága, vízszintes- és függőleges vastagsága) túl sok, ami megnehezíti az inokulálási segédanyagok hatásának vizsgálatát, a párhuzamos minták szórásától való elkülönítését, valamint a változók közti esetleges korreláció megállapítását. Ennek kiküszöbölésére alkalmazható a főkomponens analízis (Principal Component Analysis, PCA), melynek célja a dimenziószám csökkentése. Az eljárás során több független változót alakítunk át lineáris transzformációval az eredetnél kisebb számú, új független változóvá, ezek az úgynevezett főkomponensek. Tehát a főkomponensek valódi változókból matematikai műveletekkel képzett, mesterséges változók, amik a gyakorlatban nem értelmezhetők. Ezek képesek jellemezni a teljes rendszert. Fontos, hogy a változók számának csökkenése úgy valósuljon meg, hogy lényegi információ ne vesszen el. Ennek érdekében a lineáris transzformáció során a program olyan súlyokat választ az eredeti megfigyelt változókhoz, hogy a főkomponens a lehető legtöbb információt (varianciát) megőrizze. Az első főkomponens az az irány az n dimenziós térben – ahol n a vizsgált paraméterek száma –, amely irányban a legnagyobb az

adatok varianciája. Erre merőleges a második főkomponens, amerre az adatok varianciája a második legnagyobb, és így tovább. [22]

A főkomponensekkel a megfigyelt rendszerek csoportokba sorolhatók egyszerre több tulajdonság (változó) együttes figyelembevételével. Grafikus ábrázolás esetén a kiválasztott főkomponensek (2 vagy 3) lesznek a koordinátarendszer tengelyei. Általában két főkomponens már elegendő és pontos információt ad a rendszer jellemzésére.

A kapilláris membrán kísérleteknél négy mért paraméter állt rendelkezésemre: a biofilm átlagos ($l_{\text{átlagos}}$) és maximális vastagsága (l_{max}), illetve a függőleges és vízszintes borítottsága. A beállítási pontok összehasonlítása a mért paraméterek száma alapján nehéz lenne, de a fent leírt analízis két főkomponensre sűríti az adatokat. Ennek köszönhetően egy 2D koordináta-rendszerben ábrázolhatóak és értelmezhetőek az eredmények.

A mért adatokat az analízis előtt normalizálni kell, hogy azonos értéktartományba kerüljenek, ezáltal a változók összehasonlíthatóak legyenek. A biofilmmel bevont kapilláris membránok esetén az adatok normalizálása a következőképpen történt. A kigyűjtött l_{max} és $l_{\text{átlagos}}$ vastagságadatok közül meghatároztam a legnagyobb értéket mind a két esetben. Ezzel a legnagyobb értékkel osztottam le a többi adatot, így 0 és 1 közötti értékeket kaptam. A biofilm borítottsága esetén 100%-os borítottnak tekintettem a teljesen bevont membrán kapillárist. Tehát ha a membrán felén volt jelen a biofilm akkor ott 50%-os borítottságról lehet beszélni. Ez az érték azonban igaz a teljes hosszában, de csak egyik oldalán borított kapillárisra, illetve a membránszálon körbeérő, de elszórtan elhelyezkedő telepekre is. Azért, hogy pontosabban jellemezzem a telepek elhelyezkedését, ezt a tulajdonságot két külön változóra, függőleges és vízszintes borítottságra osztottam. A normalizálás során a százalékos értékeket szintén 0 és 1 közötti tartományba számoltam át. Ennek köszönhetően mind a borítottság, mind pedig a biofilm vastagságai összehasonlíthatóak egymással. A normalizált értékekből a szoftver kiszámolta a főkomponenseket.

5. Eredmények

5.1. Az eredményes kísérletek számát korlátozó nehézségek

A 4.3.3.-as fejezetben leírt kémcső kapilláris berendezések kialakítása egy soklépcsős folyamat. Az eredeti koncepció szerint minden inokulálási segédanyag, azon belül minden koncentráció esetén három párhuzamos rendszert terveztem vizsgálni, hogy az analízis során jól elkülöníthető legyen az egyes segédanyagok hatása a párhuzamosok közti szórástól. A gyakorlati megvalósítás során azonban számos olyan probléma merült fel, ami miatt az adott kapillárist nem lehetett értékelni. A dolgozatban bemutatott eredményekhez a teljes kísérletsorozat megismétlése és a két sorozat együttes áttekintése után választottam ki az értékelhető és összehasonlítható rendszereket. Az ismételésekkel együtt is, három párhuzamos helyett sok esetben csak kettő vagy egy kapillárist tudok bemutatni. Az alábbiakban röviden ismertetem a felmerülő főbb nehézségeket, melyek az eredményes kísérletek számát korlátozták.

Sok kémcső esetén a kapilláris membrán és injekciós tű illesztése elengedett, és a membrán leesett a tűről. Abban az esetben, ha ez még az összerakás alatt történt, akkor könnyen tudtam cserélni egy előre bekészített és sterilizált, tartalék kapilláris membránnal. Viszont a kísérletek közben már a biofilmmel együtt esett le a membrán, ilyenkor ezt a cserét nem tudtam megoldani. Feltételezhető, hogy a kialakult biofilm súlyát már nem bírta az illesztés, különösen a fotózás során a kémcsőből történő kivétel és visszahelyezés során történtek ilyen jellegű balesetek. Ide sorolható még a szilikon lap „leesése” a tűhegyről, illetve a szilikonlapot tartó tű kicsúszása a membránszálból, ami miatt a tápoldat teljes mennyisége rövid idő alatt átfolyt a teljes kapilláris mentén.

További probléma volt, hogy ha a kapilláris túl közel volt a kémcső falához, és a kísérlet már előrehaladott állapotban volt, a kialakult biofilm nedves felülete és az üveg kémcső fala összetapadtak. A kémcső falára feltapadt kapilláris pedig olyan felületet jelentett mikroorganizmus számára, ahova szívesebben ránőtt, vagyis a kémcső fala mentén kezdett terjedni, nem körben a membránszálon. **(5.1.ábra)** Emiatt nem lehetett jól megállapítani a biofilm borítottságát, és a fotók elkészítése is nehéz volt.

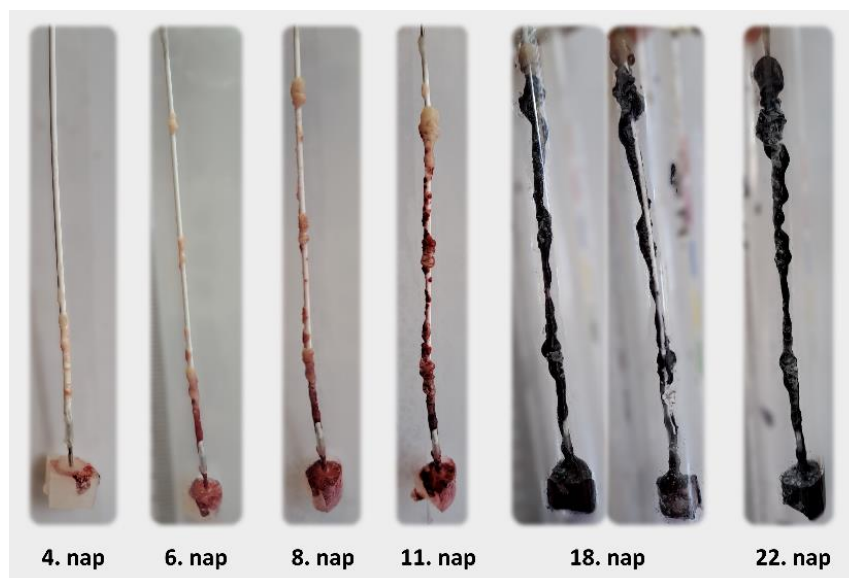


5.1. ábra *Biofilm jelenléte a kapillárison és a kémcsőfalán*

Egyéb probléma volt a kapillárisok dugulása, eltömődése. Ebben az esetben a tápoldat nem tudott megfelelően eljutni a kapilláris teljes hosszán, a mikroorganizmusok nem jutottak tápanyaghoz, és nem tudtak fejlődni, nem alakult ki a biofilm.

5.2. Biofilm színváltozása

A biofilm változása, növekedése és a másodlagos anyagcsere-termékek termelődése vizuálisan jól nyomon követhető. Az aktinorodin, ahogy a 2.2.-es fejezetben is olvasható, egy kékes / vöröses színű szerves vegyület. Ez az erőteljes szín lehetővé teszi, hogy jelenlétét akár szabad szemmel is érzékelni lehessen. Az **5.2. ábrán** a C8-as beállításának színváltozását mutatja be.



5.2. ábra Biofilm színváltozása

Beállításoktól, vagyis az alkalmazott segédanyagok tulajdonságaitól függetlenül a színek megjelenési sorrendje minden esetben megegyezett. Az inokulálástól számított első négy napban szemmel látható változás nem volt tapasztalható. Ebben az időszakban a mikroorganizmus megtapad a membrán felszínén, tápanyagfelvétel mellett növekedésnek indul.

A 4. napon a kapilláris membrán azon részein, ahol sikerült megtapadnia a mikroorganizmusnak, megjelennek a sárgás-rózsaszínes telepek. A halvány vörös vagy halvány rózsaszín szín jelzi a pigmentek megjelenését.

A 6. és 8. nap között a biofilm elkezd lassan bevonni a kapilláris felületét. Megfigyelhető a vörös szín sötétedése, ebből következik, hogy a biofilmnek vannak olyan részei, ahol tápanyag hiány lép fel, így a másodlagos anyagcsere terméket termelése intenzívebbé vált.

A kísérlet elindítása után hozzávetőlegesen 10-12. nap elteltével egyszerre jelenik meg a halványsárga színű növekedő (kapilláris felső szakasza) és a már erősen sötét vörös aktinorodint termelő biofilm (kapilláris alsó szakasza). A képen látható példában nem egy sima, egyenletes, a mikroorganizmus által kialakított „bevonat” képződik, hanem egy rücskösebb egyenetlen réteg alakul ki. A kapilláris membránnak van olyan része, ahol nincs jelen a biofilm.

A 15-18. naptól drasztikus színváltozás figyelhető meg. A halványsárga, illetve a vörös színű területek teljesen eltűntek, a jelenlévő biofilm teljes egésze sötét kékre váltott. Ebből

következtethető, hogy a biofilm teljes egésze – legalábbis a külső, látható rétege – aktinorodint termel. Megfigyelhető, hogy a kapilláris borítottsága nem teljes, ez azonban nem általános jelenség, más mintáknál ebben az időszakban már a membrán teljesen hosszában jelen volt a biofilm (A borítottságot következő alfejezetben mutatom be részletesebben.) Az **5.2. ábrán** szépen kivehető a kapilláris szabadon maradt része. A *2.1.-es fejezetben* leírtak alapján elmondható, hogy a *S. coelicolor* sporulációra képes, ezt erősíti meg, a 22. napra (**5.2. ábra**) kialakuló vékony, szürkés színű „porréteg”, ami a mikroba spóra rétege.

Minden egyes beállításnál és végrehajtott kísérletnél a színek meghatározott sorrendben követték egymást, bár a fent részletezett időtartamokban megfigyelhető néhány nap szórás. Elsőként a halványsárga, áttetsző, aktinorodint nem termelő telepek jelentek meg. Ezt követte a halvány vörös, rózsaszín területek megjelenése. Itt már elkezdődött a másodlagos anyagszertermékek termelése. Ezután a vörös szín sötétedése és a teljes biofilm sötétkék színűvé való átalakulása figyelhető meg. Végül a sejtdifferenciálódás következtében a mikroorganizmus sporulációja is megkezdődött, ami szürke színű „poros” területekként látható.

5.3. Kapilláris kísérletek eredményei

A kísérletek végén minden egyes beállítási pontnál kiválasztottam azokat a mintákat, amiket párhuzamosaknak vehettem. Ez magában foglalta, hogy egy beállításnál a 3 elindított mintán megjelentek a telepek, hasonló ütemben fejlődött a biofilm, a színek megjelenési sorrendje, vagyis az aktinorodin termelés is közel azonos volt. Ezeknek a párhuzamosoknak a végállapotbeli vagyis 18, 20, és 21. napos fényképeit vettem figyelembe. A kísérletek egy része ennél tovább zajlott, de a pontos összehasonlíthatóság érdekében hasonló időtartamokat vettem alapul. A *4.4.1.-es fejezetben* leírtak alapján meghatároztam a membrán és a biofilm együttes vastagságát, ami egy membrán kapilláris esetén 5 db mérési pont volt. Illetve minden membrán esetén egy maximális vastagságot is mértem (ez a legtöbb esetben a kapilláris legfelső szakaszán található csomók voltak, amit a **5.3. ábra** is mutat). Az l_{max} értékek kivételével, mivel azok túlságosan kiugró értékek voltak, a többi adatot átlagoltam így megkaptam az $l_{átlag}$ mérési adatokat.



5.3. ábra Kapilláris membrán tetején kialakult biofilm csomó

Ezt követte a biofilm borítottságának jellemzése. A fényképek alapján két komponensre bontottam a borítottságot: függőleges (bf) és vízszintes (bv). Ezeknek a meghatározása nem számítógépes programmal történt, így a szubjektivitásból származó hiba, mérési pontatlanság kerülhetett az eredményekbe. Azonban egy ember végezte a fényképek kiértékelését, vagyis azonos módon történt az adatfelvétel, és a kísérlet szempontjából a beállítások egymást közötti különbségek voltak fontosak, így ezek a mérési pontatlanságok nem befolyásolják számottevően a bemutatott eredményeket. A borítottságot %-os formában határoztam meg.

A statisztikai elemzés során tehát négy változó állt rendelkezésemre: $I_{\max}$, $I_{\text{átlag}}$, bf és bv. Az adatok normalizálása után számítógépes szoftver segítségével elvégeztem a főkomponens analízist.

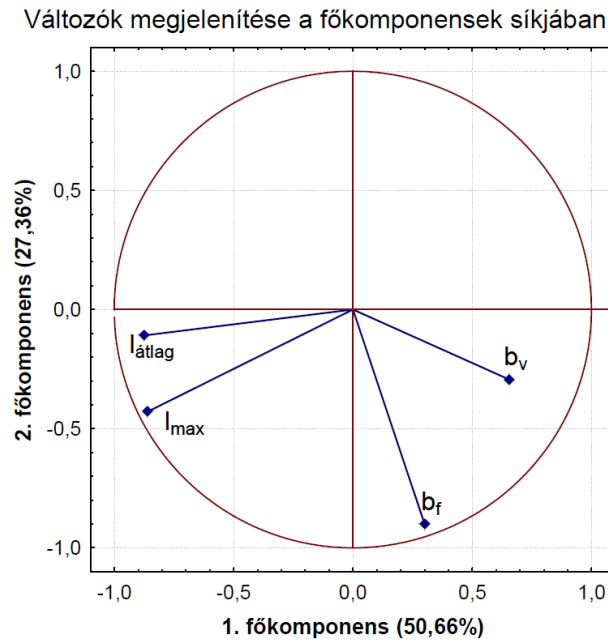
5.1. táblázat: Mérési adatok

Minta	%		mm	
	bf	bv	$I_{\text{átlag}}$	$I_{\max}$
S _ a	100	70	1,3	2,5
S _ b	100	55	2,9	5,6
S _ c	100	60	1,5	4,3
T	100	85	1,7	4,5
A1 _ a	80	60	1,2	2,1

	%		mm	
Minta	bf	bv	l_{át}lag	l_{max}
A1 _ b	65	40	1,7	3,5
A3 _ a	100	80	2,2	5,3
A3 _ b	100	60	2,8	5,4
A3 _ c	100	60	2,1	5,7
A5 _ a	95	100	1,1	1,2
A5 _ b	100	60	2,1	3,8
C2	50	75	2,4	4,0
C5 _ a	80	40	2,0	4,4
C5 _ b	80	70	2,4	4,9
C8 _ a	40	50	3,4	5,3
C8 _ b	100	60	3,5	5,6
C8 _ c	100	50	1,8	5,6

5.3.1. Főkomponensek meghatározása és elemzése

A program segítségével elkészítettem az alábbi statisztikai ábrát, mely a változókat az első két főkomponens síkjába vetítve mutatja be (5.4. ábra):



5.4. ábra Változók megjelenítése a főkomponens síkjára

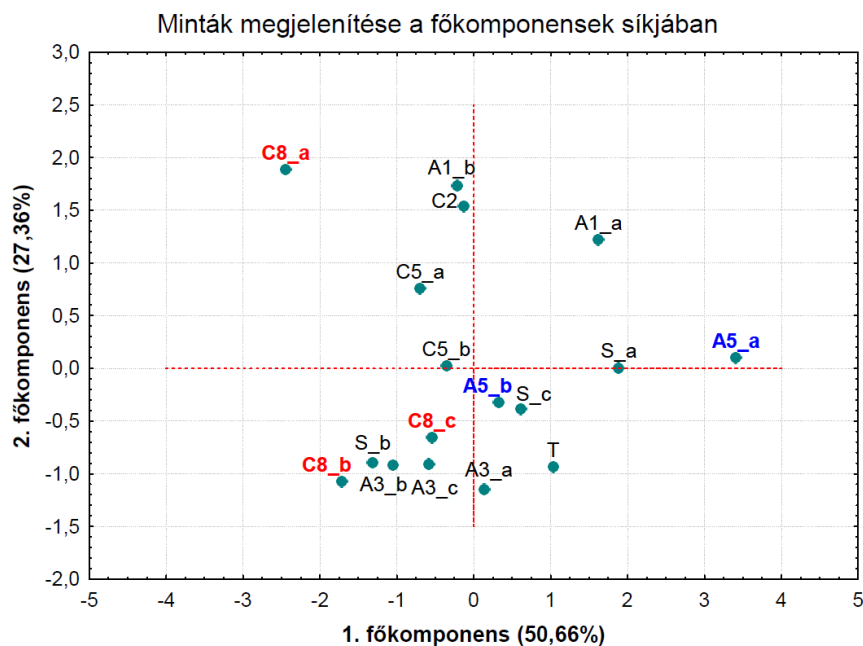
A 5.4. ábrán jól látható, hogy az x tengelyen az 1. főkomponens 50,66%-os variáciával jelenik meg, míg az y tengelyen a 2. főkomponens 27,36%-os értékkel van jelen. A két érték együtt 78,02%, ami már elegendő mértékben írja le a teljes rendszer variáciáját, nem szükséges további főkomponens alkalmazása. A biofilm-vastagságok, vagyis az l_{max} , és $l_{\text{átlag}}$, értékek közel helyezkednek el korrelációs körhöz (az ábrán piros körvonal jelzi). Ez annyit tesz, hogy ezeket a változókat nagyon jól meghatározza az analízis. Ugyan az $l_{\text{átlag}}$, kicsit távolabb helyezkedik el, mint a l_{max} , de ez is megfelelő. A borítottságokat megfigyelve a b_f is jól jellemezhető, viszont a b_v variációját már nem képes ilyen pontossággal jellemezni az első két főkomponens.

Látható, hogy az 1. főkomponenst legjobban a vastagságok határozzák meg, mivel ezek helyezkednek el a legközelebb az x tengelyhez. Ezzel szemben a 2. főkomponens elsősorban a függőleges borítottság információját tartalmazza.

A négy változó egymáshoz való viszonyát is jól meg lehet határozni a fenti ábra alapján. A legszorosabb kapcsolat (pozitív korreláció) a biofilm vastagságok között figyelhető meg, mivel vektoraik közel esnek egymáshoz. Ugyanakkor a borítottságok közötti kapcsolat nem olyan szoros, mint a vastagságok esetén. Kiderült, hogy a vastagság és a borítottság között nincs korreláció (egymáshoz képest közel merőlegesen helyezkednek el).

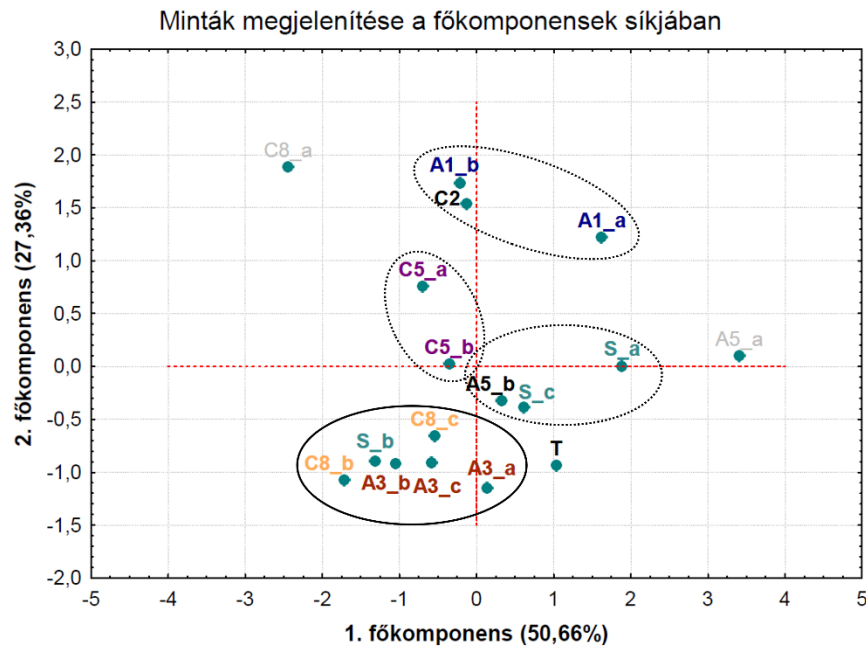
5.3.2. Minták elemzése a főkomponensek felhasználásával

A következő 5.5. ábrán a mintákat ábrázoltam a főkomponensek síkjában:



5.5. ábra Minták ábrázolása a főkomponensek síkjában

Megfigyelhető, hogy az 5.5. ábrán a 8 g/L-es CMC segédanyagot tartalmazó párhuzamos minták (C8_a, b, és c pontok) helyzete egymáshoz képest nagyon eltérő. Amíg a C8_b és C8_c minták egymáshoz és a 2. főkomponenshez közel helyezkednek el, addig a C8_a minta nagy eltérést mutat. Emiatt kiugró adatként vettem figyelembe. Hasonló eltérés figyelhető meg az A5 minták esetében is. Itt az A5_a mutat nagyobb eltérést az 1. főkomponenssel szemben, mint az A5_b. Ezt azzal lehet magyarázni, hogy a kísérlet során az A5_a kapilláris membrán levált az injekciós tűről, emiatt megszakadt a tápoldat adagolása, nem fejlődött tovább a biofilm, és már nem lehetett párhuzamot vonni a másik mintával. Ezeket a kiugró értékeket a 5.5. ábra szemlélteti.



5.6. ábra A minták klaszterekbe sorolása.

Szürke színnel jelöltem a kiugró adatokat (C8_a és A5_a), amiket a továbbiakban nem vettem figyelembe. Annak érdekében, hogy jól láthatóak legyenek a párhuzamosminták, egyforma színezéssel jelöltem őket. Elmondható, hogy az egymáshoz közel eső minták egy csoportba tartoznak (ezeket bekarikázással jelöltem), hasonló végeredmény jellemzi őket. Például az A3-as minták párhuzamosak, illetve nem sok eltérést mutat hozzájuk képest az S_b és C8_b, illetve C8_c beállítás sem. A szubjektivitás itt is megjelenik, hiszen van olyan beállítás, amit akár másik csoportba is lehet sorolni, vagyis van átfedés. Ezeket szaggatott körvonallal jelöltem.

A cél megtalálni azt a beállítást, amelynél a teljes borítottság és nagy átlagos vastagság jelenik meg. Az **5.6. ábra** szerint tehát az A3-as beállítás a legmegfelelőbb, mivel ezeknek az elhelyezkedése a **5.4. ábrán** látható, a változókat ábrázoló vektorok közötti tartományba esnek bele. Ide sorolható még a C8 minták, illetve az S_b minta is, viszont ezeknél az eseteknél figyelembe kell venni, hogy C8_a, illetve S_a és S_c a tartományon kívül helyezkednek el, vagyis nem sikerült három párhuzamossal megerősíteni az eredményt.

6. Összefoglalás, konklúzió

Dolgozatomban bemutatott MGR reaktor kapilláris membránmoduljához egy olyan modellrendszer megalkotása volt a feladatom, amin megalapozható a *S. coelicolor* mikroba által kialakított biofilm immobilizálása. A modellnek elsősorban reprezentálnia kellett az MGR reaktorban lévő membránmodult, könnyen összeállíthatónak, illetve több párhuzamos mérés elvégzésére alkalmasnak kellett lennie. Egy kémcső kapilláris modul felépítése a következőkből állt: egyszál kapilláris membránból, ami egy injekciós tűhöz csatlakozott. A membrán végét lezártam és az injekciós tűhöz csatlakoztatott fecskendőn keresztül történt a tápanyag adagolása. Az inokuláláshoz felhasznált *S. coelicolor* spóra szuszpenzióhoz különböző sejtadhéziót elősegítő segédanyagokat adtam. Ilyen segédanyagok voltak a Tween-80 (poliszorbát), agar és CMC (karboximetil-cellulóz).

A kísérletekből megállapítható volt, hogy segédanyagok jelenléte nélkül is ki tudott alakulni a biofilm, csupán annak tulajdonságaiban voltak eltérések. Főkomponens-analízis segítségével a mért négy változóból (vízszintes és függőleges borítottság, átlagos és maximális biofilm vastagság) megállapítható volt a két főkomponens, amellyel a modell rendszereket a legjobban lehet jellemezni.

Céлом az volt, hogy a kapillárisok felületén teljes borítottság jöjjön létre nagy átlagos biofilm vastagsággal. Megfigyelve a különböző segédanyagokat és azok eltérő koncentrációban történő alkalmazását a következők állapíthatóak meg. A főkomponens-analízis alapján azok a minták voltak a legjobbak a biofilm borítottságát és vastagságát együttesen figyelembe véve, ahol a biofilm kialakításában 3 g/L-es koncentrációjú agart alkalmaztam, illetve itt mindhárom párhuzamos minta közel azonos eredményt hozott. Hasonló tulajdonságú biofilm érhető el a 8 g/L-es koncentrációjú CMC felhasználásával és ahol nem használtam semmilyen segédanyagot. Ezekben az esetekben azonban nem sikerült három párhuzamos méréssel alátámasztani az eredményt. Az aktinorodin vagyis a másodlagos anyagcseretermék minden esetben megjelent a kísérlet folyamán. Különbségeket csupán a termelődés ütemében (néhány nap csúszással) lehetett tapasztalni.

A különböző kapillárisokon létrejövő biofilmek többségén látható volt egy nagyobb csomó, bunkó kialakulása a membrán felső szakaszában, ezzel szemben a membrán alsó szakaszán a vékonyabb vastagság volt tapasztalható. Feltételezhető, hogy biofilm azon része, amely közelebb helyezkedett el a tápoldat belépési pontjához, több tápanyaghoz jutott. Emiatt növekedésük és fejlődésük üteme gyorsabb volt, mint a tápanyagban szegényebb régió sejtjei.

A jövőben tervezek ezen tapasztalat alapján további kísérleteket végezni. Olyan rendszert szeretnék kidolgozni, melyben a tápoldat adagolását a lumenben keringetéssel valósítom meg, így ugyanolyan tápanyag-mennyiséghez jut a biofilm teljes hosszában. Ha egy ilyen rendszerben a hossz mentén egyenletes vastagságú biofilmet kapnék, azzal igazolhatóvá válna a fent említett jelenségre adott magyarázat.

7. Irodalomjegyzék

- [1]. Hasani, A., Kariminik, A., & Issazadeh, K. (2014). Streptomyces: characteristics and their antimicrobial activities.
- [2]. David H. Bergey, Francis C. Harrison, Robert S. Breed, Bernard W., Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, *JOHN WILEY & SONS, INC*, **2012**, DOI: doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00191
- [3]. Paul A. Hoskisson, Gilles P. van Wezel, in Trends in Microbiology, **2019**, <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/streptomyces-coelicolor>
- [4]. Lajtai-Szabó P, Hülber-Beyer É, The role of physical support in secondary metabolite production by Streptomyces species, *Biochemical Engineering Journal*, **2022**, 185, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108495>
- [5]. Rioseras B, **López-García MT**, Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production, *Bioresource technology*, **2014**, 151, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.068>
- [6]. Mak S, Nodwell JR. Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Mol Microbiol*. 2017, Nov;106(4):597-613. doi: 10.1111/mmi.13837. Epub 2017 Oct 11. PMID: 28906045.
- [7]. Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Journal of bacteriology*, **1996**, 178(8), <https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2238-2244.1996>
- [8]. El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., & Latrache, H. (2021). Current understanding on adhesion and biofilm development in actinobacteria. *International Journal of Microbiology*, 2021(1), 6637438. DOI: [10.1155/2021/6637438](https://doi.org/10.1155/2021/6637438)
- [9]. Banerjee, P., Singh, M., & Sharma, V. (2015). Biofilm formation: a comprehensive review. *Int J Pharm Res Health Sci*, 3(2), 556-560.
- [10]. Petrus, M. L., & Claessen, D. (2014). Pivotal roles for Streptomyces cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 127-139. DOI: [10.1007/s10482-014-0157-9](https://doi.org/10.1007/s10482-014-0157-9)

- [11]. Cole, K. P., & Johnson, M. D. (2018). Continuous flow technology vs. the batch-by-batch approach to produce pharmaceutical compounds. *Expert review of clinical pharmacology*, 11(1), 5-13. DOI:[10.1080/17512433.2018.1413936](https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1413936)
- [12]. **Lovitt R**, Wimpenny J, The gradostat: A bidirectional compound chemostat and its application in microbiological research, *Journal of General Microbiology*, **1981**, 127(2) <https://doi.org/10.1099/00221287-127-2-261>
- [13]. Leukes WD, Jacobs EP, Rose PD, Sanderson RD, Burton SG (1999). Method of producing secondary metabolites, US patent 5,945,002.
- [14]. Sheldon MS, Small HJ (2005). Immobilisation and biofilm development of *Phanerochaete chrysosporium* on polysulphone and ceramic membranes. *J. Memb. Sci.* 263: 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.04.014>
- [15]. Ntwampe S, **Sheldon M**, Volschenk H, The membrane gradostat reactor: Secondary metabolite production, bioremediation and commercial potential, *African Journal of Biotechnology*, **2007**, 6(10)
- [16]. Bélafile Bakó K, Nemesthóty N, Membrános műveletek, *Egyetemi jegyzet*, **2020**, EFOP 3.4.3.-16-2016-00009
- [17]. Kargar, S., Mohseny Takloo, S., Jalili, H., NoorMohammedi, J., Babaei, A., & Bizukoje, M. (2023). Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in membrane gradostat bioreactor with two-stage feeding strategy. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 53(3), 247-254., DOI: 10.1080/10826068.2022.2076242
- [18]. P. F. Stanbury, A. Whitaker, S. J. Hall, Principles of Fermentation Technology, Second Editions, *Butterworth Heinemann*, **1995**, ISBN 0 7506 4501 6
- [19]. Allan, E. J., & Prosser, J. I. (1985). A kinetic study of the colony growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and J802 on solid medium. *Microbiology*, 131(10), 2521-2532. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-10-2521>
- [20] Ventorino, V., Ionata, E., Birolo, L., Montella, S., Marcolongo, L., De Chiaro, A., ... & Pepe, O. (2016). Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2061 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02061>
- [21]. <https://eleif.net/photomeasure>, (2024.10.25.)

[22]. Vargha András, Többváltozós statisztika dióhéjban: Változó-orientált módszerek, *PÓLYA KIADÓ*, **2019**, ISBN: 9786158122818