

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
FIZIKA INTÉZET

OTDK DOLGOZAT

**Baktériumsejtek csapdázása és manipulációja
optikai csipesszel és mikrofluidikai eszközökkel**

Készítette:

Kiss Rebeka Anna
Fizikus BSc szakos hallgató

Témavezetők:

Dr. Nagy Krisztina
tudományos munkatárs
ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Dr. Vizsnyiczai Gaszton
tudományos munkatárs
ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Szeged, 2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1 Élet a mikroszkopikus mérettartományokban	4
2.1.1 Baktériumok felépítése és mozgása.....	4
2.1.2 Bakteriális heterogenitás formái és jelentősége.....	5
2.2 Lézerek a biológiai kutatásokban: A lézercsipesz	6
2.2.1 Az optikai csapdázás alapjai.....	6
2.2.2 Lézercsipesz biológiai alkalmazásai.....	7
2.2.3 Csapdaerő meghatározása	8
2.3 Mikrofluidika	9
2.3.1 Egyedi sejtek vizsgálata mikrofluidikai módszerekkel	10
3. Célkitűzés	13
4. Anyagok és módszerek.....	14
4.1 Sejttenyésztés	14
4.2 Mintakészítés.....	14
4.3 Mikroszkópia és képanalízis	14
4.4 Lézercsipesz	14
4.5 Szimulációk.....	15
4.6 Mikrofluidikai kísérlet előkészítése	15
5. Eredmények.....	17
5.1 A lézercsipesz kalibrálása	17
5.1.1 A csapda erőállandójának meghatározása polisztirol gyöngyökre.....	17
5.1.2 A csapda erőállandójának meghatározása baktériumsejtekre.....	18
5.2. Baktériumok vizsgálata lézercsipeszben	19
5.2.1 Csapdázott sejtek élettartamának vizsgálata mozgásuk alapján.....	19
5.3. „Baby Machine” mikrofluidikai elrendezés tervezése	21
5.3.1 Csapdarendszer tervezése és az áramlás modellezése a csatornában	22
5.3.2 <i>E. coli</i> baktériumok a „Baby Machine” eszközben	26
6. Összegzés	27
7. További terveim	28
Irodalomjegyzék.....	29
Köszönetnyilvánítás	31

1. Bevezetés

Tudományos Diákköri munkámat a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végeztem a Dr. Galajda Péter által vezetett Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoportban. A csoportban az egyik kutatási irány azzal foglalkozik, hogy a különböző környezeti paraméterek milyen hatással vannak a baktériumok alapvető életfolyamataira, pl. úszására és növekedésére. A kutatás, amihez csatlakoztam arra irányul, hogyan jelenik meg a fenotípusbeli heterogenitás egy genetikailag heterogén baktériumpopulációban. Tudományos munkám támaszkodik a csoportban korábban végzett kísérletekre (Ábrahám, 2016).

Genetikailag megegyező, akár egyetlen sejtből származó baktériumsejtek között is kialakulhatnak fenotípusbeli különbségek. Ilyenek például a sejtméret, alak, mozgékonyság, növekedés, ellenállóképesség. Ez a folyamat felelős többek között azért, hogy a baktériumpopulációk túléljenek az őket körülvevő dinamikusan változó környezeti feltételek mellett. Ahhoz, hogy ezeket a folyamatokat vizsgálni tudjuk, olyan kísérleti elrendezésekre van szükség, ami lehetővé teszi, hogy egyedi sejteket tudjunk hosszú távon, akár napokon keresztül megfigyelni, általunk jól meghatározott mikrokörnyezetben.

A mikrofluidikai rendszerek használata manapság igen elterjedt, jelen van a mérnöki világban és különböző tudományos kutatási területeken is, például a mikrobiológiában. Méreteiből fakadóan lehetőséget nyújt egyedi sejtek megfigyelésére precízen beállított mikrokörnyezetben.

Munkám során egy olyan új platform kialakításán dolgozom, melyben ötvözzük a mikrofluidika és az optikai csipesz technológiáját, annak érdekében, hogy akár több generáción keresztül is nyomon tudjuk követni a sejtek közötti leszármazási viszonyokat. Ennek az új platformnak a „Baby Machine” nevet adtuk.

Az eszköz alapjául egy mikrofluidikai csatornarendszer szolgál, aminek legfontosabb részét az egyedi sejtek megtartását szolgáló csapdarendszer képezi. A csapdák mérete összemérhető a baktériumsejtek méretével. A sejtek eszközön belül történő manipulációjára (mozgatására és megfelelő elhelyezésére) egy optikai csipeszt alkalmazunk.

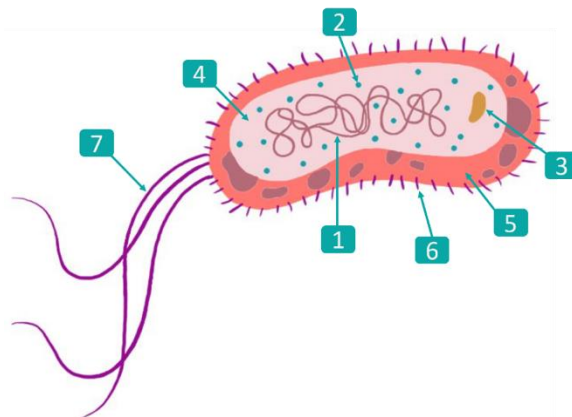
Dolgozatomban részletesen bemutatom azokat a tervezési folyamatokat és kísérleteket, melyekkel hozzájárultam ahhoz, hogy az eszköz egy változata elkészülhessen.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Élet a mikroszkopikus mérettartományokban

2.1.1 Baktériumok felépítése és mozgása

A baktériumok a legegyszerűbb mikroorganizmusok. Habár egysejtű élőlényekről van szó, mégis általában közösségekben élnek. Tudnak egymással kommunikálni és a munkamegosztás egyes formái is megtalálhatók bizonyos fajoknál. Az egyik legismertebb, és a kutatásokban is gyakran használt baktériumtörzs az *Escherichia coli*, mely nagyjából 0,8 μm széles és 2-4 μm hosszú pálcika alakú sejt. Sejtmembránjukat általában csillók borítják. Gyakran található rajtuk flagella, egy csillómódosulat, amely gyorsabb haladást (ún. úszó mozgást), esetenként irányváltást tesz lehetővé számukra (Brock, 2012). Az 1. ábra szemlélteti egy *E. coli* sejt vázlatos felépítését.



1. ábra: *Escherichia coli* baktérium vázlatos felépítése. (1) nukleoid DNS, (2) riboszómák, (3) plazmid DNS, (4) citoplazma, (5) sejtmembrán, (6) csillók, (7) flagellák (dreamstime, 2022)

Hidrodinamikai szempontból a baktériumok környezete és mozgása nagyon alacsony Reynolds-számmal jellemezhető. Ebben a tartományban más törvények érvényesek, mint az általunk ismert makroszkopikus világban. A Reynolds-szám egy mértékegység nélküli viszonyszám, amely a tehetetlenségi erők és a viszkozus erők hányadosaként adható meg:

$$R = \frac{\rho v L}{\eta}, \quad (1)$$

ahol ρ a közeg sűrűsége, v a részecske közeghez viszonyított relatív sebessége, L a részecske lineáris mérete, η pedig a közeg dinamikus viszkozitása. Egy vízben ($\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) 20 $\mu\text{m/s}$ átlagsebességgel úszó *E. coli* baktérium esetében a Reynolds-szám értéke kb. 10^{-5} -nek adódik. Kis Reynolds-számok esetén a viszkozus erők jóval jelentősebbek, azok dominálnak a tehetetlenségi erőkkel szemben. Ez a baktériumok esetében azzal jár, hogy amennyiben abbahagyják az úszást, szinte rögtön meg is állnak. Ugyanakkor, bár haladó mozgást nem végeznek, még sincsenek egyhelyben a baktériumok, ugyanis a transzverzális mozgástól függetlenül jelen van a Brown-mozgás is (Berg, 2004).

Az úszó baktériumok mozgását befolyásolják a környezet különböző paraméterei, többek között annak kémiai összetétele. Homogén izotróp környezetben mozgásuk véletlenszerűnek

mondható, ún. bolyongást végeznek, míg heterogén környezetben (pl. tápanyag gradiens jelenlétében) ez a mozgás irányítottá válik (Berg, 2004; Brock, 2012).

2.1.2 Bakteriális heterogenitás formái és jelentősége

Baktériumpopulációkra általánosan jellemző a heterogenitás, amely megjelenhet mind genotípusbeli, mind fenotípusbeli különbségek formájában. Azt a jelenséget, amikor genetikailag azonos sejtek között alakulnak ki fenotípusos különbségek (pl. sejtméret, alak, mozgás, növekedési ráta, génexpresszió tekintetében), fenotípusos heterogenitásnak nevezzük. Ennek a jelenségnek kiemelt szerepe lehet többek között abban, hogy egy baktériumpopuláció túléljen a dinamikus változó környezeti feltételek mellett. A baktériumok világát mikroskálájú kémiai és fizikai gradiensek befolyásolják időben és térben egyaránt. A mikroorganizmusok ezekhez a változásokhoz alkalmazkodva módosítják folyamatosan fenotípusukat.

Az egyik tipikus példája a fenotípusos heterogenitásnak a stressz hatására megjelenő perzisztens sejtek. Perzisztens sejteknek nevezzük az olyan sejteket, amelyek csökkentett életfunkciókat mutatnak, többnyire ún. nyugalmi állapotban vannak. Ezek a sejtek sokkal jobban tűrik a stresszt, akár a tápanyaghiányt, a hőmérsékletváltozást, de az antibiotikum kezeléseket is, mint a normálisan növekvő és osztódó sejtek. Egy adott populáció túlélésében és az antibiotikum-rezisztens formák kialakulásában nagyon fontos szerepe lehet a heterogenitás ezen formájának (Balaban, 2004).

Egy másik jól ismert jelenség, melyben megjelenik a fenotípusos heterogenitás, az ún. quorum érzékelés. A quorum érzékelés a bakteriális kommunikáció egy elterjedt típusa. Lényege abban áll, hogy a sejtek pici, könnyen előállítható jelmolekulákat termelnek, és folyamatosan érzékelik, hogy ebből mennyi van aktuálisan a közvetlen környezetükben. A jelmolekula koncentrációja információt nyújt számukra a populáció méretéről. Amennyiben a jelmolekula koncentrációja (azaz a populáció sűrűsége) eléri egy bizonyos értéket, a sejtekben génexpressziós változások következnek be. Olyan gének átírása indukálódik, melyeknek kulcsszerepe lehet többek között fertőzések kialakulásában, toxinok termelésében és a biofilmképzés során (Brock, 2003; Miller, 2001).

A baktériumok néha olyan összetett közösségeket hoznak létre, ahol a munkamegosztás fejlettebb formái, akár sejt differenciáció is előfordulhat. Ennek jellegzetes példája a *Myxococcus xanthus*, mely baktériumtörzs esetében a sejtek úgynevezett termőtestet hoznak létre. Ennek a termőtestnek a belsejében az egyébként pálcika alakú sejtek vastag falú gömbökké, spórákká formálódnak. A quorum érzékelésnek ezekben a folyamatokban is fontos szerep tulajdonítható (Miller, 2001; Velicer és Stredwick, 2002).

A fenti példák is jelzik, hogy a fenotípusos heterogenitás kiemelt szerepet játszik a baktériumok számos alapvető életfolyamatában. Ennek ellenére nem sok információ van arra vonatkozóan, hogyan hatnak a genetikai és környezeti változások a fenotípusra. Ahhoz, hogy ezt vizsgálhassuk, olyan kísérleti platformokra van szükség, melyekkel egyedi sejteket követhetünk jól meghatározott mikrokörnyezetekben. A továbbiakban ilyen módszereket mutatok be röviden.

2.2 Lézerek a biológiai kutatásokban: A lézercsipesz

Napjainkban a lézerek felhasználása igen sokrétű. Megtaláljuk őket az iparban precíziós műveletek végrehajtásánál, anyagmegmunkálásnál, egészségügyben szemműtéteknél, daganatos betegségek kezelésénél, sebészi eljárásokban, szépségiparban tetoválások eltávolításánál, művészetekben és még sorolhatnánk. Mindezek mellett nagyon sok tudományterületen is elterjedt a lézerek alkalmazása: mikroszkópiában, gravitációs hullámok detektálására (LIGO), stb.

Az első lézert 1960 májusában alkották meg, eredeti nevén LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (fényerősítés kényszerített emisszió révén). 1970-re megjelentek a kereskedelmi forgalomban is kapható lézerek. 1980-ra a közvélemény is tudomást szerzett róluk CD-k, lézerbemutatók által (Rose és Hogan, 2022).

2018-ban megosztott fizikai Nobel-díjat kapott Arthur Ashkin az optikai csipesz (más néven lézercsipesz) megalkotásáért, és annak biológiai rendszereken való alkalmazásáért (Galajda és Varjú, 2019).

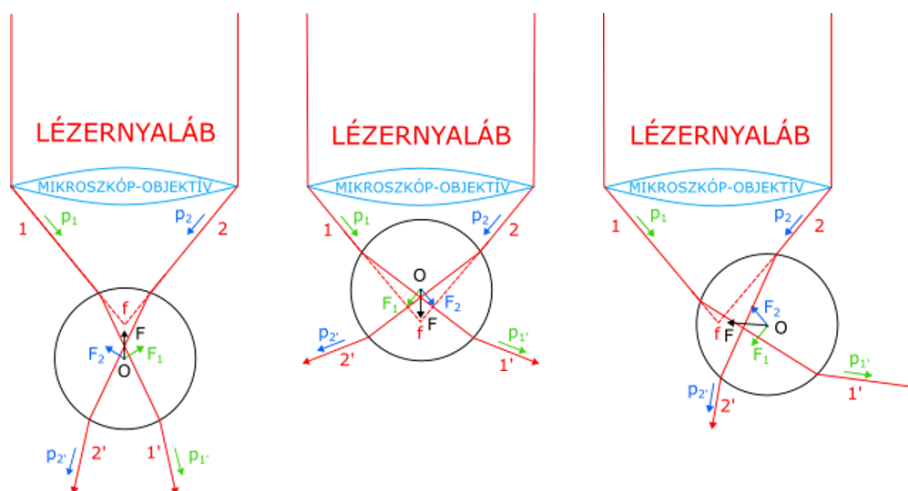
2.2.1 Az optikai csapdázás alapjai

Optikai csapdázás során egy fókuszált lézernyaláb segítségével tudunk mikroszkopikus méretű objektumokat meghatározott helyen tartani, amit a lézernyaláb impulzushordozása, azaz fénynyomása tesz lehetővé. A fénynyomás gondolata a 17. századból Keplertől származik, aki ezzel próbálta magyarázni az üstökösök csóvját, amely a megfigyelések alapján nem az üstökös haladási irányával ellentétes oldalon helyezkedik el, hanem mindig a Nappal átellenes oldalon figyelhető meg, a mozgás irányától függetlenül. Később, az elektromágneses sugárzás elméletének lefektetése során világossá vált, hogy az mechanikai impulzust hordoz.

Az optikai csipesz módszerének alapjait Arthur Ashkin fektette le az 1970-es években. Első kísérletei során megfigyelte, hogy egy gyengén lefókuszált lézernyaláb az útjába kerülő mikroméretű golyókat egyidejűleg löki előre és húzza a nyaláb közepe felé. Ez utóbbit gradiens erőnek nevezte el. Az első fénnel való kísérleti csapdázást két, egymással szembe fordított lézernyalábbal sikerült megvalósítani (Ashkin, 1997). A ma is használt változatban egyetlen lézernyaláb van, amely igen nagy numerikus apertúrával van lefókuszálva, így biztosítva, hogy a fényterjedés irányában is elég nagy intenzitás gradiens legyen a stabil háromdimenziós csapdázáshoz. A 2. ábrán bemutatom az optikai csapdázás alapelvét egy homogén izotróp gyöngy esetében. Három különböző helyzetben vázolom fel a fénnyaláb két – az optikai tengelyre tükröszimmetrikusan haladó – sugarának impulzusváltozását és a csapdázás során fellépő erőket (Ashkin, 1997; Galajda, 2002). Látható, hogy mindhárom irányú kitérítés esetén egy azzal ellentétes irányú visszatérítő erő hat a csapdázott golyóra.

Ashkin már az optikai csipesz biológiai alkalmazását is bemutatta: kísérletében vírusokat tervezett csapdázni, azonban a mintája véletlenül befertőződött, és emiatt végül baktériumokat sikerült először, mint élő sejteket csapdázni (Ashkin, 1997).

Az optikai csipesz egy továbbfejlesztett változata az ún. holografikus csipesz, melynek alapja egy térbeli fázismodulátor (SLM). Ezzel a számítógépről vezérelhető eszközzel a csapdázó lézer hullámfrontja dinamikusan változtatható, amely révén egyidejűleg több, egymástól háromdimenzióban függetlenül mozgatható optikai csapdát is létre tudunk hozni. Ily módon lehetőségünk van több test szimultán vagy egy kiterjedt test több ponton való csapdázására (Vizsniczai, 2019).



2. ábra: Fókuszált lézernyaláb és homogén izotróp gyöngy kölcsönhatása. A fény impulzusváltozásának eredményeként erő hat az objektumra. Kezdeti impulzusok: $\mathbf{p}_1$, $\mathbf{p}_2$. A kilépő sugarak impulzusai: $\mathbf{p}_1'$, $\mathbf{p}_2'$. Az $\mathbf{F}$ eredő erő a fókuszpont felé mutat. (Az ábra Galajda, 2002 alapján készült.)

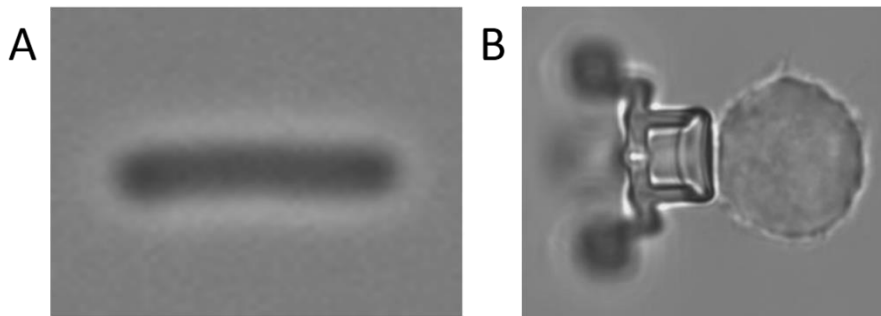
2.2.2 Lézer csipesz biológiai alkalmazásai

Az elmúlt évtizedben igen elterjedté vált a kutatásokban a lézer csipesz használata. Ennek következtében több, rendkívül sokrétű kísérlet elvégzésére, illetve alapvető információk megszerzésére nyílt lehetőség a biológia és a biofizika területén egyaránt. A következőkben néhány példát mutatok be a teljesség igénye nélkül.

Mikromanipuláció alkalmával mikroszkopikus objektumok meghatározott helyeken történő elhelyezését, mozgatását, elrendezését tudjuk megvalósítani. Ez akár teljesen zárt mintákban is végezhető, amennyiben az megfelelően átlátszó anyagból van kialakítva.

Biológiai objektumokat csapdázhatunk direkt vagy indirekt módon. Direkt csapdázásnak nevezzük azt, amikor az adott célpontot közvetlenül fogjuk meg az optikai csipesszel (3.A ábra). Erre példaként említenék egy kísérletet, melynek célja a *Chara* nevű alga növekedésének tanulmányozása volt (Leitz, 1995). Ez az alga membránnal körülzárt bárium-szulfát mikrokristályokkal, úgynevezett statholitokkal érzékeli a nehézségi erő irányát. Ezen kristályokat egy lézer csipesszel elmozgatva megfigyelték, hogy a kristályok helyzetétől függően változott az alga sejtjeinek növekedési iránya.

Az indirekt optikai csapdázás során a lézer csipesz valamilyen köztes objektumot ragad meg, amit hozzátapasztva a célsejthez, azt indirekt módon meg lehet fogni és mozgatni (3.B ábra). Ennek a módszernek az előnye, hogy a lézerfény nem károsítja a sejt membránját. Erre alkalmazható mikrostruktúrákat abban a kutatócsoportban is készítenek, ahol munkámat végeztem (Vizsnyiczai, 2020).



3. ábra: Élő sejtek direkt és indirekt optikai csapdázása. (A) *E. coli* baktérium csapdázása direkt módon két csapdával (saját felvétel). (B) egyetlen fehérvérsejt csapdázása indirekt módon mikrostruktúra segítségével (Vizsnyiczai G. 2020).

Az optikai csipesz a biológiai objektumok mikromanipulációja mellett erőmérésre is felhasználható. Az általa kifejtett erő közelítőleg 1 pN – 100 pN nagyságrendbe esik (Bustamante, 2021). Ebben a tartományban a molekulákat kialakító elsődleges kötések nem szakadnak föl, ezért a lehető legjobban a biológiai makromolekulák szerkezeti változásai során fellépő erőket, valamint másodlagos kötések erősségét tudjuk mérni (Bustamante, 2021). Galajda Péter és munkatársai például a DNS torziós képességeit vizsgálták a lézercsipesz segítségével (Galajda, 2002).

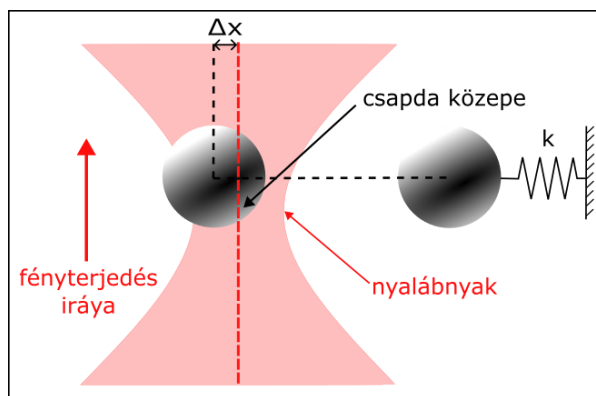
2.2.3 Csapdaerő meghatározása

Tekintsünk egy optikailag homogén, átlátszó és izotróp golyót, amelynek törésmutatója nagyobb, mint a közegé (4. ábra). Egy ilyen golyót egy optikai csapdával megfogva, az egy egyensúlyi helyzethez kötött Brown-mozgást fog végezni. Amennyiben valamilyen külső erő hat a golyóra, az egy új egyensúlyi helyzetbe fog kerülni, valamekkora távolságra kitérülve az eredeti helyzetéhez képest. Nem túl nagy erők esetén a kitérülés mértéke lineárisan arányos az erő nagyságával:

$$F = k\Delta x, \quad (2)$$

ahol F a golyóra ható erő, Δx a golyó eredeti egyensúlyi helyzete és új egyensúlyi helyzete között mért távolság, k az arányossági tényező, amely az optikai csipesz rugóállandójának tekinthető. Ezt a k tényezőt nevezzük csapdaállandónak.

Amikor jelen van akár több külső erő is, akkor a golyó elmozdul az optikai tengely és a rá ható erők eredőjének hatásvonalára által kijelölt síkban. Az erők hatására olyan helyzetet vesz fel a gyöngy, hogy a rá ható csapdaerő és külső erők eredője nulla legyen, azaz egyensúlyi helyzetbe kerül (4. ábra). Ebben az esetben a k arányossági tényező és Δx elmozdulás ismeretében a külső erők eredője, illetve a csapdaerő kiszámítható.



4. ábra: Optikai csipesszel csapdázott golyó. A golyó kis mértékben kitér, ezért hat rá egy kitéréssel arányos visszatérítő erő. Emellett a golyó a fényterjedés hatására a csapda közepétől följebb található.

A k csapdaállandót többféle módon is meg lehet határozni (Galajda, 2002). Az egyik módszer esetén a golyó kitérését figyeljük meg a környező folyadék áramlásának hatására. Ebben az esetben a golyóra ható erőt a Stokes-törvény segítségével számolhatjuk:

$$F = \gamma \cdot v = 6\pi\eta r v, \quad (3)$$

ahol v a golyó közegre vonatkoztatott relatív sebessége, γ a közegellenállási együttható, ami gömb esetén $6\pi\eta r$, melyben η a közeg viszkozitása, r pedig a gömb sugara. Meghatározva a golyó megfigyelt kitérésének mértékét, a csapdaállandó megkapható az (2) egyenlet szerint.

Szökési erő módszerének nevezik azt az eljárást, amely esetén azt határozzák meg, hogy a golyó mekkora erőnél, mekkora áramlási sebességnél képes kiszakadni a csapdából.

Egy másik lehetséges módszer a csapdaállandó meghatározására, ha követjük a golyó csapdában való Brown-mozgását. Az ekvipartíció elmélete alapján ilyenkor a csapdázott golyó kitérésének eloszlása Gauss-függvénnyel írható le:

$$P(x) = \frac{1}{Z} e^{\frac{-kx^2}{2k_B T}}, \quad (4)$$

ahol Z egy normálási faktor, k a csapdaállandó, x az elmozdulás, k_B a Boltzmann-állandó, T pedig a hőmérséklet. Így a csapdaállandó megkapható a mért kitérések eloszlásának a (4) egyenlet szerinti illesztésével, vagy az eloszlás szórásnégyzetének kiszámításával:

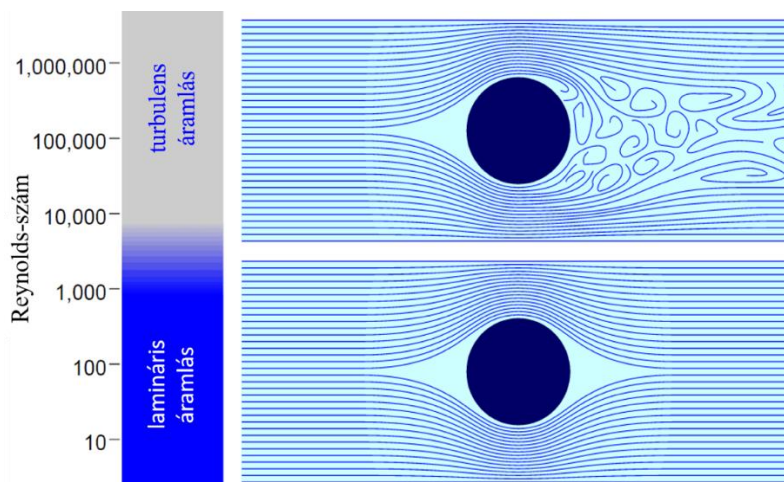
$$\sigma^2(x) = \langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k}, \quad (5)$$

ahol σ^2 a szórásnégyzet, x az elmozdulás, $\langle x^2 \rangle$ x^2 várható értéke, k_B a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet, k a csapdaállandó.

2.3 Mikrofluidika

A lézercsipesz mellett egy másik, általam használt módszer a mikrofluidika. A mikrofluidika egy olyan tudományterület és a mögötte lévő technológiát foglalja magában, aminek alapja a folyadékok kis térfogatban történő manipulációja. Ehhez mikroszkopikus méretű struktúrákat, csatornarendszereket, szelepeket kell létrehozni különféle mikrofabrikációs technikákkal. A mikrofluidikai eszközök fontos tulajdonsága, hogy a folyadékok áramlása a makroszkopikustól eltérő, hiszen a kis Reynolds-számú tartományban vagyunk. Ennek köszönhetően a kialakult áramlás egyenletes és lamináris, tehát nincs lehetőség kaotikus nyomás- és áramlási

sebességváltozásokra, turbulenciák kialakulására (5. ábra). E tulajdonságokat felhasználva lehetőségünk van a geometrián keresztül precíz tervezésre, modellezésre és ezáltal a mérésekhez szükséges jól meghatározott környezet is könnyen tervezhető.



5. ábra: Lamináris és turbulens áramlás kialakulása a Reynolds-számtól függően (nuclear-power, 2022).

A mikrofluidika módot ad igen kis méretű minták és kis térfogatú reagensek felhasználására, kevés helyet foglal, alacsony költségű, rövid elemzési időt igényel. Újfajta lehetőséget nyújt a molekulák koncentrációjának és eloszlásának befolyásolására mind térben, mind időben. A lamináris áramlás következtében a folyadékrétegek egymás mellett párhuzamosan haladnak, így a különböző folyadékok csak a diffúzió által keverednek a határfelületeken (Whitesides, 2006).

Különböző eljárások léteznek mikrofluidikai rendszerek kialakítására. Az egyik elterjedt módja az ún. fotolitográfia és lágy litográfia együttes használata. Ennek során az eszköz öntőformáját készítik el elsőként egy fényérzékeny fotopolimer (pl. SU-8) felhasználásával, majd ezt öntik ki a kétkomponensű polidimetil-sziloxán (PDMS) elastomerrel. A PDMS eszközök használata igen elterjedt, amit olcsó előállításának, fizikai és kémiai tulajdonságainak köszönhet: átlátszó, inert, nem toxikus vagy gyúlékony és gázpermeábilis (Ren, 2013). Ez utóbbi nagy jelentőséggel bír a biológiai minták esetében, pl. aerob baktériumokkal végzett kísérletek esetén.

A mikrofluidika számtalan új lehetőséget hozott a mikrobiológiai kutatásokba is. Segítségével vizsgálhatjuk többek között a baktériumok mozgását, kemotaxisát, biofilmképzést, populációk kölcsönhatását. A populáció szintű vizsgálatok mellett sok információt nyerhetünk az egyedi sejtek szintjén is. Az elmúlt évtizedben egyre több olyan eszköz jelent meg, mely baktériumok nagy számban történő csapdázását és hosszútávú megfigyelését teszi lehetővé (Hol és Dekker, 2014; Wu, 2016).

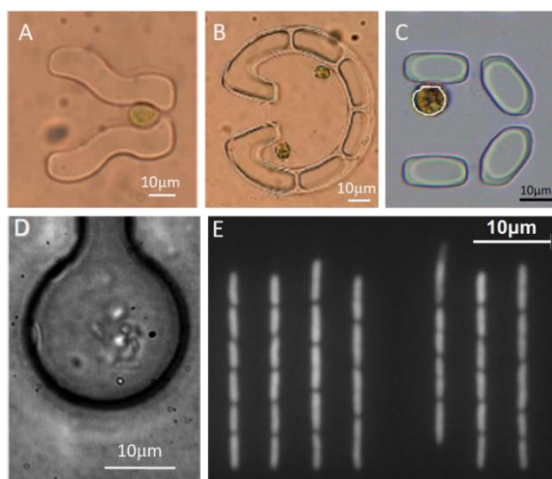
2.3.1 Egyedi sejtek vizsgálata mikrofluidikai módszerekkel

A mikrofluidikai rendszerek megjelenésével elérhetővé vált a laboratóriumi körülmények közötti pontos mérés mikroszkópiával egybekötve, azaz például egyes sejtek vizsgálata. Az évek során többféle elrendezés, elképzelés is született ilyen rendszerek megvalósítására. Ezek közül néhányat szemléltet a 6. ábra. Léteznek egyetlen sejt csapdázására alkalmas eszközök és

olyanok is, amelyek több sejt befogására is képesek. Ez utóbbiakat az eredeti és leánysejtek egyidejű megfigyelésére szokás használni.

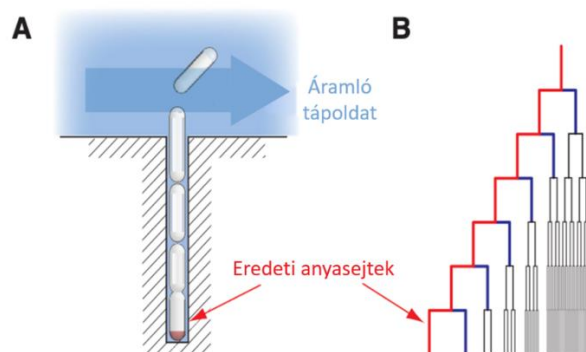
Egyes csapdakialakítások esetében a folyadékáram tartja a sejteket a kialakított mikrostruktúrákban. Ilyenkor fontos szerepet játszanak a struktúrák falán kialakított nyílások, ugyanis ezeken keresztül tud átáramlani a közeg, amely bent tartja a sejteket a csapdában. Az ilyen csapdarendszerek alkalmasak lehetnek többek között algák, például *Chlamydomonas reinhardtii* (6.A, 6.B ábrák), és *Symbiodinium sp.* (6.C ábra) megfigyelésére.

A mikrofluidikai csapdák másik típusa, amikor egy főcsatornából nyílnak le kisméretű oldalcsatornák vagy kamrák, melyek nem érintkeznek az áramlással közvetlenül, a főcsatornában áramló tápoldatból diffúzió útján jut a tápanyag a sejtekhez. *E. coli* baktériumok vizsgálatához sokszor használnak hasonló elrendezéseket (6.D és 6.E ábrák). Az irodalomban találunk példát arra is, hogy ezeket az eszközöket kombinálják optikai csipesszel, illetve spektroszkópiai módszerekkel. A 6.D ábrán látható megfigyelő kamrába például lézercsipesz segítségével helyezik el a sejteket, melyeket a későbbiekben antibiotikum-rezisztencia szempontjából vizsgálnak (Pilát, 2018).



6. ábra: Mikrofluidikai egysejtcsapdák, amelyek lehetővé teszik az egyedi sejtek rögzítését és megfigyelését. (A) tulipán alakú algacsapda, amellyel egy sejt csapdázható (Széles, 2022); (B) edény alakú algacsapda, amely az osztódás utáni leánysejteket is csapdázza (Széles, 2022); (C) U-alakú algacsapda, szintén alkalmas leánysejtek csapdázására is (Bashir, 2022); (D) baktériumsejtek csapdázására kialakított mikrokamra, amiben a leánysejtek is csapdázódnak (Pilát, 2018); (E) „Mother Machine” baktérium-csapdarendszer (Wang, 2010)

A 6.E ábrán egy „Mother Machine” eszközben osztódó *E. coli* populáció fluoreszcens képe látható, a 7. ábra pedig az eszköz működését szemlélteti (Wang, 2010). A „Mother Machine” egy olyan mikrofluidikai elrendezés, amelyben egy baktériumszélességű és magasságú, többsejthosszú csapdák helyezkednek el egymás mellett. Ezek a keskeny csatornák egy nagyságrenddel magasabb főcsatornába torkollanak. A főcsatornában tápanyagdús médiumot áramoltatnak. A legbelső sejt (ún. anyasejt) az osztódások során mindvégig a csapda zárt végében marad, a keletkező leánysejtek pedig egymást követve betöltik azt. Ha már nem fér el a csatornában több sejt, akkor az oldalcsatorna végében lévő baktériumokat az áramlás kimossa a rendszerből. Ez az elrendezés lehetővé teszi az anyasejt megfigyelését és a leszármazási viszonyok nyomon követését akár több generáción keresztül (Wang, 2010). Az eszközt eredetileg bakteriális öregedés vizsgálatokra tervezték, hiszen a csatorna belsejében levő anyasejt akár napokon keresztül is nyomon követhető, és a belső pólusa nem változik.



7. ábra: „Mother Machine” elméleti elrendezése (Wang, 2010). (A) a „Mother Machine” fizikai működését mutatja. (B) az osztódáskor keletkező sejtek leszármazási viszonyait szemlélteti. Az elrendezésnek köszönhetően az eredeti anyasejt végig az oldalcsonkban marad.

3. Célkitűzés

Tudományos Diákköri munkám célja egy olyan új kísérleti platform kialakítása, ahol ötvözőm a mikrofluidika technológiáját és az optikai csipeszt annak érdekében, hogy nyomon tudjuk követni akár több generáción keresztül a baktériumok leszármazási viszonyait. A tervezett eszköz segítségével lehetőségünk lesz egyedi sejtek csapdázására, és mikroszkópos képalkotással követhetjük a sejteket jellemző paraméterek változását hosszú távon.

A munkatervem a következő részfeladatokat foglalja magában:

- Első lépésként megtervezem a mikrofluidikai eszköz baktériumok csapdázására alkalmas egységét. Többféle csapdaelrendezést is kipróbálok, a tervezéshez a KLayout szoftvert használom.
- Ahhoz, hogy lássuk, a folyadék hogyan viselkedik az általam tervezett mikrocsatornáknál, azok alkalmasak lehetnek-e a baktériumok befogására, áramlástani szimulációkat készítek a COMSOL program segítségével. A szimulációkat a csatornarendszer üres állapotában, illetve modellbaktériumok felhasználásával is futtatom.
- A mérésekhez szükséges sejtenyészítés és oldatkészítés munkamenetét elsajátítom az önálló munka érdekében.
- A lézercsipeszt kalibrálom mikrométeres gyöngyök és elpusztult baktériumok esetében egyaránt. Ezek a mérések felhasználhatóak a csapdaállandó meghatározásához.
- Fontos, hogy a sejtek ne sérüljenek a kísérletek során, ezért megvizsgálom *E. coli* baktériumok életben maradási idejét az optikai csapdában. Ehhez a csapdázott sejtek mozgását tanulmányozom.
- Baktériumokkal éles kísérletet is szeretnék megvalósítani, felhasználva a szimulációs, kalibrációs és élettartamra vonatkozó kísérletek során szerzett eredményeket.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Sejttenyésztés

A kísérletekhez HCB437 nem-kemotaktáló mutáns *E. coli* baktériumot használtam. A sejteket -80 °C-on tároljuk, felhasználás előtt szélesztjük őket agar lemezekre, ezeket pedig 4 °C-on tartjuk. A kísérletet megelőző napon egy darab kolóniát 3 ml LB (Trypton 10 g/l, NaCl 10 g/l, élesztőkivonat 5 g/l) tápoldatba helyeztünk, és 30 °C-on 200 rpm-en egy rázóinkubátorban tartottuk egy éjszakán át. Megvártuk, hogy 600 nm-en mérve a baktérium szuszpenzió optikai denzitása elérje a 0,6 körüli értéket, mivel a baktériumok ilyenkor a legmozgékonyabbak.

4.2 Mintakészítés

A lézercsipesz kalibrációjához első lépésben 1, 3 és 6 µm átmérőjű polisztirol gyöngyöket használtam. Az oldatba 1% Tween20-at tettünk, ami megakadályozza, hogy a golyók egymáshoz, illetve a felülethez tapadjanak.

A sejtek csapdázásához „motilitás puffert” használtam, melynek összetétele: K_2HPO_4 $6,2 \cdot 10^{-3}$ M, KH_2PO_4 $3,3 \cdot 10^{-3}$ M, EDTA 10^{-4} M, NaCl $67 \cdot 10^{-3}$ M, 0,02% Tween20, pH 7,5.

Az elkészült oldatokat minden esetben két fedőlemez közé cseppentettem. Ezek között kétoldalú ragasztót használtam egy jó közelítéssel állandó vastagság elérése érdekében és azért, hogy meggátoljam a minta párolgását.

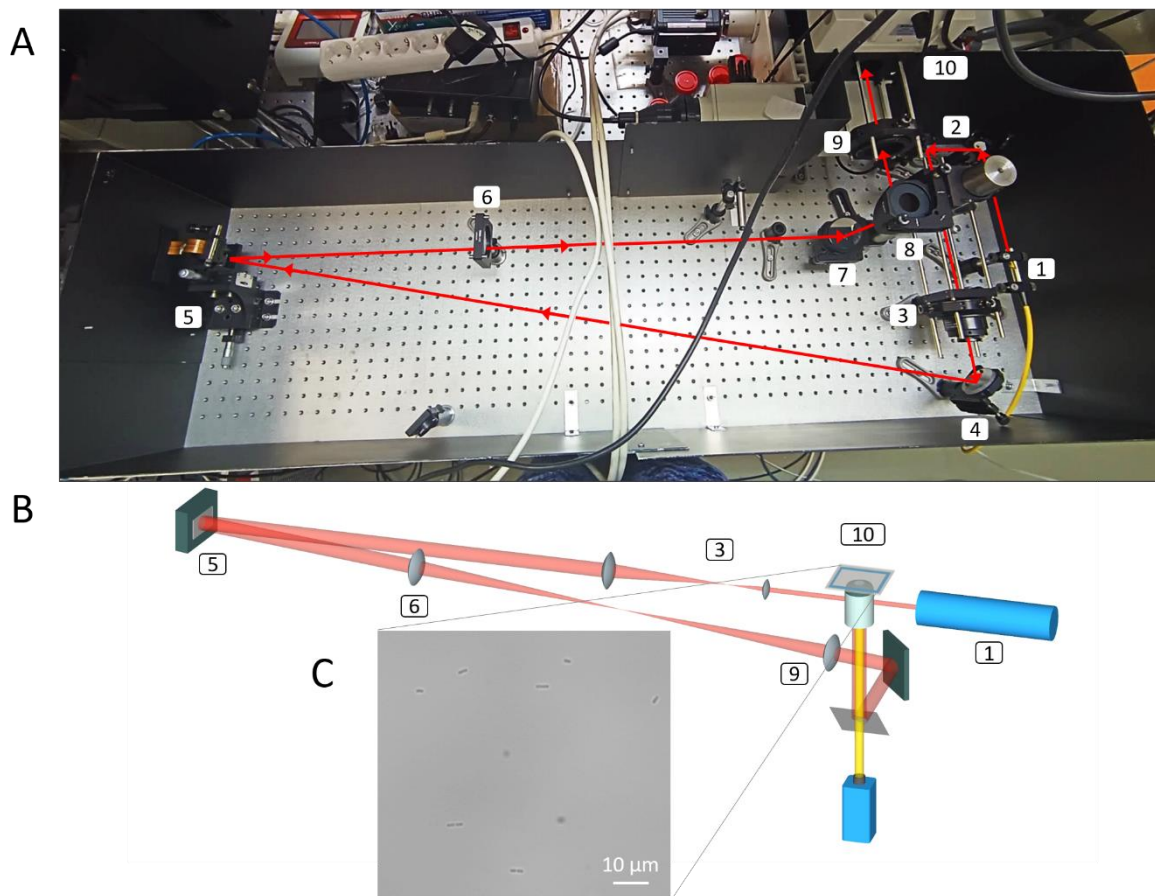
4.3 Mikroszkópia és képanalízis

A minta megfigyeléséhez Nikon Eclipse Ti (Nikon Inc.) inverz mikroszkópot, 60 × 1,2 NA Olympus UPlanApo/IR objektívet, Prior Proscan II motorizált asztalt (Prior Scientific Inc.), fluoreszcens gerjesztő forrásként Prior LUMEN 200Pro lámpát (Prior Scientific Inc) használtunk. A videók készítése Hamamatsu Digital Camera C13440 ORCA-flash4.0 kamerával történt, melynek vezérléséhez a Nikon NIS Elements AR (Nikon Inc.) szoftvert használtam.

A rögzített képfelvételeket egy, a kutatócsoportban korábban fejlesztett MATLAB R2020b (MathWorks, Inc., Natick, MA USA) program segítségével elemeztük.

4.4 Lézercsipesz

A kísérletekhez a csoportunk holografikus lézercsipesz rendszerét alkalmaztam (Vizsnyiczai, 2020). A rendszer fényforrása egy folytonos üzemű lézer ($\lambda = 1070$ nm, IPG-YLM-10, IPG Photonics, Amerikai Egyesült Államok). A holografikus nyalábformázást egy HoloEye Pluto típusú SLM végzi. Az optikai elrendezést a 8. ábrán mutatom be.



8. ábra: (A) a lézercsipesz optikai elrendezése: lézerút: piros vonal, rajta haladási irányt jelző nyilak, optikai szál (1), irányító tükrök (2), nyalábtágító lencserendszer (3), irányító tükrök (4), térbeli fázismodulátor (SLM) (5), 4f rendszer első lencsége (6), irányító tükrök (7) és (8), 4f rendszer második lencsége (9), mikroszkóp (10). (B) a lézercsipesz elméleti felépítése. (C) *E. coli* baktériumokról készített felvétel.

4.5 Szimulációk

A „Baby Machine” mikrofluidikai eszközt KLayout szoftver segítségével terveztem meg (KLayout Layout Viewer And Editor, 2022. 11. 10.) és Comsol Multiphysics szoftver (COMSOL AB, Stockholm, Svédország) felhasználásával modelleztem a csapdákat tartalmazó szakaszon a folyadékáramlást modellbaktériumok jelenlétében és anélkül. A szimulációkat háromdimenziós modellen végeztem, lamináris áramlást és időfüggő modellt alkalmazva. A bemeneti sebességet $v_0 = 0.017 \mu\text{l/h}$ -nak állítottuk be, ami a kísérlethez használni kívánt (3. típus) csapdaelrendezés esetében $50 \mu\text{m/s}$ -nak felel meg. A modellbaktériumok behelyezésével lehetőségem volt kiszámolni a fellépő nyíróerők nagyságát is.

4.6 Mikrofluidikai kísérlet előkészítése

A munkatársak által készített SU-8 öntőformát PDMS-sel (1:10) kiöntöttem, majd egy éjszakán át 40°C -on sütöttem. Az eszközön a megfelelő helyeken kimeneteket és bemeneteket lyukasztottam. Ezekhez csatlakoztattuk a csöveket később.

Oxigén-plazma kezeléssel fedőlemezhez ragasztottam az eszközt tartalmazó PDMS-t. Ehhez Harrick PDC-002 plazmatisztítót használtam (Harrick Plasma, Ithaca NY, USA).

A rendszert tápoldattal töltöttük fel, majd a baktériumos szuszpenziót kézzel a megfelelő helyre töltöttük egy fecskendő segítségével. Ezek után fecskendőpumpával (Model No. 4000, New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA) áramoltattuk a tápoldatot. A kívánt áramlási sebességet a pumpán állítottuk be. A csapdázás időtartamára az áramlást szüneteltettük.

5. Eredmények

5.1 A lézercsipesz kalibrálása

5.1.1 A csapda erőállandójának meghatározása polisztirol gyöngyökre

A lézercsipesz kalibrálását három különböző átmérőjű ($1\text{ }\mu\text{m}$, $3\text{ }\mu\text{m}$, $6\text{ }\mu\text{m}$) polisztirol golyóval végeztem el. Mindhárom golyó esetében felvételeket készítettem öt különböző lézerteljesítmény mellett ($0,5\text{ W}$; 1 W ; $1,5\text{ W}$; 3 W ; 6 W). Ezt a méréssorozatot háromszor ismételt meg.

A k csapdaállandót az ekvipartíció tétel felhasználásával határoztam meg a 2.2.3 fejezetben leírtak szerint. Tudjuk, hogy a csapdázott golyó mérettől és lézerteljesítménytől függően különböző nagyságú kitérésekkel Brown-mozgást végez. Ezeket a kitérésértékeket tudjuk követni időben ($x(t)$) a mikroszkópos felvételeken. Emellett az is ismeretes, hogy ha a csapda potenciálja harmonikus, akkor a különböző időpillanatokhoz tartozó kitérésértékek Gauss-eloszlást követnek. Ábrázolva a mért értékeket, megkaphatjuk σ_x -t, amely a Gauss-függvény szélességét jellemzi. Ezt és az ekvipartíció tételét felhasználva, mely értelmében termikus egyensúly esetén a gyöngy minden egyes szabadsági fokára $\frac{1}{2}k_B T$ energia jut, kiszámíthatjuk a csapdaállandót.

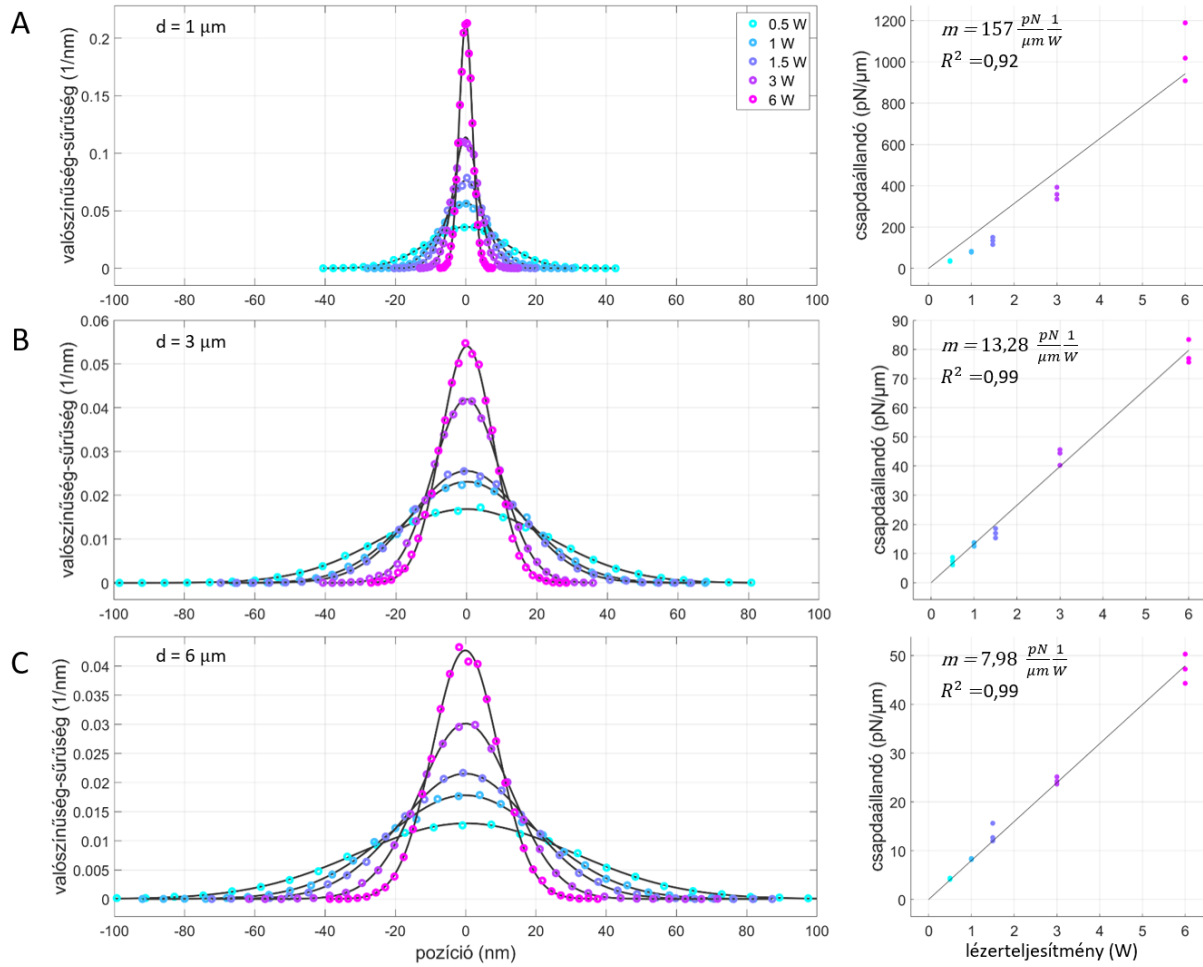
Esetemben első lépésként a csapdázott céltárgyról készítettem húszezer képet. A képek kiértékeléséhez egy, a kutatócsoport egyik tagja által korábban megírt Matlab programot használtunk. Ez a program a képsorozat legelső felvételét vette referencia pontnak. Minden ezt követő felvételen ezzel a kiindulási helyzettel vetette össze a golyó helyzetét, és határozta meg az elmozdulásokat. Ezen elmozdulásértékek hisztogramjára illesztettünk Gauss-függvényt a 2.2.3 fejezetben leírtak szerint, melynek σ_x szórásából vissza tudunk következtetni a csapdaállandó értékére:

$$k = \frac{k_B T}{\sigma_x^2} \quad (5)$$

ahol $\sigma_x^2 = \langle (x - \bar{x})^2 \rangle$ a golyó átlagos négyzetes elmozdulása, $\bar{x}$ az elmozdulás átlaga, k_B a Boltzmann-állandó, T a hőmérséklet (Ábrahám, 2016).

Eredményeimet a 9. ábrán foglalom össze. A grafikonokon látható, hogy minél nagyobb a lézer teljesítménye, annál kisebb a Gauss-függvény szélessége, azaz csökken a golyó kitérése. Az optikai csipesz csapdázó ereje egyenesen arányos a lézer teljesítményével. A mért kitérésekből számolt csapdaállandó teljesítménytől való függését mutatja a 9. ábra jobb oldali panelje, mely adatokra egy, az origóból induló félegyenest illeszthető.

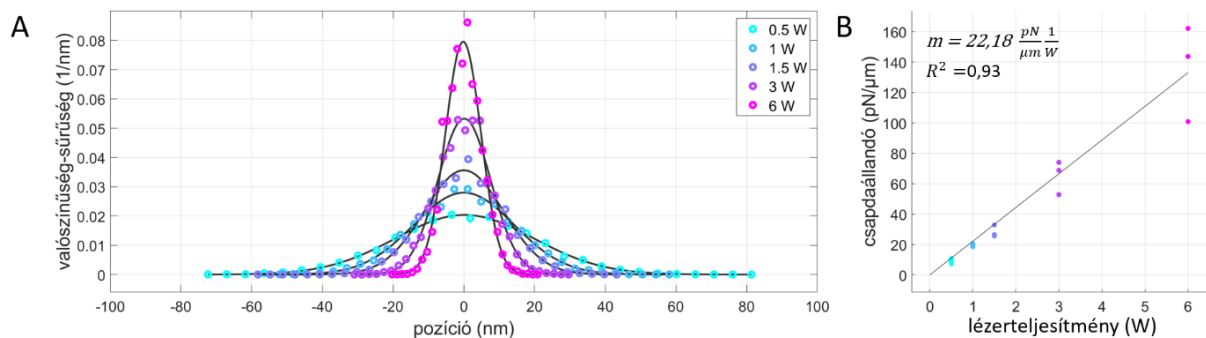
A csapdaerő függ a megfogott céltárgy méretétől. Ennek megfelelően azonos teljesítmények mellett minél nagyobb a golyó átmérője, annál szélesebb és laposabb a Gauss-függvény (9. ábra bal oldali panel), és ezzel együtt csökken a jobb oldali paneleken látható illesztett egyenesek meredeksége.



9. ábra: Lézerszipesz kalibrálása különböző átmérőjű golyókkal: (A) $1 \mu\text{m}$; (B) $3 \mu\text{m}$; (C) $6 \mu\text{m}$. Bal oldali panel: a csapdázott gyöngyök valószínűség-sűrűsége a pozíció függvényében. A pontok jelzik a mért értékeket, a folytonos vonal pedig az elméleti görbét. Jobb oldali panel: a kapott csapdaállandók a lézerteljesítmények függvényében, ahol m az illesztett egyenes meredeksége, R^2 az illesztés pontossága.

5.1.2 A csapda erőállandójának meghatározása baktériumsejtekre

A kalibrációs gyöngyök után érdemes külön kalibrálni baktériumokra is a csipeszt, ugyanis a baktériumsejtek szferocilinder, nem pedig gömb alakúak. Ezen felül fontos kiemelnünk, hogy a közegre vonatkoztatott relatív törésmutatójuk is különbözik az előző fejezetben használt polisztirol golyók törésmutatójától. Ehhez a kísérlethez elpusztult sejteket használtam, melyek csupán Brown-mozgást végeztek. A baktériumokon végzett kalibrációs kísérlet eredményeit a 10. ábra mutatja be. Itt is jól látható, hogy a teljesítmény növelésével csökkennek a kitérések (10.A ábra), és nő a csapdaállandó (10.B ábra).



10. ábra: (A) Csapdázott baktérium valószínűség-sűrűségének ábrázolása a pozíció függvényében. A pontok jelzik a mért értékeket, a folytonos vonal pedig az elméleti görbét. (B) A kapott csapdaállandók a lézerteljesítmények függvényében, ahol m az origóból induló illesztett félegyenes meredeksége, R^2 az illesztés pontossága.

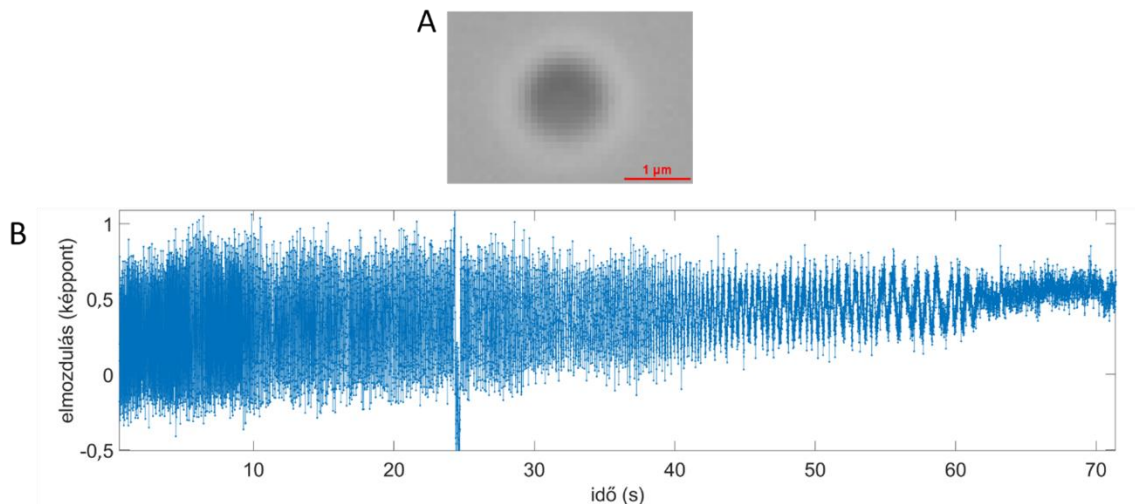
5.2. Baktériumok vizsgálata lézercsipeszben

5.2.1 Csapdázott sejtek élettartamának vizsgálata mozgásuk alapján

Baktériumsejtek esetében a kalibrációs gyöngyökkel ellentétben kiemelendő, hogy Brown-mozgás mellett úszó mozgást is végeznek. Az általam használt *E. coli* törzs egyik fő jellemzője, hogy nem-kemotaktáló, tehát nem képes irányváloztatásra, helikális alakú flagellájának folytonos forgatásával előre haladó mozgást végez.

Egyetlen optikai csipesszel csapdázva egy darab baktériumot, az beáll függőlegesen a lézer irányába a fénynyomás hatására. Ez az állapot figyelhető meg a 11.A ábra mikroszkópos felvételén. Mivel egy *E. coli* sejt flagelláit tekintve nem feltétlen szimmetrikus felépítésű, az azok által keltett meghajtó erő jellemzően nem párhuzamos a sejt tengelyével. Ennek következtében a csapdában tartott sejt precesszálo mozgást fog mutatni. Az optikai csapda lézerteljesítményének hatására károsodó sejt egyre kevésbé lesz képes fenttartani a flagelláris motorok forgását, így a sejt mozgásának megfigyelésével követhetjük annak fokozatos károsodását. A sejt mozgásából adódó intenzitásváltozásokat és kitéréseket könnyen tudjuk detektálni a sejtről rögzített képsorozaton.

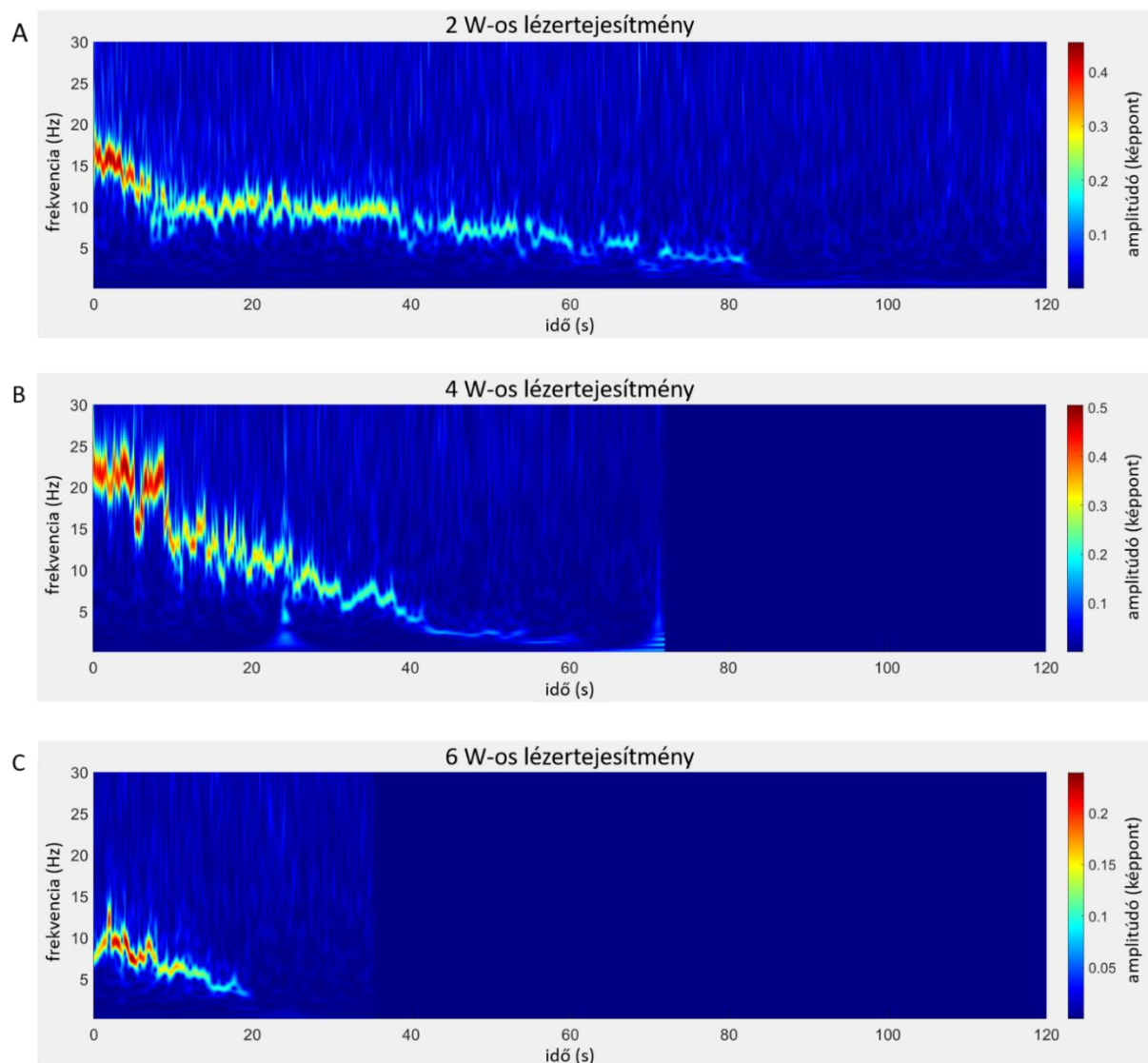
A csapdázott baktériumok életben maradását három különböző lézerteljesítményen vizsgáltam. Az optikai csipesszel csapdázott *E. coli* baktériumról az elkapást követően a lehető leggyorsabban felvételt indítottam 200 kép/másodperc sebességgel. A felvétel feldolgozásához a kutatócsoport egyik tagja (Vizsnyiczai Gaszton) által készített Matlab programot használtam fel, aminek a segítségével megkaptam az adott sejtnél az első képhez viszonyított összes elmozdulásértékét az idő függvényében. Egy jellegzetes görbét mutatok be a 11.B ábrán, melyet 4 W lézerteljesítmény mellett vettem fel. Jól megfigyelhető, hogy a sejt periodikus mozgásának a frekvenciája és az amplitúdója is csökken a csapdában töltött idővel, majd 60 s környékén a baktérium elpusztul a fénnel való csapdázás hatására és már csak Brown-mozgást végez.



11. ábra: (A) 4 W lézerteljesítménnyel csapdázott *E. coli* sejtről készült mikroszkópos felvétel. A sejt szerkezetének részletei nem figyelhetők meg egy ilyen felvételen, mivel a mérete nagyon közel esik a fénymikroszkóp felbontásához. (B) A sejt egyensúlyi helyzetétől vett távolsága az idő függvényében.

A fent bemutatott 11.B ábrához hasonló görbéket kaptam 2W, 4W és 6W teljesítmények esetében is, amelyeken megfigyelhető volt, hogy a csapdázott baktériumok a lézerteljesítmény növelésével egyre rövidebb ideig voltak életképesek. Minden teljesítményen 3-6 sejtet fogtam meg és követtem a mozgásukat.

Következő lépésként a kapott elmozdulás-idő függvényeken ún. Wavelet analízist alkalmazva – szintén Vizsnyiczai Gaszton segítségével – megkaptuk azt, hogyan változik idővel a 11.B ábrán bemutatott jel frekvenciája és amplitúdója (12. ábra). Az előnye ennek a kiértékelési módnak, hogy egyszerre kapunk információt a csapdázott baktérium helyhez kötött periodikus mozgásából származó frekvenciájának (függőleges tengely) és amplitúdójának (szín) időbeli változásáról. Az itt kapott eredményeken is jól megfigyelhető, ahogy mind a frekvencia, mind az amplitúdó csökken az idő teltével. Az is látszik, hogy minél nagyobb a csapdázó lézerteljesítménye, annál kevesebb ideig maradnak életben a sejtek. A 12. ábrán bemutatott három sejt esetében 2 W-nál ~80 s, 4 W-nál ~40 s és 6 W-nál ~20 s-nak adódott az az időtartam, amíg életképesek maradtak a csapdában. Minden teljesítmény esetén több mérést is végeztem. 2 W; 4 W; 6 W teljesítményeken az átlagos túlélési idők 97 ± 20 s; 55 ± 8 s; 29 ± 12 s. A kapott nagy szórásértékek jelzik a sejtek közötti heterogenitást. A szórások számításánál néhány kiugró esetet nem vettem figyelembe. Szintén megfigyelhető még a biológia sokszínűsége a sejtek mozgásának kezdeti frekvenciaértékeinél.



12. ábra: Csapdázott *E. coli* sejt élettartamának mérése optikai csapdában különböző lézerteljesítmények mellett: (A) 2 W; (B) 4 W; (C) 6 W. A sejt periodikus mozgásának frekvenciája és amplitúdója az eltelt idő függvényében. A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében azonos tengelyadatokkal tüntettem fel az eredményeket.

5.3. „Baby Machine” mikrofluidikai elrendezés tervezése

Bár optikai csipesz segítségével tudunk csapdázni egyedi sejteket, hosszabb idejű megfigyelésekre ez a módszer nem alkalmas. Ennek fő oka, hogy a lézerfény károsítja a sejteket, és mint láttuk, rövid időn belül elpusztulnak. Habár az SLM segítségével egyszerre több sejtet is tudunk csapdázni, mégis limitált az egyidejűleg megfogható sejtek száma, mivel az egy nyalábból létrehozott csapdák a darabszámmal fordítottn arányos teljesítményűek.

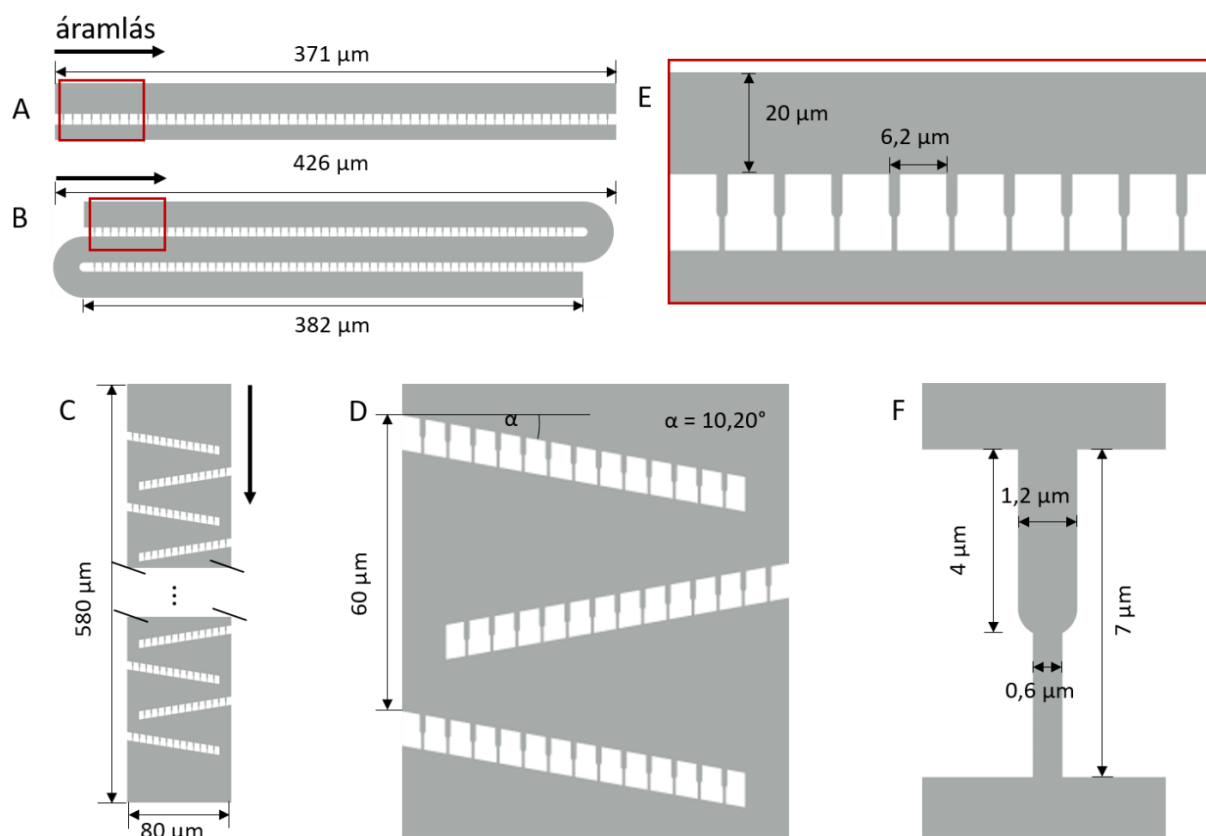
Hosszabb idejű, akár több napos, sok baktériumos megfigyelésekre alkalmas rendszert lehet készíteni a mikrofluidika technológiáját felhasználva. Az ilyen típusú mikrofluidikai eszközökben akár az osztódások során keletkező leánysejteket is össze tudjuk gyűjteni. Az irodalomból egy jól ismert példa erre a „Mother Machine”, melyet a 2.3.1 fejezetben mutattam be részletesen. A kutatócsoport, amelyhez csatlakoztam egy hasonló rendszer kialakításán

dolgozik. Az eszköz, melynek a fejlesztéséhez csatlakoztam a munkám során a „Baby Machine” nevet kapta.

5.3.1 Csapdarendszer tervezése és az áramlás modellezése a csatornában

A mikrofluidikai csapdarendszer felépítését tekintve többféle elképzelésünk volt. Az alapötlet lényege, hogy az első sejt osztódása után a leánysejteket is szeretnénk vizsgálni, ezért ugyanúgy csapdázzuk azokat is. Így tanulmányozhatjuk hogyan változnak a sejtek bizonyos paraméterei a generációk előrehaladtával.

Az egyes sejtek hosszútávú csapdázását jól megtervezett mikrostruktúrák és áramlás segítségével szeretnénk megvalósítani. Első lépésben az volt a feladatom, hogy a baktériumsejtek rögzítésére alkalmas kehely formájú struktúrát tervezek, melynek alakja és méretei a 13.F ábrán láthatók. Méretei közel megegyeznek egy átlagos *E. coli* baktériumével. Alján keskeny átvezetések vannak az alsó csatornába. A kialakítás célja, hogy a folyadék csapdán való átáramlása helyben tartsa a sejteket. A legegyszerűbb elrendezés (1. típus), ha a kehelyeket egymás mellé helyezzük (13.A ábra). Ennek egy továbbgondolt változata (2. típus), amikor a csapdák ugyanúgy sorban helyezkednek el, de a főcsatornában kanyarok is vannak. (13.B ábra). A harmadik változatban pedig 13.A elrendezését, mint alapelemet sokszorozva, és bizonyos szögben megdöntve lépcsős mintázatot alakítottam ki (13.C ábra).

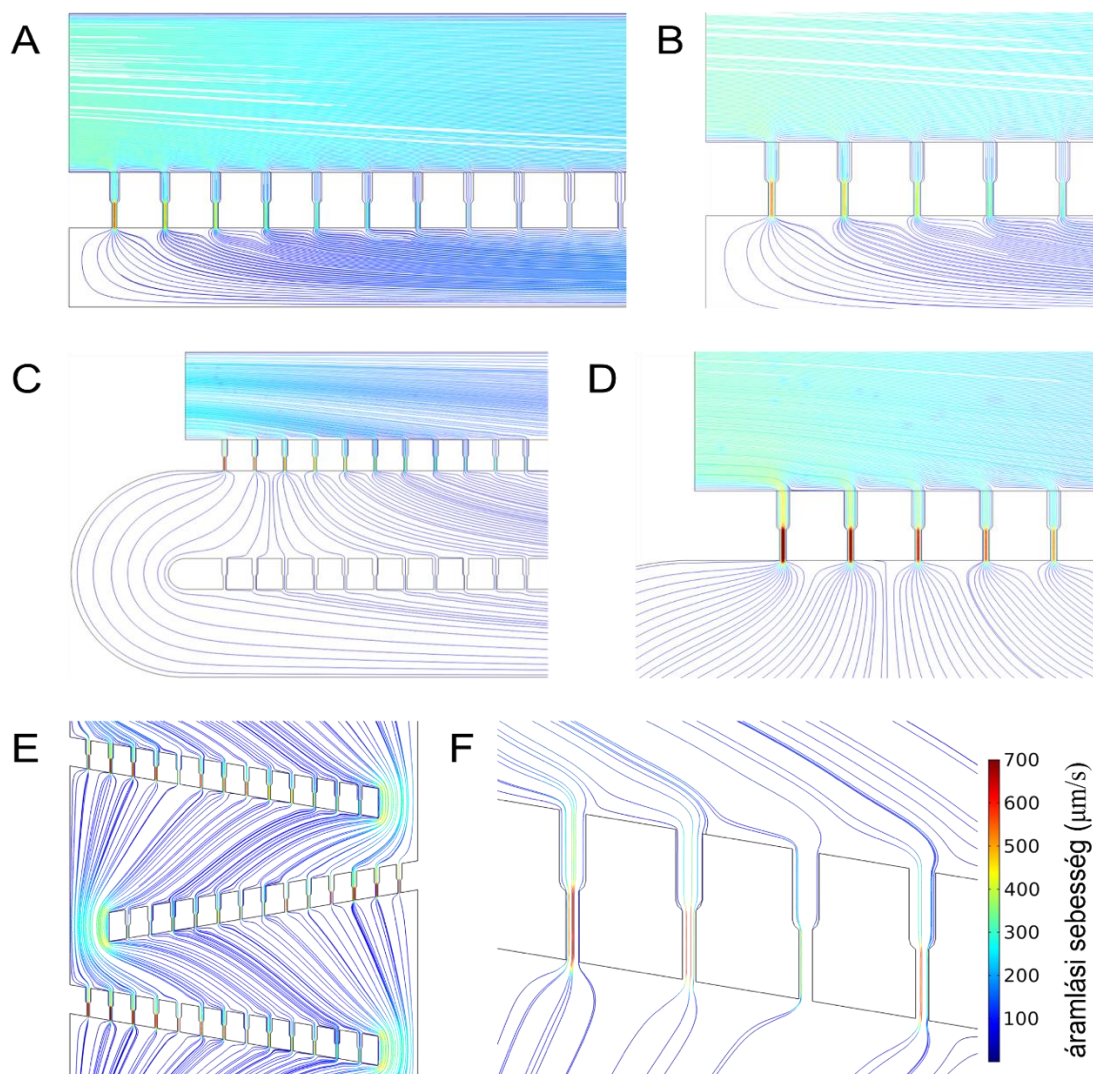


13. ábra: (A), (B), (C) Három különböző elrendezése a baktériumsejtek megfigyelésére szolgáló mikrofluidikai csapdarendszernek. (D) Nagyított részlete a (C) elrendezésnek. (E) Nagyított részlete az (A) és (B) ábrán kijelölt területnek. (F) A kehely alakú egysejtcsapdát mutatja be méreteivel.

A tervek elkészítése után áramlástani szimulációkat végeztem a Comsol Multiphysics szoftver segítségével (14. ábra). 3D-s szimulációkat készítettem, ahol a csatornák magassága

1,2 μm volt, ami csupán kicsit nagyobb, mint egy átlagos *E. coli* baktériumsejt. Bemenő áramlási sebességnek minden esetben 0.01728 $\mu\text{l/h-t}$ állítottam be, ami a 13.C ábrán látható lépcsős elrendezés (3. típus) esetén 50 $\mu\text{m/s}$ -ot jelent. A későbbiekben ennek a lépcsős elrendezésnek a működését vizsgáltam meg részletesebben. A beállított 50 $\mu\text{m/s}$ -os sebesség kb. kétszerese egy úszó *E. coli* baktérium sebességének.

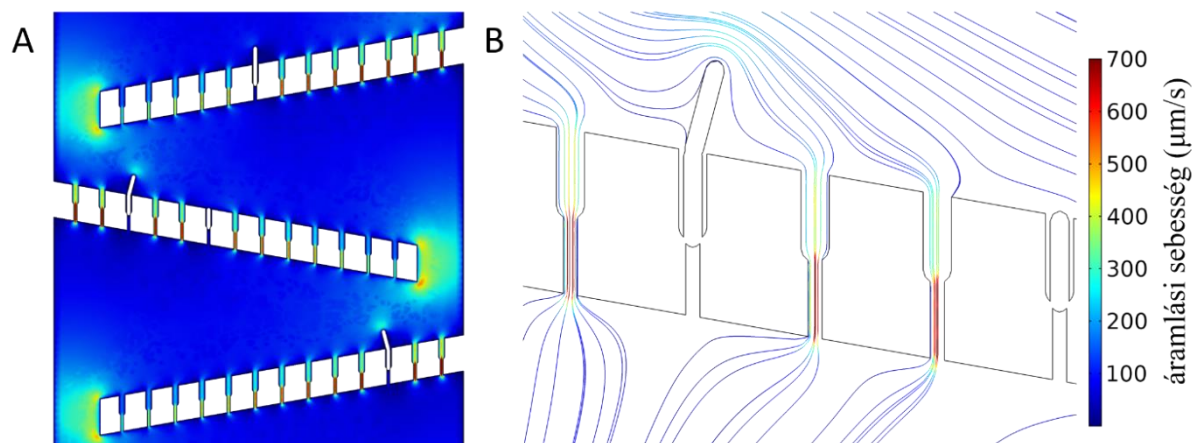
A fentebb bemutatott három mikrofluidikai csapdázó egység szimulációit a 14. ábra mutatja be: láthatjuk az áramvonalakat, a színek pedig az adott helyen kialakuló áramlási sebességeket szemléltetik. A szimulációkat a 13. ábrán szereplő teljes csatornarendszereken végeztem, de a könnyebb láthatóság kedvéért ezeknek csak egy-egy részleteit mutatom be. A képeken jól látszik, hogy nem alakulnak ki turbulens jelenségek, az áramlás lamináris mindvégig. Minél szűkebb helyen megy keresztül a folyadék, annál nagyobb áramlási sebességre tesz szert. Ez leginkább a kehely alakú csapdák szűkítéseinél figyelhető meg. A 14.B és 14.D ábrák esetében az áramlási sebességekben (színskála) mutatkozó különbségek abból adódnak, hogy a csapdarendszerek összességében különböző mennyiségű egysejtszűkítőt tartalmaznak.



14. ábra: A három különböző csapdaelrendezést tartalmazó mikrocsatorna áramlási szimulációja. A csatornák méretei megegyeznek a 13. ábrán bemutatottakkal. Az áramlási sebességet jelző színskála mindegyik ábrára vonatkozik. (A), (B) A mikrofluidikai elrendezés 1. változata. (C), (D) A mikrofluidikai elrendezés 2. változata. (E), (F) A mikrofluidikai elrendezés 3. változata.

A szimulációk alapján a harmadik típusú csapdarendszert választottam ki, a továbbiakban ezt az elrendezést vizsgáltam részletesebben. Különböző élekciklusban lévő baktériumokat modelleztem és ezeket a modellbaktériumokat néhány csapdába helyeztem, mint akadályt. Az áramlás alakulását és sebességét a 15. ábrán áramvonalak és színek szemléltetik.

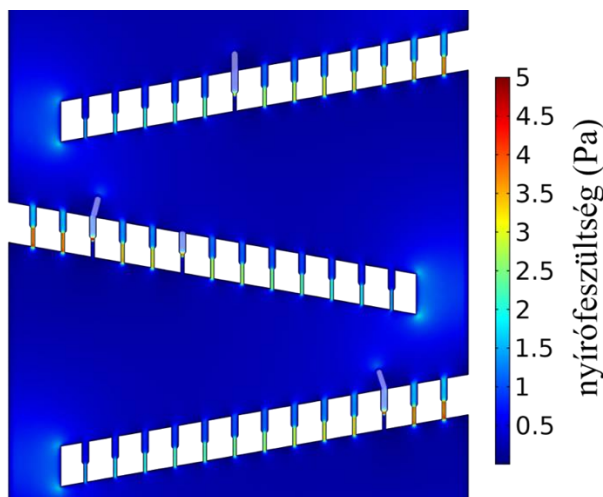
Az ábrákon jól látható, hogy a modellbaktériumok miatt az adott csapdákon nem halad keresztül folyadék, így az előzőekben látottakhoz képest változik a rendszer teljes áramlási képe. Az is megfigyelhető, hogy míg az eddigiekben a sorba rendezett csapdák és a csatorna fala között, illetve a szűkületeknél gyorsult csak föl az áramlás, addig ebben az esetben a csapdákból kilógó baktériumok végeinél is megjelennek kicsit nagyobb sebességek. Ezek az akadály miatt feltorlódó folyadékból adódnak.



15. ábra: Az áramlás megváltozása a modellbaktériumok behelyezése után. (A) A 3. csapdarendszer egy részlete, ahol a szimuláció a csatorna minden pontjában megadja az áramlási sebesség értékeit. (B) Az (A) ábrának egy nagyított részlete, itt áramvonalak szemléltetik a folyadék áramlását.

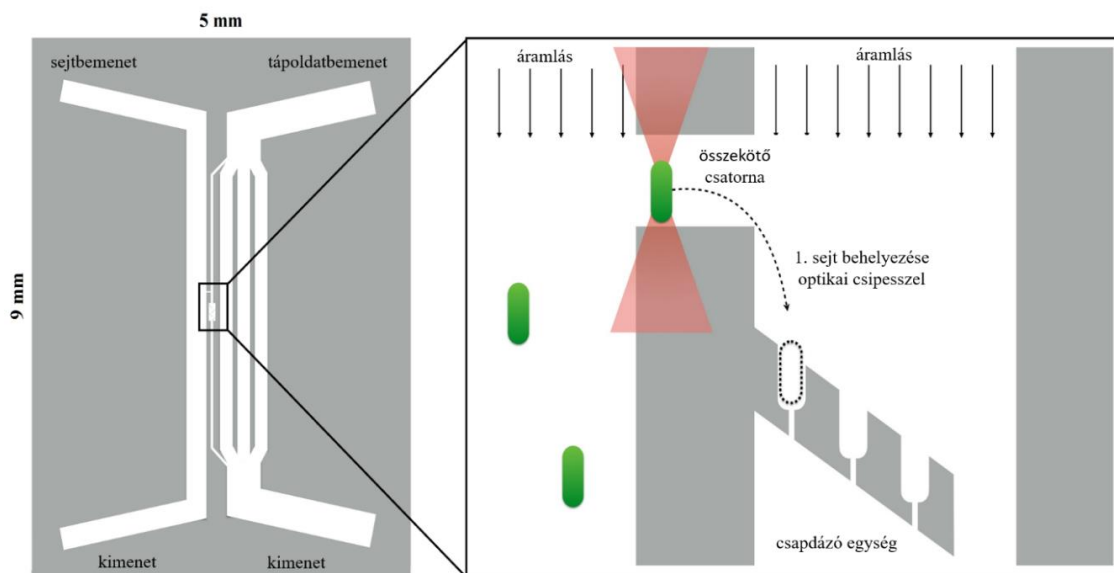
A baktériumok életben maradásának szempontjából nem elhanyagolható, hogy a folyadék áramlásából fakadóan mekkora a rájuk ható nyírófeszültség. Az irodalomban már olvashatunk ehhez kapcsolódó kísérletekről. Lange és munkatársai különböző sejtek életben maradását vizsgálták változó nyírófeszültség-értékek mellett (Lange, 2001). *E. coli* esetében azt kapták, hogy 60 ms-on keresztül, az alkalmazott legkisebb nyírófeszültség mellett, amely 450 Pa volt, a sejtek nagyjából 100%-a maradt életben.

Összehasonlítás céljából készítettem egy olyan szimulációt is, amely a berendezés minden pontján megmutatja a nyírófeszültség nagyságát (16. ábra). Eredményül azt kaptam, hogy az általam választott csapdaelrendezésben $50 \mu\text{m/s}$ beállított áramlási sebesség esetében a nyírófeszültségek értéke 1-5 Pa.



16. ábra: Csapdarendszerben fellépő nyírófeszültségek

A „Baby Machine” mikrofluidikai platform lelke a fentebb részletesen bemutatott csapdarendszer lesz, ami egy több csatornából álló hálózat egyik elemét képviseli csupán. Mivel a csapdarendszer magassága $1,2\ \mu\text{m}$, így a folyadékkal szemben nagy ellenállást tanúsít. A szimulációim során használt áramlási sebességeket a csoportban elérhető digitális pumpával sem tudjuk előállítani. Megoldásként azt találtuk ki, hogy a csapdázó részen kívül, azzal párhuzamosan (elektromos áramkörrel analóg módon) több „üres”, csak folyadékáramlást biztosító csatornát is csatlakoztatunk a rendszerhez a 17. ábrán látható módon. Ezeknek a csatornáknak az összkeresztmetszete $672\ \mu\text{m}^2$ ($3 \times 224\ \mu\text{m}^2$), magassága $15\ \mu\text{m}$. Ennek köszönhetően a bemeneti áramlási sebesség a csatornák keresztmetszetével arányosan csökkenni fog és számolásokat követően elérhető a kívánt sebességérték beállítása az adott térrészben. Emellett, terveztünk még egy oldalcsatornát, melyben a kísérlet elején a baktériumokat töltjük.



17. ábra: A „Baby Machine” elméleti elrendezése. A jobb oldalon a csapdázó egység felső része látható az összekötő csatornával, amelyen keresztül hozzuk be a kísérlethez szükséges anyasejtet.

Mint korábban említettem, a mikrofluidikai eszközt és az optikai csapdázást együttesen szeretnénk használni. A vizsgálni kívánt sejtet a csapdákat tartalmazó egységbe a

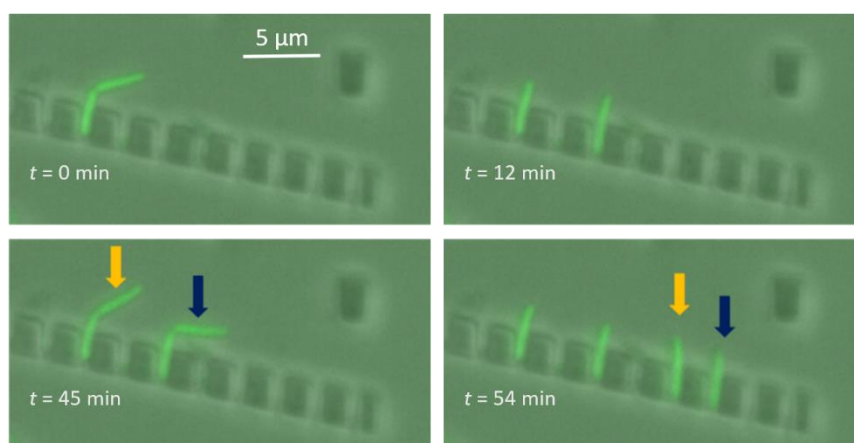
lézercsipesszel helyezzük majd el (17. ábra). Annak érdekében, hogy másik sejt ne tudjon beúszni a belső részbe, az első sejt behelyezése után meg kell növelni a tápoldat áramlási sebességét. A sejt elhelyezése után az eszközben folyamatos áramlást tartunk fent a kísérlet teljes időtartama alatt. Így a sejtek nem tudnak kiúszni a csapdákból, és az osztódások után a leánysejtek a megfelelő irányba mozdulnak és „beülnek” egy csapdába. Szintén ez a folyamatos áramlás biztosítja az osztódáshoz szükséges állandó tápanyag-utánpótlást.

5.3.2 *E. coli* baktériumok a „Baby Machine” eszközben

A 17. ábrán bemutatott mikrofluidikai elrendezést – melynek fontos része az általam megtervezett csapdázó egység – a kutatócsoport munkatársai (Kelemen Lóránd, Ábrahám Ágnes) elkészítették, majd ki is próbáltuk azt *E. coli* baktériumokkal. Az eszköz PDMS-ből készült, amit egy fedőlemezhez ragasztunk hozzá oxigénplazmázással.

Azt tapasztaltuk, hogy a PDMS eszköz csatornáin belül 3-4 W-os lézerteljesítmény esetén ideális a csapda erőssége ahhoz, hogy stabilan tudjuk mozgatni a sejteket. Nagyobb lézerteljesítmény esetén ugyan nagyobb sebességgel mozgatható a megfogott baktérium, de gyorsabban el is pusztul (5.2.1 fejezet). Ehhez a teljesítményhez a 10.B ábra alapján 70-90 pN/μm körüli csapdaállandó tartozik, és a sejtek ~40-60 s-ig maradnak életben az optikai csapdában (12.B ábra alapján).

Az első próbálkozások során azt tapasztaltuk, hogy a rendszer nagyon érzékeny már kismértékű ingadozásokra is az áramlásban. A sejt megfogása és a csapdázó egységbe történő behelyezése elég nagy kihívás. Emellett elég könnyen szöknek át a sejtek az átvezető csatornán. Ugyanakkor amennyiben sikerül egy sejtet befogni a kehely alakú mikrostruktúrába, a csapdarendszer ígéretesen működik. A 18. ábra egy, a csapdázó egységben megfogott és osztódó *E. coli* baktériumról készült mikroszkópos felvételeket mutat. A baktérium osztódását pár órán keresztül követtük nyomon. A sejtek növekednek és osztódnak a csipben. Az *E. coli* sejtek 30 °C-on kb. 40 percenként osztódnak, ez teljesült az eszközben is. A 18. ábrán két osztódás is végbement, mindkét esetben sikerült begyűjteni a leánysejteket.



18. ábra: *E. coli* baktériumok osztódása „Baby Machine” eszközben

6. Összegzés

Munkámat az SZBK Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoportban végeztem. Egy olyan mikrofluidikai platform kidolgozásában vettem részt, mely a későbbiekben alkalmas lehet a bakteriális heterogenitás vizsgálatára. A megalkotott rendszer segítségével szeretnénk tanulmányozni egyetlen baktériumsejtből osztódással kialakult populáció egyedi sejtjeinek fenotípusbeli különbségeit. Az általunk „Baby Machine”-nak keresztelt eszköz a mikrofluidika mellett az optikai csipesz használatán alapul.

A projektben a fő feladatom az volt, hogy megtervezem és modellezem az eszköz egyedi sejtek csapdázására alkalmas részét, illetve az optikai csipeszt kalibráljam ezekhez a kísérletekhez.

Első lépésként sikeresen kalibráltam a laborban található lézercsipeszt néhány mikrométer átmérőjű gyöngyök és elpusztult baktériumok csapdázásával. Megmértem azt is, hogy az általam használt *E. coli* sejtek mennyi időn keresztül maradnak életképesek a lézercsipeszben. Ehhez a csapdázott sejt mozgását tanulmányoztam.

A csatornarendszer kialakításához számítógépes terveket készítettem. Három különböző csapdarendszert rajzoltam. Ezután háromdimenziós szimulációkat futtattam rajtuk, hogy meg tudjuk figyelni, különböző elrendezésekben hogyan változik a folyadék áramlása. Azért, hogy még valóságosabb legyen az elrendezés, modellbaktériumokat is elhelyeztem a csapdában.

A szimulációs eredményeim alapján kiválasztottam a legígéretesebbnek tűnő elrendezést, melyet az intézet munkatársai elkészítettek számomra. A kész eszközt *E. coli* baktériumokkal teszteltük. Habár az általunk tervezett eszköz jelenlegi formájában még közel sem tökéletes, már most ígéretesnek tűnik a bakteriális heterogenitás vizsgálatára különböző környezeti feltételek mellett.

7. További terveim

Az elkövetkezendő időszakban szeretném a munkám során kialakított eszközt tovább fejleszteni, amennyiben szükséges újakat is tervezni. A „Baby Machine” használata a jelenlegi formájában elég körülményes. A megfelelő áramlásokat nehéz beállítani, a sejtek nem mindig a soron következő egysejt csapdába esnek bele vagy éppen a csapdázó egységbe a nagy áramlások ellenére is beúsznak újabb sejtek.

Szeretnék további méréseket végezni arra vonatkozóan is, hogy hogyan lehetne a baktériumsejtek optikai csipesszel való csapdázásakor hosszabb életidőket elérni. Erre több megoldás is kínálkozik. Az egyik, hogy a csapdázó oldathoz egy két enzimből (glükóz oxidáz és kataláz) álló keveréket adunk. Ez egy bevált módszer arra, hogy lassítsa a sejtek fény okozta károsodását. Egy másik felmerült ötlet, hogy a sejtet egyszerre több ponton csapdázzuk, amire az SLM segítségével lehetőségünk van. A két ponton történő csapdázást már ki is próbáltuk (lásd 3.A ábrán).

A fent leírt vizsgálatok eredményei más, a kutatócsoportban jelenleg is folyamatban levő kutatásban is hasznosak lehetnek. A csoportban aktívan dolgoznak egy, a flagellamozgás vizsgálatára alkalmas képalkotó rendszer fejlesztésén. Ezekhez a kísérletekhez szintén szükséges a baktériumok két ponton történő optikai csapdázása, vagy mikrostruktúrák általi csapdázása. Az ezekhez a vizsgálatokhoz szükséges flagellafestést is szeretném majd elsajátítani.

Irodalomjegyzék

Ábrahám Á. (2016): Holografikus lézercsipessel csapdázott mikroszkopikus részecskék és baktériumok mozgásának vizsgálata (diplomamunka), Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Ashkin A. (1997): Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Physics, 94, 4853–4860

Balaban N. Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. (2004): Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch, *Science*, 305, 5690, 1622-1625

Bashir F., Kovács S., Ábrahám Á., Nagy K., Ayaydin F., Valkony-Kelemen I. és munkatársaik (2022): Viable protoplast formation of the coral endosymbiont alga *Symbiodinium* spp. in a microfluidics platform, *Lab on a Chip*, 22, 2986-2999

Berg H. C: *E. coli* in motion, 2004, Springer-Verlag, Inc., New York, USA

Brock T. D., Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.: Brock biology of microorganisms, 2012, Pearson Education, Inc. San Francisco, USA

Bustamante C.J., Chemla Y. R., Liu S., Wang M. D. (2021): Optical tweezers in single-molecule biophysics, *Nature Reviews Methods Primers*, 1, 25

dreamstime, 2022: <https://www.dreamstime.com/escherichia-coli-structure-diagram-escherichia-coli-bacteria-structure-diagram-vector-illustration-e-coli-info-graphic-image139115644>
a linken található ábra alapján készült, 2022. 11. 13.

Galajda P. (2002): Mikroszkopikus testek orientációja és forgása lézercsipeszben (doktori értekezés), MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged

Galajda P. és Varjú K. (2019): OPTIKAI CSIPESZ ÉS NAGY ENERGIAJÚ ULTRAGYORS LÉZERIMPULZUSOK: A 2018. ÉVI FIZIKAI NOBEL-DÍJAKRÓL, *Magyar Tudomány*, 180, 904–911

Hol F. J. H. és Dekker C. (2014): Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria, *Science*, 346, 438-448

Lange H., Taillandier P., Riba J-P. (2001): Effect of high shear stress on microbial viability, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 501-505

Leitz G., Schnepf E., Greulich K. O. (1995): Mikromanipulation of statoliths in gravity-sensing Chara rhizoids by optical tweezers, *Planta*, 197, 278-288

Miller B. M., Bassler B. L. (2001): Quorum sensing in bacteria, *Annual Reviews of Microbiology*, 55, 165-199

nuclear-power, 2022: <https://www.nuclear-power.com/nuclear-engineering/fluid-dynamics/reynolds-number/> 2022. 11. 13.

Pilát Z., Bernatová S., Ježek J., Kirchhoff J., Tannert A., Neugebauer U., és munkatársaik (2018): Microfluidic Cultivation and Laser Tweezers Raman Spectroscopy of *E. coli* under Antibiotic Stress, *Sensors*, 18, 1623

Ren K., Zhou J., Wu H. (2013): Materials for microfluidic chip fabrication, *Accounts of Chemical Research*, 46, 2396-2406

Rose M., Hogan H.: https://www.photonics.com/Articles/A_History_of_the_Laser_1960_-_2019/a42279; 2022. 11. 13.

Széles E., Nagy K., Ábrahám Á., Kovács S., Podmaniczki A., Nagy V. és munkatársaik (2022): Microfluidic Platforms Designed for Morphological and Photosynthetic Investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a Single-Cell Level, *Cells*, 2022, 11, 285

Velicer G. J. és Stredwick K. L. (2002): Experimental social evolution with *Myxococcus xanthus*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 155-164

Vizsnyiczai G. (2019): A két-fotonos polimerizáció és a holografikus optikai csipesz alkalmazásának és technikájának kölcsönös kiterjesztése (doktori értekezés), Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Vizsnyiczai G., Búzás A., Aekbote B. L., Fekete T., Grexa I., Ormos P., Kelemen L. (2020): Multiview microscopy of single cells through microstructure-based indirect optical manipulation, *Biomedical Optics Express*, 11, 945-962

Wang P., Robert L., Pelletier J., Dang W. L., Taddei F., Wright A., Jun S. (2010): Robust Growth of *Escherichia coli*, *Current Biology*, 20, 1099-1103

Whitesides G. M. (2006): The origins and the future of microfluidics, *Nature*, 442, 27

Wu F. és Dekker C. (2016): Nanofabricated structures and microfluidic devices for bacteria: from techniques to biology, *Chemical Society Reviews*, 45, 268-280

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Galajda Péternek, az SZBK tudományos főmunkatársának, hogy én is részese lehettem a kutatócsoportjában zajló munkának.

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Nagy Krisztina és Dr. Vizsnyiczai Gaszton tudományos munkatársaknak, hogy kitartásukkal és tanácsaikkal segítették kutatói munkám sikerességét. Külön köszönöm Dr Vizsnyiczai Gasztonnak a mérések kiértékelése során nyújtott rengeteg segítségét.

Hatalmas hálával tartozom Dr. Nagy Krisztinának és Ábrahám Ágnesnek, hogy bevezettek a laboratóriumi munkavégzés világába és mindvégig hatalmas türelemmel és segítőkészséggel támogattak.

Hálás vagyok továbbá Dr. Kelemen Lóránd tudományos munkatársnak a mikrofluidikai eszköz öntőformájának elkészítéséért és Dér Lászlónak az értékes tanácsaiért és a szimulációkban nyújtott segítségéért.