

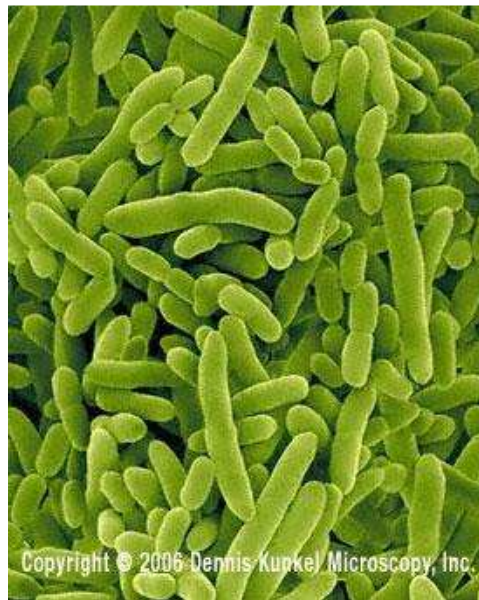
Biomérnöki műveletek és folyamatok II. gyakorlat

Biomérnök BSc 3. évf. hallgatók számára

A gyakorlat célja, hogy a hallgatók megismerjék az alapvető fermentációs technikákat, mint pl. az inokulum készítés, sterilizálás, fermentor leoltása inokulummal, mintavétel stb. Cél továbbá a mikroorganizmusok szaporodásának nyomonkövetése optikai denzitás méréssel. A kapott eredményekből növekedési görbét kell készíteni.

A gyakorlat során *Pseudomonas putida* baktérium fajt tenyésztünk 5 l térfogatú fermentorban (Zentai).

A *Pseudomonas* baktérium genus számos tagja a bioremediáció kulcsmikrobáinak tekinthető: képesek metabolizálni a környezet számos kémiai szennyezőjét (pl. gázolaj, festékek). A *Pseudomonas putida* F1 Gram-negatív, aerob, talajlakó, szaprotróf baktérium. A szakirodalom alapján a *P. putida* F1 az egyik legjobban tanulmányozott, szénhidrogéneket és azok származékait bontó faj; képes ezen vegyületeket oxidálni, szénforrásként felhasználni növekedéséhez. A talajban és a vizekben előforduló monoaromás szénhidrogének (benzol, toluol, etil-benzol, xilolok), ill. a halogénezett szénhidrogének (triklór-etilén, TCE) degradációjában jelentős szerepet játszik.



Pseudomonas putida elektronmikroszkópos képe a bacilluszokra jellemző pálcás alakkal.

Feladatok, napokra lebontva:

1. nap: táptalaj készítés, sterilizálás, inokulum leoltása
2. nap: a fermentor leoltása inokulummal, mintavétel óránként
3. nap: a fermentáció leállítás, fermentor mosása.

1. nap:

Táptalaj készítés: A *Pseudomonas putida* tenyésztéséhez az ún. BSM (Basalt Salt Medium) táptalajt használjuk.

Az inokulumhoz 2x150 ml táptalajt készítünk, amit 2 db 500 ml-s erlenmeyer lombikba öntünk. A fermentációhoz pedig 4,7 l BSM táptalajt kell összemérni. Mivel ez a fermentáció hajlamos a habzásra, az inokulum és a főfermentáció táptalajához is habgátlót kell adagolni sterilizálás előtt.

A BSM táptalaj összetétele:

Anyag	g / l táptalaj
pepton	1
K ₂ HPO ₄	3,4
KH ₂ PO ₄	4,3
KNO ₃	0,8
MgCl × 6 H ₂ O	0,34
Nyomelem oldat	1 ml/l

A nyomelem oldat összetétele: pH= 7,2

Anyag	g / l
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	5
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	5
MnSO ₄ × H ₂ O	5
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	5
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,1
Na ₂ B ₄ O ₇ × 10 H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,1

Inokulum sterilizáció: Az inokulum táptalajt certoklávban sterilizáljuk. Sterilizálás után nyomelemoldatot adunk hozzá. (A nyomelem oldatot szűrővel előre sterilizáljuk).

A certoklávban az inokulummal egyidőben sterilizálni kell a leoltólombikot is.

Inokulum leoltása: Petri csészén kinőtt szilárd táptalajú tenyészetből kacsával oltjuk le a táptalajt. Rázógépbe tesszük, ahol 28 °C-n, 200 rpm-l 1 éjszakán át rázatjuk.

Fermentor sterilizáció: a fermentorba beleöntjük a 4,7 l BSM táptalajt + habgátlót, majd összeszerelés után autoklávban sterilizáljuk.

2. nap:

Fermentor leoltása inokulummal: A fermentorokat kivesszük az autoklávból, a szükséges szereléseket, beállításokat elvégezzük.

Az inokulum a rázógépben egy éjszaka alatt kellő sejtsűrűséget ér el ahhoz, hogy le lehessen oltani vele a fermentort. Az inokulum átöntését a leoltólombikokba steril körülmények között végezzük, lamináris box alatt. A leoltólombikba öntjük az inokulumot, s hozzáadjuk a steril nyomelem oldatot. A leoltólombik tartalmát a leoltó csonkon át a fermentorba juttatjuk (közben a levegőt el kell zárni!).

A fermentáció elindult. Meg kell győződni a paraméterek beállításának helyességéről (pH 7.0, hőmérséklet 28 °C, kevertetés 300 rpm, beáramló levegő mennyisége 100 l/h).

A 0 h-s mintavételt most kell elvégezni. A fermentor alján található mintavevő csonkon át történik majd a mintavétel. Mivel a baktériumok generációs ideje rövid, (kb 30 perc) ezért óránként kell mintát venni a növekedés nyomonkövetéséhez. Az optikai denzitás méréshez a kultúrából óránként mintát veszünk. Ennek mérjük az abszorbanciáját 600 nm-en, így jutunk az OD₆₀₀ értékehez. Ha az abszorbancia érték meghaladta az 1.0-t, a mintát úgy kell hígítani, hogy az OD₆₀₀ értéke 0 és 1 közé essen (pl. 2x, 5x, 10x-re hígítani).

3. nap:

A pénteki, 3. napon leállítjuk a fermentációt. A fermentort szét kell szerelni és elmosni.

A jegyzőkönyv tartalmazza a gyakorlat leírását s a növekedési görbét. A növekedési görbén az OD 600 értékeket kell feltüntetni (figyelembe véve a hígításokat) az idő függvényében. A jegyzőkönyvet a gyakorlat utáni héten kell leadni (legkésőbb pénteken). (D 110 szoba v D 207 labor).