



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 396 999 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 750/86

(51) Int.Cl.⁵ : **G01N 21/59**

(22) Anmeldetag: 20. 3.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1993

(45) Ausgabetag: 25. 1.1994

(30) Priorität:

8. 5.1985 DE 3516529 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

AT-PS 267218 AT-PS 345018 US-PS1937722

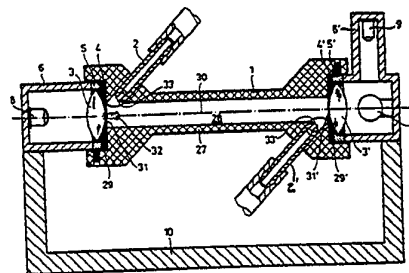
(73) Patentinhaber:

GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN- UND UMWELTFORSCHUNG
MBH, MÜNCHEN
D-8042 NEUHERBERG (DE).

(54) ANLAGE ZUR TURBIDIMETRISCHEN MESSUNG UND REGELUNG VON MIKROORGANISMEN

(57) Die Erfindung betrifft eine Anlage zur turbidimetrischen Messung und Regelung von Mikroorganismen wie Zell-, Bakterien-, Hefe- und/oder Algenkulturen in wäßrigem Medium unter Verwendung einer Meßzelle nach dem Prinzip einer Durchflußmeßzelle, wobei die Meßzelle einen langgestreckten Kanal aufweist, an dessen Stirnseiten optische, den Kanal abschließende Elemente angeordnet sind, durch die ein Meßstrahl entlang der Achse des Kanals von einer Lichtquelle zu einem Detektor gerichtet wird. Zur Verbesserung der Anlage wird vorgeschlagen, daß

- a) sowohl die Zuleitung als auch die Ableitung (2, 2') für das Medium in bzw. aus dem Kanal (28) in geringem Abstand vor den optischen Elementen (3, 3') und derart im Winkel zur Achse (30) des Kanals (28) ausgerichtet sind, daß die Zentralbereiche (31, 31') der optischen Elemente (3, 3') kontinuierlich vom Medium anströmbar sind,
- b) die Öffnungen (33, 33') der Zu- und Ableitungen (2, 2') zum Kanal (28) als Düsen ausgebildet sind und
- c) die optischen Elemente (3, 3') Sammellinsen sind.



AT 396 999 B

Die Erfindung betrifft eine Anlage zur turbidimetrischen Messung und Regelung von Mikroorganismen wie Zell-, Bakterien-, Hefe- und/oder Algenkulturen in wäßrigem Medium unter Verwendung einer Meßzelle nach dem Prinzip einer Durchflußmeßzelle, wobei die Meßzelle einen langgestreckten Kanal aufweist, an dessen Stirnseiten optische, den Kanal abschließende Elemente angeordnet sind, durch die ein Meßstrahl entlang der Achse des Kanals von einer Lichtquelle zu einem Detektor gerichtet wird.

Zur Bestimmung der Zell- bzw. Individuendichte in Zell-, Bakterien-, Hefe- und Algenkulturen in wäßriger Kulturlösung sind mehrere photometrische, insbesondere turbidimetrische Verfahren verwendbar. Bei Laborkulturen von großem Volumen ist hierfür im allgemeinen die Entnahme einer Probe mit Überführung in ein Meßgefäß erforderlich.

Dies kann zu erheblichen Störungen führen, insbesondere dann, wenn die Kultur unter sterilen und/oder anaeroben Bedingungen gehalten werden muß. Die kontinuierliche Überleitung in handelsübliche Photometer mit Durchflußküvetten wäre mit langen Wegen verbunden, und mit erheblichen Aufwuchsproblemen behaftet.

Sollen die Kulturen trotzdem in kontinuierlichem Betrieb bei konstanter Zell-/Individuenzahl gehalten werden, ist dies möglich, indem permanent mit einer entsprechenden Menge der zuzugebenden Nährlösung verdünnt wird (sog. Chemostatbetrieb). Hierfür ist es bisher erforderlich, die entsprechende Nährlösungsmenge aus den Wachstumskurven der Individuen und deren Nährstoffbedarf zu errechnen. Diese Nährlösungsmenge wird dann kontinuierlich, z. B. mit Schlauchpumpen zugegeben. Der Förderstrom ist dabei konstant. Dadurch können bereits geringfügige Störungen im Pumpen- und/oder Thermostatisierungsbereich oder Veränderungen der Belichtung zu erheblichen Veränderungen der Individuenzahlen führen.

Dies macht eine ständige Kontrolle mit häufigen manuellen Korrekturen der Wachstumsfaktoren erforderlich.

Bei den bisherigen Meßverfahren wird ein mehr oder weniger durchmischter Teil des Gesamtvolumens in einer Momentmessung bestimmt. Zur Vermeidung von Fehlern, die z. B. aus lokalen Konzentrationsunterschieden herrühren können, sind i. d. R. Mehrfachmessungen und Parallelproben erforderlich.

Die der Erfindung gestellte Aufgabe besteht darin, eine Anlage zu bieten, mit der eine kontinuierliche, automatische und von Veränderungen der Außenbedingungen unabhängige Steuerung von Chemostatkulturen und darüber hinaus auch eine empfindliche Messung und Aufzeichnung, unabhängig von Veränderungen durch Mikroorganismenbewuchs, ermöglicht wird.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß

- a) sowohl die Zuleitung als auch die Ableitung für das Medium in bzw. aus dem Kanal in geringem Abstand vor den optischen Elementen und derart im Winkel zur Achse des Kanals ausgerichtet sind, daß die Zentralbereiche der optischen Elemente kontinuierlich vom Medium anströmbar sind,
- b) die Öffnungen der Zu- und Ableitungen zum Kanal als Düsen ausgebildet sind und
- c) die optischen Elemente Sammellinsen sind.

Die übrigen Ansprüche 2 bis 4 haben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung zum Gegenstand.

Es handelt sich somit bei der Erfindung um eine Anlage aus mehreren, örtlich getrennt arbeitenden Komponenten, die die permanente turbidimetrische Messung von Zell-, Bakterien-, Hefe- und Algenkulturen in wäßrigem Nährmedium bei vollkommen geschlossenem Kultursystem erlaubt. Sie gestattet neben der Ablesung der momentanen Kulturdichte auch die kontinuierliche Registrierung des Verlaufs der Wachstumskurven und die Überwachung aller für die Kultur notwendigen Betriebsabläufe mittels der Meßzelle. Die Messung erfolgt nicht als Momentmessung, sondern in einer Durchflußzelle während eines wählbaren Zeitintervalls, wobei der ermittelte Meßwert über das Zeitintervall integriert wird. Lokale Konzentrationsunterschiede in der Kulturlösung stören folglich nicht.

Die Regelfunktion wird zunächst dadurch erfüllt, daß die Anlage die Zudosierung wählbarer Mengen von Nährlösung in wählbarem Zeitabstand steuert. Durch wählbare Schwellwerte der Zell-/Individuendichte kann das System darüber hinaus nach jeder Messung eine gesteigerte Verdünnung der Kultur oder ein Aussetzen der Nährlösungsversorgung bewirken. Damit wird es möglich, eine Chemostatkultur allein nach ihrer momentan realen Dichte unabhängig von schwankenden Umgebungsbedingungen und ohne manuelle Eingriffe konstant zu halten.

Je nach Aufgabenstellung läßt sich die Häufigkeit der Meßzyklen in weitem Bereich variieren. Je häufiger die Messungen ausgelöst werden, umso größer ist die Auflösung der aufzuzeichnenden Wachstumskurven. Dadurch kann die Anlage neben der Regelung und Überwachung konstanter Chemostatkulturen auch andernorts Wachstumskurven z. B. von Algen mit höchster Genauigkeit und Präzision vollautomatisch aufzeichnen. Da das Meßsystem mit dem Kulturgefäß eine geschlossene Einheit bildet, alle vom Kulturmedium benetzten Geräteteile jedoch leicht von den elektrischen Einheiten zu trennen sind, ist eine Sterilisierung auch im Autoklaven problemlos. Darüber hinaus ist das System dadurch auch besonders für anaerobe Arbeiten geeignet.

Die Ausgestaltung der einzelnen Anlagenelemente erlaubt den Aufbau von Kulturanlagen mit kürzesten Wegen für den Transfer der Probenlösung zum Meßsystem.

Äußerst vorteilhaft ist auch die Anordnung von Meßsystem und zuführenden Nährlösungskanälen, die eine permanente Selbstreinigung aller mit der Kulturlösung benetzten Teile erzwingt, wodurch Aufwuchsprobleme ausgeschaltet werden.

Die Erfindung stellt ein kompaktes, kostengünstiges und einfach zu handhabende Anlagensystem dar, das neben den o. g. Eigenschaften die Möglichkeit bietet, eine Mikroorganismenkultur nach dem Animpfen ohne weitere Manipulationen bis zu einem vorwählbaren Dichtegrad anwachsen zu lassen und diesen Zustand weitgehend unabhängig von äußeren Schwankungen und Störungen über beliebig lange Zeit aufrecht zu erhalten, wobei alle Meßwerte und Betriebsabläufe protokolliert werden können.

Darüber hinaus ist das Meßsystem auch für die ausschließliche Messung von Kulturen und anderen Flüssigkeiten ohne Regelaufgaben geeignet, wobei die Vorteile der Meßzellenanordnung ja gerade bei wiederholten Messungen über längere Zeiträume zum Tragen kommen, z. B. für die Aufzeichnung von Wachstumskurven. Dabei kann das Meßsystem mit beliebigen Gefäßen kombiniert werden. Voraussetzung ist lediglich die Bereitstellung eines Gases, mit dem ein geringfügiger Überdruck aufgebaut werden kann, nicht jedoch die kontinuierliche Zufuhr von Nährlösung. Auch ist es in der Lage, die Messungen für die Regelung konstanter, insbesondere steriler Kulturen durchzuführen zu können.

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels mittels der Fig. 1 und 2 näher dargestellt.

Fig. 1 zeigt hierbei einen Schnitt durch eine Meßzelle und

Fig. 2 eine Ansicht der technischen Anlage.

Die Durchflußmeßzelle (1) nach Fig. 1 besteht im wesentlichen aus einem langgestreckten Zylindergehäuse (27) mit einem coaxial geführten Kanal (28) und verdickten Stirnseiten (29), (29'). Die Kanalachse (30) bildet zugleich die optische Achse des Meßsystems.

An die Stirnseiten (29), (29') werden mittels der beiden Arme eines C-förmig ausgebildeten Trägers (10) die Gehäuse (6), (6') für den Detektor (8) bzw. die Lichtquelle (7), einschließlich dem Referenz-Empfangelement (9), gegen die Linsenhalter (5), (5') angepreßt und in deren Aufnahmebohrungen zentriert. Die Öffnungen des Kanals (28) werden von Linsen (3) bzw. (3') einschließlich deren Linsenhaltern (5), (5') verschlossen. Die Dichtungsringe (4), (4') sind derart ausgebildet bzw. ausgerichtet, daß sie Zentralbereiche (31), (31') der Sammellinsen (3), (3') freilassen, durch die der Meßstrahl (32) hindurch- bzw. eintritt.

Die Zu- und Ableitungen (2'), (2) für die Medien sind bezüglich der Kanalachse (30) im Winkel derart am Gehäuse (27) bzw. der Meßzelle (1) angeordnet, daß ihre Austrittsöffnungen (33), (33') auf diese Zentralbereiche (31), (31') ausgerichtet sind. Zusätzlich sind sie als Düsen ausgebildet, so daß ein gezielter Mediumstrahl auf die Linse (3') gerichtet bzw. ein scharfer Strömungswirbel an der Linse (3) erzeugbar ist. Diese Strömungen verhindern den Bewuchs der Zentralbereiche (31), (31'), so daß von dieser Seite her keine Verfälschungen des Meßstrahls (32) entstehen.

Die Strömungsgeschwindigkeit des Probemediums innerhalb der Meßzelle (1) kann durch Querschnittsverengung erhöht und durch die düsenartige Ausbildung der Zuflußkanäle (2), (2') eine direkte Anströmung der optischen Fenster im Binnenraum der Zelle erzielt werden. Der gemessene Lichtwert wird über eine vorwählbare Zeitdauer integriert, wobei die Probe während des gesamten Integrationsintervalls die Meßzelle (1) durchströmt. Die Häufigkeit der Meßperiode ist in einem Zeitbereich zwischen 1 und 300 Minuten vorwählbar. Durch die Wahl des spektralen Bereichs der Lichtquelle (7) ist bei der Messung pflanzlicher Zellen eine Chlorophyll-abhängige oder -unabhängige Methode wählbar.

Die Fig. 2 zeigt die perspektive Ansicht der gesamten Anlage, wie sie mit den pneumatischen Elementen (hier ein Ausführungsbeispiel mit elektrischen Magnetventilen) auf einer gemeinsamen Trägerkonsole (12) in der Nähe des Kulturgefäßes (15) montiert sein kann. Alle Einzelteile, das Befestigungselement (11) für die Meßzelle (1), die Trägerkonsole (12), das Ausgleichsgefäß (13), die Zuflußöffnung (14) des Kulturgefäßes (15), das Kulturgefäß (15) selbst, das Ausgleichsventil (16), das Eingangsventil (17) und das Ausgangsventil (18) sowie der Zuflußsammel (19), die Zuflußleitung (20), die Ausgangsöffnung (21) des Kulturgefäßes (15), die Abflußleitung (22), die Bypaßleitung (23), das Zuflußrohr (24), die Ausgleichsöffnung (25) und das Luftfilter (26) sind auf dem gleichen Träger (12) befestigt.

Die vollständig montierte Durchflußmeßzelle (1 bis 5) mit den auf ihr abnehmbar befestigten Meßelementen (6 bis 10) ist in dem Befestigungselement (11) lösbar mit der Trägerkonsole (12) verbunden. Das Düsenrohr (2) ist mit einem Ausgleichsgefäß (13) verbunden, das gegenüberliegende Düsenrohr (2') mit der Zuflußöffnung (14) des Kulturgefäßes (15).

Weitere wesentliche Elemente sind die Ventile (16), (17) und (18), in diesem Ausführungsbeispiel als Magnetventile dargestellt. Das Eingangsventil (17) ist ein 3/2-Wege-Ventil. Bei normalem Kulturbetrieb wird der Zufluß von Gasen (z. B. Luft) und/oder Flüssigkeiten (z. B. Nährlösung) von einem Zuflußsammel (19) aufgenommen und vom Eingangsventil (17) über die Zuflußleitung (20) zum Ausgleichsgefäß (13) geleitet. Von dort aus passieren die zuströmenden Gase und Flüssigkeiten die Durchflußmeßzelle (1) und gelangen über das Düsenrohr (2') in das Kulturgefäß (15). Überschüssige Gas- und Flüssigkeitsmengen werden bei normalem Betrieb über die Ausgangsöffnung (21) des Kulturgefäßes (15) und das normalerweise offene Ausgangsventil (18) aus dem Kulturgefäß (15) zur Abflußleitung (22) geführt.

Für die Durchführung einer Meßphase werden die Ventilstellungen umgeschaltet:

Das Ausgangsventil (18) wird geschlossen und das Eingangsventil (17) führt den Gas- und/oder Flüssigkeitsstrom jetzt über die Bypaßleitung (23) zum Kulturgefäß (15). Schon bei geringfügigem Zufuhr-Überdruck wird das Kulturmedium durch das in die Flüssigkeit eintauchende Zuflußrohr (24) in die Durchflußzelle (1) zurückgedrückt. Dieser Vorgang wird unterstützt, indem das normalerweise geschlossene und mit der Ausgleichsöffnung (25) des Ausgleichsgefäßes (13) verbundene Ausgleichsventil (16) für eine bestimmte Zeit geöffnet wird. Das Kulturmedium kann die Durchflußmeßzelle (1) solange durchströmen und im Ausgleichsgefäß (13) aufsteigen, bis die integrierende Meßphase abgeschlossen ist. Eine Kontaminierung der Leitung durch Luftkeime kann durch ein Luftfilter (26) unterbunden werden.

Abschließend werden alle Ventile wieder in die Ausgangsstellung zurückgeschaltet. Das Kulturmedium aus dem Ausgleichsgefäß (13) wird wieder in das Kulturgefäß (15) zurückgeführt, wobei es erneut die Durchflußzelle (1) passiert. Durch die düsenförmige Ausbildung und den Anströmwinkel der Rohre (2), (2') werden die Glaslinsen (3), (3') der Durchflußmeßzelle (1) bei jedem Meßzyklus jeweils einmal in beiden Richtungen kräftig angeströmt und gespült.

Darüber hinaus wird im Falle der Zugabe von frischer Nährlösung diese stets über die Wände des Ausgleichsgefäßes (13) und durch die Durchflußmeßzelle (1) geleitet, so daß die Bildung von Ablagerungen auch hierdurch wirkungsvoll unterbunden wird.

Die gesamte Einheit aus Meßzelle (1), Ausgleichsgefäß (13) und verbindenden Kanälen bestehen ausschließlich aus wasser-, lösungsmittel- und insoweit temperaturbeständigen Materialien, daß diese gesamte Einheit bei ca. 135 °C autoklaviert werden kann. Ein nicht näher dargestelltes Meß- und Regelgerät nimmt die Ansteuerung von motorbetriebenen Hubkolbenpumpen (insbesondere Motor-Dispensetten), Membran- oder Schlauchpumpen in der Art vor, daß ein vorwählbares Volumen in vorwählbaren Zeitabständen als Minimal-Nährlösungszugabe kontinuierlich erfolgt. Der ermittelte Meßwert bis zum Beginn der folgenden Integrationsphase wird auf einem Display angezeigt. Das Meß- und Regelgerät bewirkt bei Über- oder Unterschreiten eines vorwählbaren Schwellwertes eine Erhöhung oder Aussetzung der Nährlösungszugabe. Durch die Anschlußmöglichkeit eines Mehrkanalschreibers, ist die kontinuierliche Aufzeichnung der Meßwerte, sowie der Pumpen- und Ventilaktivität möglich. Die Regelung der Belichtung der Kultur kann durch das Meß- und Regelgerät ebenfalls vorgenommen werden.

Neben der in Fig. 2 dargestellten Anordnung der Anlage mit pneumatischen Elementen kann die Anlage auch in einen geschlossenen Pumpenkreislauf eingegliedert werden, wobei die Pumpe bei jedem Meßzyklus oder kontinuierlich Kulturmedium der Meßzelle (1) zugeführt.

In diesem Fall führt die Ableitung direkt in das Kulturgefäß (15) zurück, um den Kreislauf zu schließen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Anlage zur turbidimetrischen Messung und Regelung von Mikroorganismen wie Zell-, Bakterien-, Hefe- und/oder Algenkulturen in wäßrigem Medium unter Verwendung einer Meßzelle nach dem Prinzip einer Durchflußmeßzelle, wobei die Meßzelle einen langgestreckten Kanal aufweist, an dessen Stirnseiten optische, den Kanal abschließende Elemente angeordnet sind, durch die ein Meßstrahl entlang der Achse des Kanals von einer Lichtquelle zu einem Detektor gerichtet wird, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) sowohl die Zuleitung als auch die Ableitung (2, 2') für das Medium in bzw. aus dem Kanal (28) in geringem Abstand vor den optischen Elementen (3, 3') und derart im Winkel zur Achse (30) des Kanals (28) ausgerichtet sind, daß die Zentralbereiche (31, 31') der optischen Elemente (3, 3') kontinuierlich vom Medium anströmbare sind,
- b) die Öffnungen (33, 33') der Zu- und Ableitungen (2, 2') zum Kanal (28) als Düsen ausgebildet sind und
- c) die optischen Elemente (3, 3') Sammellinsen sind.

2. Anlage nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßzelle (1) mit einem Ausgleichsbehälter (13), der über die Ableitung (2) mit der Meßzelle (1) verbunden ist, Schaltventilen (16 bis 18) und/oder einem Kulturgefäß (15), das mit der Meßzelle (1) über die Zuleitung (2') in Verbindung steht, wobei durch die Schaltventile (16 bis 18) Weg und Richtung des Mediums zwischen Meßzelle (1), Ausgleichsbehälter (13) und Kulturgefäß (15) steuerbar ist, an einer Trägerkonsole (12) befestigbar und somit gemeinsam autoklavierbar sind.

3. Anlage nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die die Lichtquelle (7) bzw. den Detektor (8) aufnehmenden Gehäuse (6, 6') auf einem gemeinsamen Träger (10) angeordnet und in Ausnehmungen an den Stirnseiten (29, 29') der Meßzelle (1) einrastbar sind.

- 5 4. Anlage nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Träger (10) federelastisch ausgebildet ist.

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

10

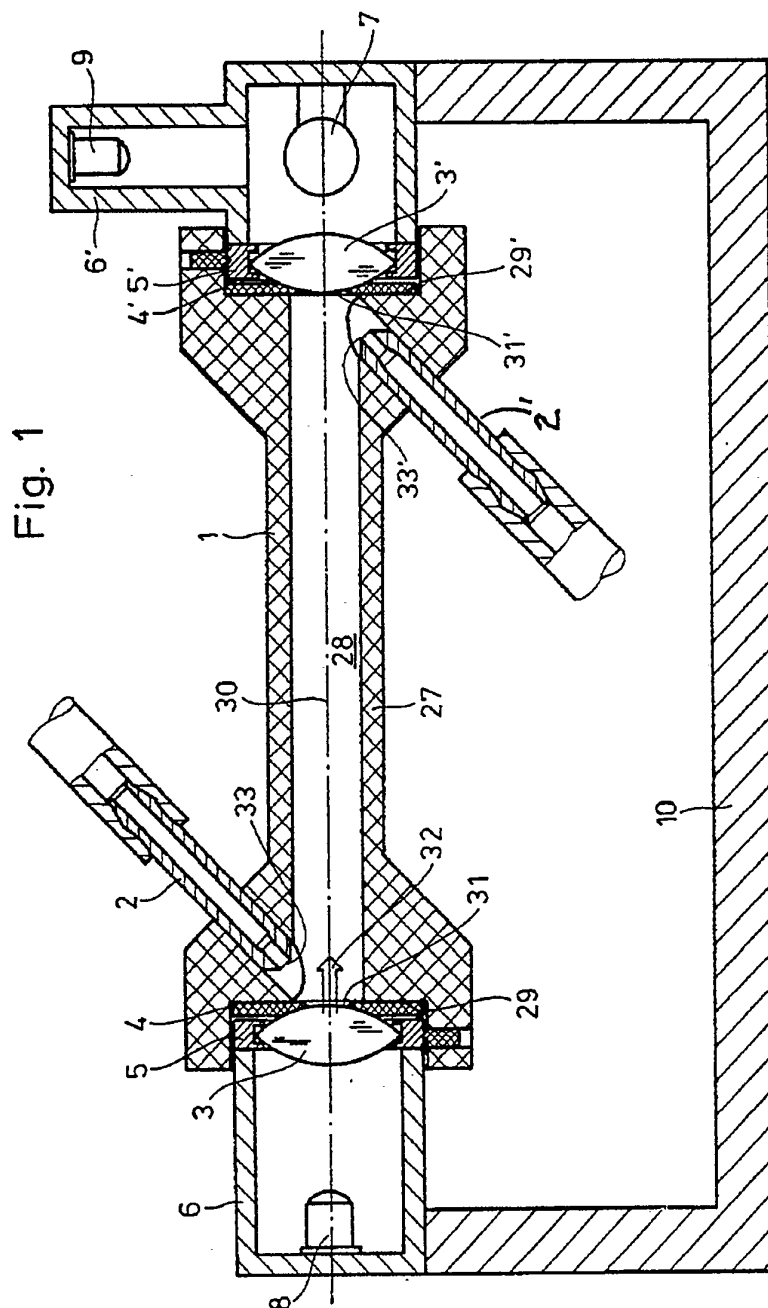


Fig. 2

