



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

245718

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 M 1/36

(22) Přihlášeno 13 07 81
(21) PV 5391-81

(89) 795 022, SU

(40) Zveřejněno 19 11 84

(45) Vydáno 15 07 87

(75)
Autor vynálezu

BOGDANOV KIRILL MICHAJLOVIČ; JANOVSKIJ KARL ABRAMOVIČ;
ŠICHER VLADIMÍR ISAJEVIČ, MOSKVA; SENICKIN VIKTOR VJACEŠLAVOVIČ,
KSTOVO; KARTAŠEV IVAN IVANOVIČ, KSTOVO; ZAJKINA ALEXANDRA IVANOVNA;
KOZLOV JURIJ GRIGORJEVIČ; PANTELEJEV BORIS PETROVIČ;
MARKELOV VJACEŠLAV ALEXEJEVIČ, MOSKVA (SU)

(54) Způsob měření obsahu mrtvých buněk v suspenzi kvasinek

Řešení se týká mikrobiologického průmyslu, způsob může být využit pro výrobu signálů korekce procesu v automatických systémech řízení ASR technických veličin.

Cílem řešení je zvýšení přesnosti a rychlosti měření obsahu parafinu, poměru mrtvých a živých kvasinek v suspenzi a množství lipidových příměsí v suspenzi kvasinek.

Měření se provádí umístěním jednovrstvého preparátu vzorku suspenze kvasinek do řádkovacího mikroskopu a metodou anoptální mikroskopie se měří funkce rozdělení amplitud jasu obrazu suspenze kvasinek a celé plochy pod ní; získaná funkce se rozdělí zejména na jednotlivé funkce amplitud jasu mrtvých buněk, parafinu v prostředí, živých buněk a lipidových příměsí v nich a poměrech plochy pod těmito funkcemi k celkové ploše se určí obsah měřených parametrů v suspenzi kvasinek.

Uvedený způsob je možno využít v různých odvětvích průmyslu, kde se využívají kultury kvasinek.

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может найти применение на заводах белково-витаминных концентратов, ферментов, антибиотиков, в частности, в производствах, связанных с культивированием микроорганизмов.

Известен способ измерения содержания мертвых клеток в дрожевой суспензии, предусматривающий размещение монослойного препарата в сканирующем микроскопе с последующим обчетом и вычислением определяемых параметров методом аноптральной микроскопии, при этом в отдельности для каждой из клеток измеряют функции распределения амплитуд яркостей цитоплазмы клеток, по которой рассчитывают дисперсию и асимметрию распределения амплитуд, причем мертвые клетки идентифицируют по отрицательным значениям асимметрии и меньшим значениям дисперсии, а затем определяют соотношение мертвых клеток к живым / I /.

Известный способ измерения содержания мертвых

клеток в дрожжевой суспензии не обеспечивает достаточной скорости и точности измерения.

Целью изобретения является повышение точности и скорости измерения.

Указанная цель достигается тем, что при осуществлении способа измерения содержания мертвых клеток в дрожжевой суспензии, предусматривающем размещение монослойного препарата в сканирующем микроскопе с последующим обходом и вычислением определяемых параметров методом аноптральной микроскопии, одновременно определяют содержание парафина и липидных включений, осуществляют сканирование всей пробы дрожжевой суспензии, определяют функцию распределения амплитуд яркостей и общую площадь под этой функцией, а содержание измеряемых параметров дрожжевой суспензии вычисляют по соотношениям площадей под функциями распределения амплитуд яркостей мертвых клеток, парафина и липидных включений к общей площади.

Способ осуществляют следующим образом.

Монослой пробы дрожжевой суспензии (в препарате или кювете), взятой из ферментера, анализируют в сканирующем световом микроскопе в аноптральном контрасте. Дрожжевые клетки в аноптральном контрасте выглядят светлыми на темном поле, капли парафина - несколько темнее, а мертвые клетки еще немного темнее. Липидные включения в клетках видны как более яркие пятна на фоне цитоплазмы.

На фиг. I показана типичная, экспериментально полученная функция распределения амплитуд (гистограмма) яркостей изображения дрожжевой суспензии при сканировании с шагом 0,5 мкм по осям X - Y (продольная и поперечная оси предметного столика микроскопа) и диаметром зонда 1 мкм (пятно считывания).

При сканировании отдельных фаз, то есть отдельно лежащих мертвых клеток, капель парафина, липидных вклю-

чений и живых клеток (сканировалась только их цитоплазма) получено, что в среднем (по 500 измерений) математические ожидания амплитуд яркостей соответственно равны:

$$m_{\text{мерт.}} = 20 + 25$$

$$m_{\text{параф.}} = 23 + 30$$

$$m_{\text{цитоп.}} = 25 + 35$$

$$m_{\text{липид.}} = 34 + 45,$$

а значение асимметрии всех фаз близко к нулю и равно $\pm 0,5$.

Таким образом, за счет различных средних значений и дополнительно за счет разброса относительно среднего диапазона амплитуды всех измеряемых фаз перекрываются.

Однако для произвольного вида изображений суммарную функцию распределения амплитуд яркостей изображения можно разделить на функции распределения отдельных фаз. Начинать расщепление суммарной функции распределения можно как с левой, так и с правой сторон этой функции, но результат будет точнее, если начинать расщепление с той стороны, где наблюдается более четко выделенная (то есть в меньшей степени смешанная с соседней фазой) фаза. Установлено, что для фазового анализа дрожжевой культуры предпочтительнее начинать расщепление с правой стороны суммарной функции распределения амплитуд. В левую сторону от точки экстремума или точки перегиба крайней правой фазы (липидных включений) откладываются ординаты симметричные относительно правой ветки, так как асимметрия всех фаз близка к нулю.

Из суммарной гистограммы вычитают ординаты выделенной фазы. Полученная после вычитания гистограмма обрабатывается аналогично исходной суммарной гистограмме и так далее пока не будет выделена последняя, расположенная с левой стороны, фаза.

Более точный результат можно получить, если отображать фазы не симметрично относительно правой ветви, а учесть значения асимметрии каждой из фаз, полученные предварительно по большой статистике при сканировании каждой из фаз в отдельности.

Процентное содержание каждой фазы определяют как отношение площади занимаемой фазой к площади выделенной фазы живых клеток.

Пример.

Многослойный препарат пробы дрожжевой суспензии (штамм ВСБ 569 Candida G), взятой из ферментера, помещают на предметный стол сканирующего микроскопа и сканируют, при шаге сканирования $n = 0,5$ мкм, диаметре зонда $d = 1$ мкм, числе отсчетов по осям X и Y $n_x = n_y = 256$. Общая гистограмма амплитуд яркостей изображения дрожжевой суспензии (за исключением фона, то есть культуральной жидкости) показана на фиг. 1. Соотношения площадей полученных по ней гистограмм каждой из фаз к площади общей гистограммы составляют: для мертвых клеток 2%, парафина в среде 7%, липидных включений 4%.

Среднеквадратическая ошибка измерения указанным способом процентного содержания мертвых клеток составляет 10%, парафина в среде и липидных включений в клетках 15%. Время измерения этих трех показателей даже при использовании механического сканирования и амплитудного анализатора составляет 5 - 10 минут.

Точность и быстроедействие данного способа позволяет устранить субъективность измерения, повысив точность до 10-15% и увеличив быстроедействие до 5-10 минут, что позволяет использовать полученные показатели дрожжевой суспензии для оптимизации АСУ процессом культивирования, то есть для увеличения количества и качества получаемой биомассы.

245718

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ измерения содержания мертвых клеток в дрожжевой суспензии, предусматривающий размещение монослойного препарата в сканирующем микроскопе с последующим обсчетом и вычислением определяемых параметров методом аноптральной микроскопии, отличающийся тем, что, с целью повышения точности и скорости измерения, одновременно определяют содержание парафина и липидных включений, осуществляют сканирование всей пробы дрожжевой суспензии, определяют функцию распределения амплитуд яркостей и общую площадь под этой функцией, а содержание измеряемых параметров дрожжевой суспензии вычисляют по соотношениям площадей под функциями распределения амплитуд яркостей мертвых клеток, парафина и липидных включений к общей площади.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе:

I. Авторское свидетельство СССР №
по заявке № 2638408/30-13, кл. С 12 К 1/00, 1978.
Изобретение в Госреестре не зарегистрировано.

А Н Н О Т А Ц И Я

Изобретение относится к микробиологической промышленности. Способ может быть использован для обработки сигналов коррекции процесса в АСУ ТП.

Целью изобретения является повышение точности и скорости измерения содержания парафина, соотношения мертвых и живых дрожжевых клеток в суспензии и количества липидных включений в дрожжевых клетках.

Измерение осуществляется помещением монослойного препарата пробы дрожжевой суспензии в сканирующий микроскоп и путем аноптральной микроскопии измеряют функцию распределения амплитуд яркостей изображения дрожжевой суспензии и общую площадь под ней; полученную функцию раскладывают на составляющие, в частности, функции распределения амплитуд яркостей мертвых клеток, парафина в среде, живых клеток и липидных включений в них и по соотношению площадей под этими функциями к общей площади определяют содержание измеряемых параметров дрожжевой суспензии.

Данный способ можно использовать в различных отраслях промышленности, где используется дрожжевая культура.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob měření obsahu mrtvých buněk v suspenzi kvasinek, sledováním rozmístění jednovrstvého preparátu v řádkovacím mikroskopu s následným odečtením a vyčíslením určených parametrů metodou anoptrální mikroskopie, vyznačující se tím, že za účelem zvýšení přesnosti a rychlosti měření se současně stanoví obsah parafinu i lipidových příměsí uskuteční se řádkování veškeré zkušební suspenze kvasinek, určí se funkce rozdělení amplitud jasu a celá plocha pod touto funkcí, a obsah naměřených parametrů suspenze kvasinek se vypočítá ze vzájemného poměru plochy pod funkcemi rozdělení amplitud jasu mrtvých buněk, parafinu a lipidových příměsí k celkové ploše.

Uznáno vynálezem na základě výsledků expertizy, provedené Státním výborem pro vynálezy a objevy SSSR, Moskva, SU.

1 výkres

