

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/27591 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 21/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/10030**

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Oktober 2000 (11.10.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 49 029.5 11. Oktober 1999 (11.10.1999) **DE**

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **BITTNER, Christoph [DE/DE]**; Auf der Hart
14, 33649 Bielefeld (DE).

(74) Anwalt: **STEINMEISTER, Helmut**; Artur-Lade-
beck-Strasse 51, 33617 Bielefeld (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,**
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,**
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

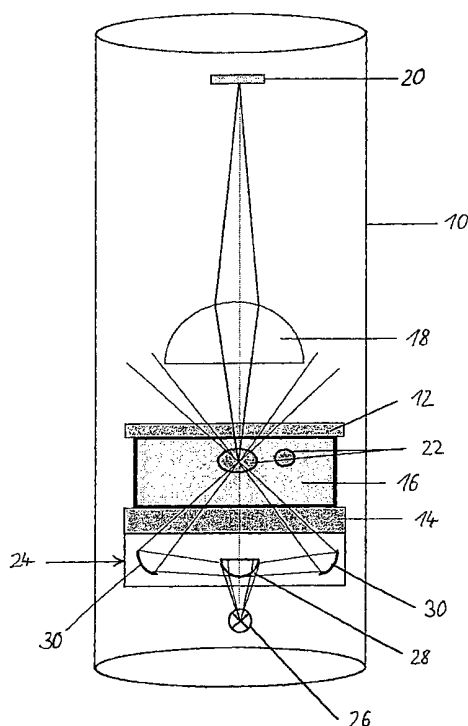
Veröffentlicht:

— *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: **METHOD AND DEVICE FOR CHARACTERIZING A CULTURE LIQUID**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG EINER KULTURFLÜSSIGKEIT**



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for characterizing a culture liquid, especially in a bioreactor. According to the inventive method, the cells (22) contained in the culture liquid are illuminated in situ, the cells (22) are microscopically imaged and the culture liquid is analyzed by evaluating the image. The illumination method used is the dark field illumination and the image evaluation comprises a comparison of the intensities of the light emitted by the core of the cell and that emitted by the cell border. Said comparison allows a differentiation between living and dead cells (22), thereby allowing an evaluation of the vitality of the culture liquid.

(57) **Zusammenfassung:** Bei einem Verfahren zur Charakterisierung einer Kulturflüssigkeit, insbesondere in einem Bioreaktor, wird in situ durch Beleuchtung der in der Kulturflüssigkeit enthaltenen Zellen (22), mikroskopische Abbildung der Zellen (22) und durch eine Bildauswertung der Abbildung die Kulturflüssigkeit analysiert. Die Beleuchtung wird als Dunkelfeldbeleuchtung durchgeführt, und die Bildauswertung umfaßt einen Vergleich der Intensitäten des vom Zellinneren und des vom Zellrand abgegebenen Lichtes, durch welchen Vergleich eine Unterscheidung lebender und toter Zellen (22) zur Bestimmung der Vitalität der Kulturflüssigkeit durchgeführt wird.

WO 01/27591 A2

VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG EINER KULTURFLÜSSIGKEIT

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Patent-
5 anspruches 1, sowie auf eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Ein solches Verfahren, wie es beispielsweise in der DE 40 32 002 C2 gezeigt ist,
kommt in geschlossenen Behältern und Anlagen zum Einsatz, in dem Mikroor-
ganismen unter sterilen Bedingungen kultiviert werden. Zur automatischen Re-
10 gelung des Kultivierungsprozesses werden Meßwerte benötigt, die Aufschluß
über den Zustand der Kulturflüssigkeit geben, insbesondere über die Zellkon-
zentration. Eine Regelung funktioniert aber nur dann zufriedenstellend, wenn
diese Werte schnell, d.h. on-line gemessen werden. Dafür sind alle off-line-Me-
thoden unbrauchbar wie z.B. die manuelle Probenahme und Analyse. Auch der
15 Zusatz von analytischen Reagentien zum Reaktorinhalt ist üblicherweise nicht
erlaubt.

Man verwendet deshalb gerne optische Detektoren zur Messung der Lichtabsorp-
tion, Lichtstreuung oder die Fluoreszenz der Zellen. Leider unterscheiden diese
20 Verfahren in der Regel nicht zwischen den Zellen und der sie umgebenden Flüs-
sigkeit. Es ist daher schwierig, detaillierte Aussagen über die Zellpopulation im
abgeschlossenen Bioreaktor zu bekommen.

Das Verfahren und die Vorrichtung gemäß der DE 40 32 002 C2 stellen deshalb
25 einen wesentlichen Fortschritt dar. Bei diesem Verfahren werden die Zellen be-
leuchtet, durch ein Mikroskop und eine Videokamera abgebildet und diese Ab-
bildung durch eine elektronische Bildverarbeitung analysiert. Eine Entnahme
der Zellen ist nicht nötig. Das mikroskopierte Volumen ist optisch oder mecha-
nisch definiert, ähnlich einer Zählkammer. Durch die Bildverarbeitung können
30 selektiv Zellen erfaßt werden und ihre Konzentration, Größe und Morphologie
bestimmt werden. Die Lösung, in der die Zellen schwimmen, Begleitstoffe, Kon-
taminationen und Luftblasen können zuverlässig von den Zellen unterschieden
werden. Die In situ-Mikroskopie liefert als Messwerte die Zellkonzentration und
Zellgrößenverteilung. Aus beiden kann auf die Biotrockenmasse geschlossen
35 werden.

Darüber hinaus ist jedoch die Bestimmung der Vitalität der Kulturflüssigkeit erwünscht. Die Vitalität einer Zellprobe ist definiert als das Verhältnis der lebenden Zellen dividiert durch die Gesamtzahl der Zellen (Summe der lebenden und toten Zellen). Die Vitalität ist ein wichtiger Parameter für Kultivierungen im industriellen Maßstab. In diesen Prozessen wird die Biomasse mehrfach verwendet, bis der Totzellanteil so hoch ist, daß eine neue Zellkultur eingesetzt werden muss. Ein anderer Einsatzzweck ist das Animpfen von Kultivierungen: kennt man die Vitalität einer Zellprobe und die Zellkonzentration, kann das benötigte Volumen zum Animpfen einer Kultur berechnet werden (z.B. beim Anstellen der Hefe in Brauereien). Es wäre deshalb ein großer Fortschritt, wenn die absolute Zellkonzentration und die Vitalität mit Hilfe der gleichen Sonde bestimmt werden können. Allerdings fehlt bislang eine Möglichkeit, die Zellvitalität als zusätzlichen Parameter für jede Zelle einzeln zu erfassen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren aufzuzeigen, mit dem bei In situ-mikroskopischer Beobachtung von Zellen im Bioreaktor eine direkte Beurteilung der Vitalität einzelner Zellen möglich ist, und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zu schaffen.

Das Verfahren und eine Vorrichtung zur Lösung dieser Aufgabe sind in den Patentansprüchen 1 und 10 offenbart.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird die Beleuchtung der Zellen als Dunkelfeldbeleuchtung durchgeführt. Bei dieser Beleuchtungsanordnung gelangt kein direktes Licht der beleuchtenden Lichtquelle, sondern nur das von den beleuchteten Zellen abgegebene, also beispielsweise gestreute Licht zur Abbildung. Bei der Auswertung der Abbildung wird ein Vergleich der Intensitäten des vom Zellinneren und des vom Zellrand abgegebenen Lichtes durchgeführt. Dadurch können lebende und tote Zellen unterschieden werden, so daß die Vitalität der Kulturflüssigkeit bestimmt werden kann.

Das Verfahren nutzt die Eigenschaft der Zellen, Licht abzulenken. Ein lebende Zelle lenkt das Licht im wesentlichen in Vorwärtsrichtung, während eine tote Zelle das Licht diffus nach allen Seiten ablenkt. Verwendet man eine optische Anordnung zur winkelselektiven Erfassung des von den Zellen abgelenkten Lichts, also eine Dunkelfeldanordnung, und baut diese in ein In situ-Mikroskop ein, ist es möglich, die Zellvitalität direkt im Reaktor zu erfassen.

Weitere bevorzugte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen 2 bis 9 sowie 11 bis 20 angegeben.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen näher erläutert. Es
5 zeigen:

- | | | |
|----|--------|--|
| | Fig. 1 | zeigt eine schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung; |
| 10 | Fig. 2 | zeigt eine zweite Ausführungsform mit einer veränderten Beleuchtungsanordnung; |
| | Fig. 3 | zeigt eine Ausführungsform, die neben der Dunkelfeldmikroskopie zur Hellfeldmikroskopie vorgesehen ist; |
| 15 | Fig. 4 | zeigt eine Ausführungsform, die neben der Dunkelfeldmikroskopie zur Fluoreszenzmikroskopie vorgesehen ist; |
| | Fig. 5 | zeigt eine Ausführungsform, die neben der Dunkelfeldmikroskopie zur Phasenkontrastmikroskopie vorgesehen ist; und |
| 20 | Fig. 6 | zeigt eine Ausführungsform, die neben der Dunkelfeldmikroskopie zur Interferenzkontrastmikroskopie vorgesehen ist. |

25 Die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung umfaßt einen zylindrischen Tubus 10, der in die Kulturflüssigkeit im nicht dargestellten Bioreaktor eintaucht. Innerhalb des Tubus 10 befinden sich zwei parallel und senkrecht zur Tubusachse angeordnete Glasplatten 12,14. Der Zwischenraum zwischen den Glasplatten 12,14 bildet ein Probenvolumen 16 der zu untersuchenden Kulturflüssigkeit. Damit die Kulturflüssigkeit das Probenvolumen 16 frei durchströmen kann, sind im Bereich
30 des Probenvolumens 16 nicht dargestellte Öffnungen gegenüberliegend in der Wand des Tubus 10 angeordnet. Da es vorteilhaft ist, die Flüssigkeit im Probenvolumen 16 während der Untersuchung ruhigzustellen, sind die Öffnungen bei Bedarf zu verschließen. Darüber hinaus ist eine der Glasplatten 14 entlang der
35 Tubusachse verstellbar, so daß die Dicke des Probenvolumens 16 veränderbar ist.

- Außerhalb des Probenvolumens 16 ist ein Mikroskop-Objektiv 18 angeordnet, dessen optische Achse mit der Tubusachse zusammenfällt. Auf der den Glasplatten 12,14 gegenüberliegenden Seite des Objektivs 18 ist ein elektronischer Bildaufnehmer 20 angeordnet, dessen Aufnahme­fläche senkrecht zur optischen Achse des Objektivs 18 steht. Entsprechend der Brennweite des Objektivs 18 sind die Abstände des Objektivs 18 von der Glasplatte 14 sowie des Bildaufnehmers 34 vom Objektiv 18 so gewählt, daß sich ein Objekt, also insbesondere eine zu untersuchende Zelle 22, innerhalb des Probenvolumens 16 auf der Aufnahme­fläche des Bildaufnehmers 20 scharf abbilden läßt.
- 10 Auf der dem Objektiv 18 und dem Bildaufnehmer 20 gegenüberliegenden Seite der Glasplatten 12,14 befindet sich ein Dunkelfeldkondensor 24 mit einer im wesentlichen punktförmigen Lichtquelle 26, einem auf der optischen Achse des Objektivs 18 angeordneten Konvexspiegel 28 und einem Konkavspiegel 30, der
- 15 radialsymmetrisch und etwa ringförmig um die optische Achse herum angeordnet ist und in Fig. 1 nur teilweise dargestellt ist. Es handelt sich bei dem in Fig. 1 gezeigten Dunkelfeldkondensor 24 um einen sogenannten Kardiolidkondensor. Das Licht der Lichtquelle 26 wird vom Konvexspiegel 28 auf den Konkavspiegel 30 reflektiert, welcher es als schwach konvergentes rotationssymmetrisches
- 20 Bündel schräg zur optischen Achse des Objektivs 18 in das Probenvolumen 16 reflektiert. Die vom Konkavspiegel 30 ausgehenden Lichtbündel kreuzen sich somit innerhalb des Probenvolumens 16 und treffen auf Zellen 22 innerhalb des Probenvolumens, die dadurch beleuchtet werden.
- 25 Im folgenden wird die Funktionsweise der Anordnung in Fig. 1 beschrieben. Zur Ruhigstellung der Kulturflüssigkeit innerhalb des Probenvolumens 16 werden die Öffnungen in der Wand des Tubus 10 verschlossen, so daß die Strömung unterbrochen wird. Anschließend wird die verschiebbare Glasplatte 14 in Richtung der feststehenden Glasplatte 12 bewegt, bis der Zwischenraum zwischen
- 30 den beiden Glasplatten 12,14 so klein ist, daß das Probenvolumen 16 nur noch durch eine dünne Flüssigkeitsschicht gebildet wird. Die Dicke dieser Schicht sollte der Schärfentiefe des Objektivs 18 entsprechen, so daß alle Zellen 22 innerhalb des Probenvolumens 16 scharf abzubilden sind.
- 35 Das Licht des Dunkelfeldkondensors 24 trifft auf die Zellen 22, gelangt jedoch nicht direkt ins Objektiv 18, da dieses außerhalb des Strahlengangs des Dunkelfeldkondensors 24 angeordnet ist. Somit gelangt nur das von den beleuchte-

ten Zellen 22 abgegebene Licht ins Objektiv 18, welches ein scharfes Bild der Zellen 22 auf der lichtempfindlichen Aufnahmefläche des Bildaufnehmers 20 erzeugt. Diese Abbildung wird digitalisiert und durch eine Bildverarbeitungssoftware analysiert.

5

Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen 22 wird die Tatsache ausgenutzt, daß bei der hier beschriebenen Abbildung durch eine Dunkelfeldbeleuchtung das Innere lebender Zellen wesentlich dunkler erscheint als der Zellrand, während bei toten Zellen das Zellinnere etwa so hell wie der Rand erscheint. Durch
10 die Bildverarbeitung kann deshalb auf einfache Weise eine Beurteilung der Vitalität der Kulturflüssigkeit vorgenommen werden, indem bei einzelnen Zellen die Helligkeit des Zellrandes mit der des Zellinneren verglichen wird, auf dieser Grundlage eine Entscheidung darüber getroffen wird, ob es sich um eine lebende oder eine tote Zelle handelt, und in Folge der Anteil der lebenden Zellen an
15 der Gesamtzahl der Zellen ermittelt wird.

Auf das Ruhigstellen der Kulturflüssigkeit im Probenvolumen 16 durch Verschließen der Öffnungen kann verzichtet werden, wenn die Zellen 22 während der Belichtungszeit des Bildaufnehmers (etwa 1/50 sec) nur kurzzeitig beleuchtet werden, so daß trotz der Bewegung der Zellen 22 eine scharfe Abbildung erzeugt werden kann. Diese kurzzeitige Beleuchtung wird durch einen gepulsten Betrieb der Lichtquelle 26 erreicht. Als Lichtquelle 26 eignen sich beispielsweise Blitzlampen, LEDs und Laser.

25 Fig 2 zeigt eine zweite Ausführungsform ähnlich der Anordnung aus Fig. 1, die einen Dunkelfeldkondensor mit einer Anzahl punktförmiger Lichtquellen 32,34 umfaßt, von denen in Fig. 2 zwei gegenüberliegende Lichtquellen beispielhaft gezeigt sind. Diese Lichtquellen 32,34 sind kranzförmig und rotationssymmetrisch um die optische Achse herum angeordnet. Ihr Licht wird durch Linsen 36,38,
30 deren optische Achsen in einem Punkt innerhalb des Probenvolumens 16 einander kreuzen, in das Probenvolumen 16 hinein fokussiert, so daß sich ein Strahlengang ergibt, der dem des Kardiolidkondensors 18 aus Fig. 1 entspricht.

Fig. 3 zeigt eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
35 die es ermöglicht, außer der Dunkelfeldmikroskopie gleichzeitig auch Hellfeldmikroskopie durchzuführen. Zu diesem Zweck ist die Anordnung mit einem Kondensor 24 versehen, der eine Anordnung mit einer etwa punktförmigen Lichtquelle 26, einem Konvexspiegel 28 und einem ringförmig um die optische Achse

des Mikroskopobjektivs 18 angeordneten Konkavspiegel 30 aufweist, die dem Kardiolidkondensor 24 aus Fig. 1 entspricht und die dort beschriebene Dunkelfeldbeleuchtung des Probenvolumens 16 ermöglicht. Im Unterschied zum Kondensor 24 aus Fig. 1 ist jedoch der Konvexspiegel 28 so ausgebildet, daß er einen Teil des von der Lichtquelle 26 ausgehenden Lichts zum Konkavspiegel 30 reflektiert, jedoch den übrigen Anteil des Lichts durchläßt. Dieser durchgelassene Anteil durchleuchtet das Probenvolumen 16, so daß der von der Kulturflüssigkeit und den Zellen 22 durchgelassene Anteil in das Objektiv 18 eintreten und eine Abbildung auf dem Bildaufnehmer 20 erzeugen kann. Insgesamt werden somit zwei Abbildungen erzeugt: einerseits durch die Dunkelfeldbeleuchtung der Zellen 22 und Abbildung der beleuchteten Zellen, und andererseits eine Transmissionsabbildung des von den Zellen 22 transmittierten Durchlichtes der Hellfeldbeleuchtung. Zur Trennung der beiden Abbildungen ist auf der optischen Achse zwischen dem Mikroskopobjektiv 18 und dem Bildaufnehmer 20 ein Strahlteilerwürfel angeordnet, der einen Anteil des in den Strahlteiler 44 eintretenden Lichts in einer Richtung senkrecht zur optischen Achse reflektiert. Dieses Licht trifft auf einen zweiten Bildaufnehmer 42, der in gleicher Weise wie der erste Bildaufnehmer 20 zur Erzeugung und digitalen Verarbeitung einer Abbildung vorgesehen ist.

Zur Bildverarbeitung ist es notwendig, diese beiden Abbildungen optisch voneinander zu trennen. Dies geschieht, indem das für die beiden Beleuchtungsarten, also für die Dunkelfeldbeleuchtung und die Hellfeldbeleuchtung verwendete Licht unterschiedlich polarisiert wird und das aus dem Probenvolumen 16 in das Mikroskopobjektiv 18 eintretende Licht entsprechend den unterschiedlichen Polarisationsrichtungen im Abbildungsstrahlengang durch den polarisierenden Strahlteiler 44 wieder getrennt wird, so daß das vom Strahlteiler 44 durchgelassene Licht einer ersten Polarisationsrichtung und das vom Strahlteiler 44 reflektierte Licht der dazu senkrecht stehenden Polarisationsrichtung entspricht. Die Polarisationskodierung des für die unterschiedlichen Beleuchtungen verwendeten Lichts geschieht durch eine polarisierende Beschichtung des Konvexspiegels 28, die bewirkt, daß das vom Konvexspiegel 24 reflektierte Licht zur Dunkelfeldbeleuchtung in einer ersten Richtung, also beispielsweise senkrecht zur Zeichen-ebene, polarisiert ist, so daß das von den Zellen 22 aufgrund der Dunkelfeldbeleuchtung ins Mikroskopobjektiv 18 abgegebene Licht ebenfalls dieser Polarisationsrichtung entspricht. Der Strahlteiler 44 ist so angeordnet, daß er das Licht dieser Polarisationsrichtung reflektiert und auf dem zweiten Bildaufnehmer 42 eine Abbildung erzeugt, die von der Dunkelfeldbeleuchtung herrührt. Hingegen ist das vom Konvexspiegel 28 durchgelassene Licht senkrecht zu dem

reflektierten Licht polarisiert, so daß das von den Zellen 22 transmittierte und in das Mikroskopobjektiv 18 eintretende Licht ebenfalls in dieser Richtung polarisiert ist und vom Strahlteiler 44 ebenfalls durchgelassen wird, so daß auf dem ersten Bildaufnehmer 20 eine Abbildung erzeugt wird, die der Hellfeldbeleuchtung entspricht.

In vergleichbarer Weise kann das für die Dunkelfeldbeleuchtung und die Hellfeldbeleuchtung verwendete Licht farblich kodiert werden, so daß das zur Dunkelfeldbeleuchtung verwendete Licht eine andere Wellenlänge aufweist als das transmittierte Licht der Hellfeldbeleuchtung. Dies ermöglicht eine einfache Unterscheidung der durch die verschiedenen Beleuchtungsarten erzeugten Abbildungen durch entsprechende Farbfilter, die auf nicht gezeigte Weise vor den jeweiligen Bildaufnehmern 20,42 anzubringen sind.

Es ist auch möglich, auf den zweiten Bildaufnehmer 42 und den Strahlteiler 44 zu verzichten, so daß beide Abbildungen auf einem einzigen Bildaufnehmer 20 erzeugt werden. In diesem Fall wird die Eigenschaft des digitalen Bildaufnehmers ausgenutzt, daß die einzelnen Pixel des Bildaufnehmers jeweils nur für eine Farbe (rot, grün oder blau) empfindlich sind. Die Abbildungen unterschiedlicher Farben lassen sich nun separieren, indem die farbempfindlichen Pixel jeweils einer Farbe ausgelesen und zu einer Abbildung kombiniert werden.

Eine sehr einfache Art der Farbkodierung besteht darin, eine spektral breitbandige Lichtquelle 26 vorzusehen und den Konvexspiegel 28 dichroitisch zu bedampfen, so daß er Licht einer Wellenlänge reflektiert und Licht einer anderen Wellenlänge durchläßt.

Im übrigen ist es möglich, für beide Beleuchtungsstrahlengänge unterschiedliche monochromatische Lichtquellen wie etwa LEDs oder Laser vorzusehen.

Die in Fig. 4 gezeigte Anordnung ist dazu geeignet, außer der Dunkelfeldmikroskopie auch Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen. Die Anordnung ist einerseits mit dem aus Fig. 1 bekannten Dunkelfeldkondensor 24 versehen. Darüber hinaus ist in dem dem Dunkelfeldkondensor 24 gegenüberliegenden Tubusbereich eine weitere Lichtquelle 46 vorgesehen, die gegenüber der optischen Achse des Mikroskopobjektivs 18 versetzt ist und deren Licht von einem Strahlteiler 48 um 90 Grad in Richtung des Mikroskopobjektivs 18 reflektiert wird und von die-

sem in das Probenvolumen 16 hineinfokussiert wird. Zwischen der Fluoreszenzlichtquelle 46 und dem Strahlteiler 48 ist ein Filter 50 angeordnet, der das von der Fluoreszenzlichtquelle 46 ausgehende Anregungslicht spektral einengt. Durch das Anregungslicht werden die Zellen 22 im Probenvolumen 16 zur Fluoreszenz angeregt, und das abgegebene Fluoreszenzlicht tritt in umgekehrter Richtung durch das Mikroskopobjektiv 18 und trifft auf den Strahlteiler 48. Der Strahlteiler 48 ist so ausgebildet, daß er das spektral zu höheren Wellenlängen verschobene Fluoreszenzlicht im Gegensatz zum Anregungslicht durchläßt und eine Fluoreszenzlichtabbildung auf dem Bildaufnehmer 20 ermöglicht. Es werden somit zwei unterschiedliche Abbildungen auf dem Bildaufnehmer 20 erzeugt, nämlich die durch die Dunkelfeldbeleuchtung in üblicher Weise erzeugte Abbildung und eine Abbildung des Fluoreszenzlichts. Die Trennung der Dunkelfeld- und Fluoreszenzbilder geschieht durch die bereits beschriebene Separation der Auszüge des Bildaufnehmers 20, d. h. durch die Trennung der Daten von Pixeln mit unterschiedlicher Farbempfindlichkeit. Eine weitere Möglichkeit besteht in der zeitlichen Trennung der Abbildungen, indem die Lichtquelle 26 des Dunkelfeldkondensors 24 und die Fluoreszenzlichtquelle 46 in rascher Folge wechselweise gepulst werden und die Abbildungen auf dem Bildaufnehmer 20 zeitlich getrennt ausgelesen werden.

20

Fig. 5 zeigt eine Anordnung, die außer der Dunkelfeldmikroskopie gleichzeitig zur Phasenkontrastmikroskopie geeignet ist. Die gezeigte Anordnung entspricht im wesentlichen Fig. 3. Der Konvexspiegel 26 des Dunkelfeldkondensors 24 ist polarisierend bedampft, so daß er Licht einer Polarisationsrichtung reflektiert und Licht der dazu senkrecht stehenden Polarisationsrichtung transmittiert, so daß gleichzeitig eine Dunkelfeldbeleuchtung und eine Hellfeldbeleuchtung des Probenvolumens 16 durchgeführt werden. Wie in Fig. 3 ist im Abbildungsstrahlengang ein Strahlteiler 44 vorgesehen, der Licht einer Polarisationsrichtung reflektiert und das Licht der dazu senkrecht stehenden Polarisationsrichtung transmittiert, so daß auf einem in der optischen Achse des Mikroskopobjektivs 18 angeordneten Bildaufnehmer 20 eine Abbildung des transmittierten Lichts und in der Reflexionsrichtung auf einem weiteren Bildaufnehmer 42 eine Abbildung des reflektierten Lichts erzeugt werden kann. Auf diese Weise lassen sich die Abbildungen, die durch die unterschiedlichen Beleuchtungsarten erzeugt werden, anhand der Polarisation unterscheiden, wie es im Zusammenhang mit Fig. 3 hinlänglich beschrieben ist.

35

Gegenüber Fig. 3 ist im Hellfeldstrahlengang eine Anordnung zur Phasenkontrastmikroskopie angeordnet. Diese umfaßt eine direkt hinter dem Konvexspiegel angeordnete Ringblende 52 sowie eine zwischen dem Mikroskopobjektiv 18 und dem Strahlteiler 44 angeordnete Phasenplatte 54. Die Ringblende 52 und die Phasenplatte 54 stehen senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs 18. Das durch den Konvexspiegel 28 transmittierte Licht der Lichtquelle 26 passiert zunächst die Ringblende 52 und tritt, nachdem es das Probenvolumen 16 passiert hat, in das Mikroskopobjektiv 18 ein, wo es durch die Phasenplatte 54 und den Strahlteiler 44 hindurch auf den ersten Bildaufnehmer 20 fokussiert wird. Durch diese an sich bekannte Phasenkontrastanordnung wird ein kontrastreicheres Bild erzeugt als im Falle der einfachen, in Fig. 3 gezeigten Hellfeldbeleuchtungsanordnung.

Die in Fig. 6 gezeigte Anordnung ist neben der Dunkelfeldmikroskopie außerdem zur Interferenzkontrastmikroskopie vorgesehen. Im wesentlichen entspricht dieser Aufbau der in Fig. 5 gezeigten Anordnung zur Phasenkontrastmikroskopie, jedoch ist in Fig. 6 die Ringblende 52 durch eine $\lambda/4$ -Platte 56 sowie ein dahinter angeordnetes Wollaston-Prisma 58 ersetzt, und anstelle der Phasenplatte 54 aus Fig. 5 ist ein zweites Wollaston-Prisma 60 in den Abbildungsstrahlengang zwischen dem Mikroskopobjektiv 18 und dem Strahlteiler 44 eingesetzt. Außerdem ist in dem Transmissionsstrahlengang zwischen dem Strahlteiler 44 und dem ersten Bildaufnehmer 20 ein zusätzlicher Analysator 62 eingefügt.

Der Konvexspiegel 28 ist in bekannter Weise polarisierend bedampft, so daß das durch den Konvexspiegel 28 transmittierte Licht polarisiert ist. Dieses Licht passiert die $\lambda/4$ -Platte 56 und das erste Wollaston-Prisma 58, welches jeden einzelnen Lichtstrahl in zwei Strahlen unterschiedlicher Polarisation aufteilt, die in das Probenvolumen 16 einfallen. Treffen sie dort auf ein Objekt wie etwa eine Zelle 22, so kann dieses einen Gangunterschied zwischen den unterschiedlichen Lichtstrahlen verursachen. Die das Probenvolumen 16 passierenden Strahlen werden durch das Mikroskopobjektiv 18 gebündelt und fallen auf das zweite Wollaston-Prisma 60, das die beiden Strahlen wieder vereint. Diese Strahlen fallen durch den Strahlteiler 44 auf den ersten Bildaufnehmer 20 und erzeugen dort eine Interferenzkontrastabbildung. Durch den Gangunterschied, der durch die Objekte im Probenvolumen 16 erzeugt wird, wird ein sehr kontrastreiches Bild erzeugt, wobei der Kontrast sich durch Verschieben des zweiten Wollaston-Prismas 60 entlang der optischen Achse des Mikroskopobjektivs der optischen Achse des Mikroskopobjektivs 18 verändern läßt.

Wie bei den bereits besprochenen Anordnungen läßt sich außer der Interferenzkontrastabbildung eine Abbildung der vom Strahlteiler 44 reflektierten Lichtstrahlen auf dem zweiten Bildaufnehmer 42 erzeugen, die in bekannter Weise von der Dunkelfeldbeleuchtung herrührt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Charakterisierung einer Kulturflüssigkeit, insbesondere in einem Bioreaktor, in dem in situ durch Beleuchtung der in der Kulturflüssigkeit enthaltenen Zellen (22), mikroskopische Abbildung der Zellen (22) und durch eine Bildauswertung der Abbildung die Kulturflüssigkeit analysiert wird, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Beleuchtung als Dunkelfeldbeleuchtung durchgeführt wird, und daß die Bildauswertung einen Vergleich der Intensitäten des vom Zellinneren und des vom Zellrand abgegebenen Lichtes umfaßt, durch welchen Vergleich eine Unterscheidung lebender und toter Zellen (22) zur Bestimmung der Vitalität der Kulturflüssigkeit durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß außer der Dunkelfeldbeleuchtung eine Hellfeldbeleuchtung durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß außerdem eine Beleuchtung zur Fluoreszenzanregung durchgeführt wird und die Bildauswertung eine Beobachtung des von den Zellen (22) abgegebenen Fluoreszenzlichts umfaßt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch **gekennzeichnet**, daß außerdem eine Interferenzkontrastbeobachtung der Zellen (22) durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß außerdem eine Phasenkontrastbeobachtung der Zellen (22) durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß für verschiedene Beleuchtungsarten unterschiedlich polarisiertes Licht verwendet wird und die Abbildungen, die durch die verschiedenen Beleuchtungsarten erzeugt werden, anhand der unterschiedlichen Polarisationen des die Abbildungen erzeugenden Lichts unterschieden werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß für verschiedene Beleuchtungsarten Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen verwendet wird und die Abbildungen, die durch die verschiedenen Beleuch-

tungsarten erzeugt werden, anhand der unterschiedlichen Wellenlängen des die Abbildungen erzeugenden Lichts unterschieden werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch **gekennzeichnet**,
5 daß die Beleuchtung mit gepulstem Licht durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch **gekennzeichnet**,
daß während der Abbildung zur Bildauswertung ein abzubildendes Probenvolumen (16) der Kulturflüssigkeit zeitweise ruhiggestellt wird.

10

10. Vorrichtung zur Charakterisierung einer Kulturflüssigkeit, insbesondere in einem Bioreaktor, mit einer Beleuchtungsanordnung (24) zur Beleuchtung eines Probenvolumens (16) der Kulturflüssigkeit, einem Mikroskop-Objektiv (18) zur Abbildung von Zellen (22) innerhalb des Probenvolumens (16) und einer Bildauswertungs-Einrichtung (20) zur Analyse der Abbildung, dadurch **gekennzeichnet**,
15 daß die Beleuchtungsanordnung (24) zur Dunkelfeld-Beleuchtung vorgesehen ist und die Bildauswertungs-Einrichtung (20) zum Vergleich der Intensitäten des vom Zellinneren und des vom Zellrand abgegebenen Lichtes und zur Unterscheidung lebender und toter Zellen auf der Grundlage dieses Vergleichs ausgebildet ist.
20

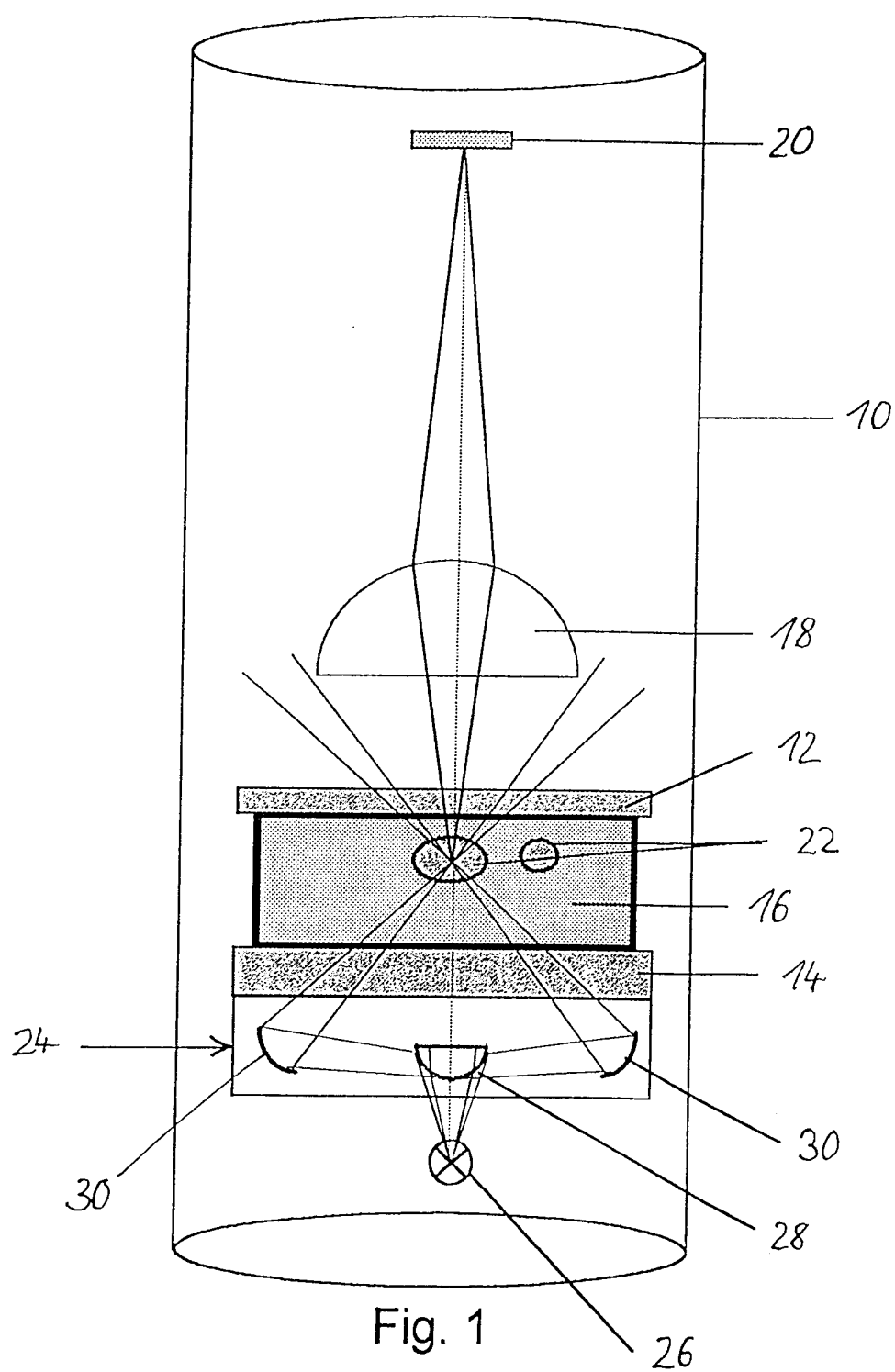
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Beleuchtungsanordnung (26), das Mikroskop-Objektiv (18) und die Bildauswertungs-Einrichtung (20) innerhalb eines Tubus (10) angeordnet sind, dessen
25 Wand mit Öffnungen zum Durchströmen der Kulturflüssigkeit durch das Probenvolumen (16) versehen ist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Dicke des Probenvolumens (16) durch zwei senkrecht zur optischen Achse des Mikroskop-Objektivs (18) stehende Glasplatten (12,14) begrenzt wird, von denen mindestens eine entlang der optischen Achse verstellbar ist.
30

13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch **gekennzeichnet**, daß der Tubus (10) zum Ruhigstellen des Probenvolumens (16) mit Einrichtungen zum Verschließen der Öffnungen versehen ist.
35

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Beleuchtungsanordnung (24) zum gepulsten Betrieb vorgesehen ist.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Beleuchtungsanordnung (24) außerdem zur Hellfeld-Beleuchtung ausgebildet ist.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, **gekennzeichnet** durch eine Fluoreszenzlichtquelle (42) zur Fluoreszenzanregung der Kulturflüssigkeit, wobei die Bildauswertungs-Einrichtung (20) zur Analyse des von den Zellen (22) abgegebenen Fluoreszenzlichts vorgesehen ist.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 16, **gekennzeichnet** durch ein im Strahlengang der Beleuchtungsanordnung (24) angeordnetes erstes Wollaston-Prisma (58) und ein im Abbildungs-Strahlengang angeordnetes zweites Wollaston-Prisma (60) zur Interferenzkontrastbeobachtung der Zellen (22).
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 17, **gekennzeichnet** durch eine im Strahlengang der Beleuchtungsanordnung (24) angeordnete Ringblende (52) und eine im Abbildungs-Strahlengang angeordnete Phasenplatte (60) zur Phasenkontrastbeobachtung der Zellen (22).
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch **gekennzeichnet**, daß im Strahlengang der Beleuchtungsanordnung (24) und/oder der Fluoreszenzlichtquelle (42) Polarisationsrichtungen (24) und im Abbildungs-Strahlengang polarisationsselektive Einrichtungen (44) angeordnet sind.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 19, dadurch **gekennzeichnet**, daß im Strahlengang des von der Beleuchtungsanordnung (24) und/oder der Fluoreszenzlichtquelle (42) ausgehenden Lichts Monochromatisierungseinrichtungen (24,50) vorgesehen sind oder die Lichtquellen (26,46) selbst monochromatisch sind, und daß im Abbildungs-Strahlengang wellenlängenselektive Einrichtungen (44) angeordnet sind.
21. Vorrichtung nach Anspruch 19 oder 20, dadurch **gekennzeichnet**, daß als polarisations- bzw. wellenlängenselektive Einrichtung ein Strahlteiler (44) vorgesehen ist, der Licht einer ersten Polarisation bzw. Wellenlänge zur Abbildung auf einem ersten Bildaufnehmer (20) durchläßt und Licht einer zweiten Polarisation bzw. Wellenlänge auf einem zweiten Bildaufnehmer (42) reflektiert.

1/6



2/6

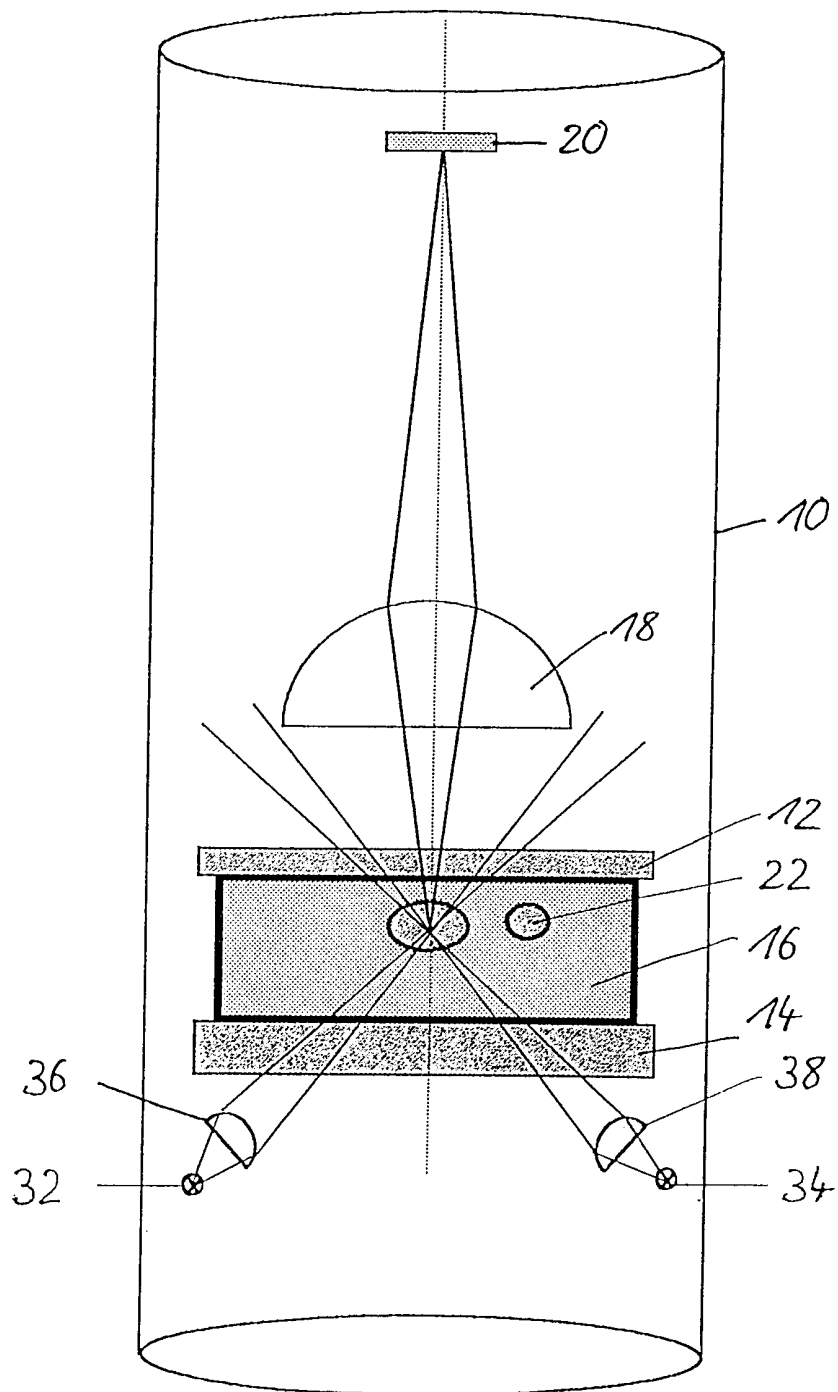


Fig. 2

3/6

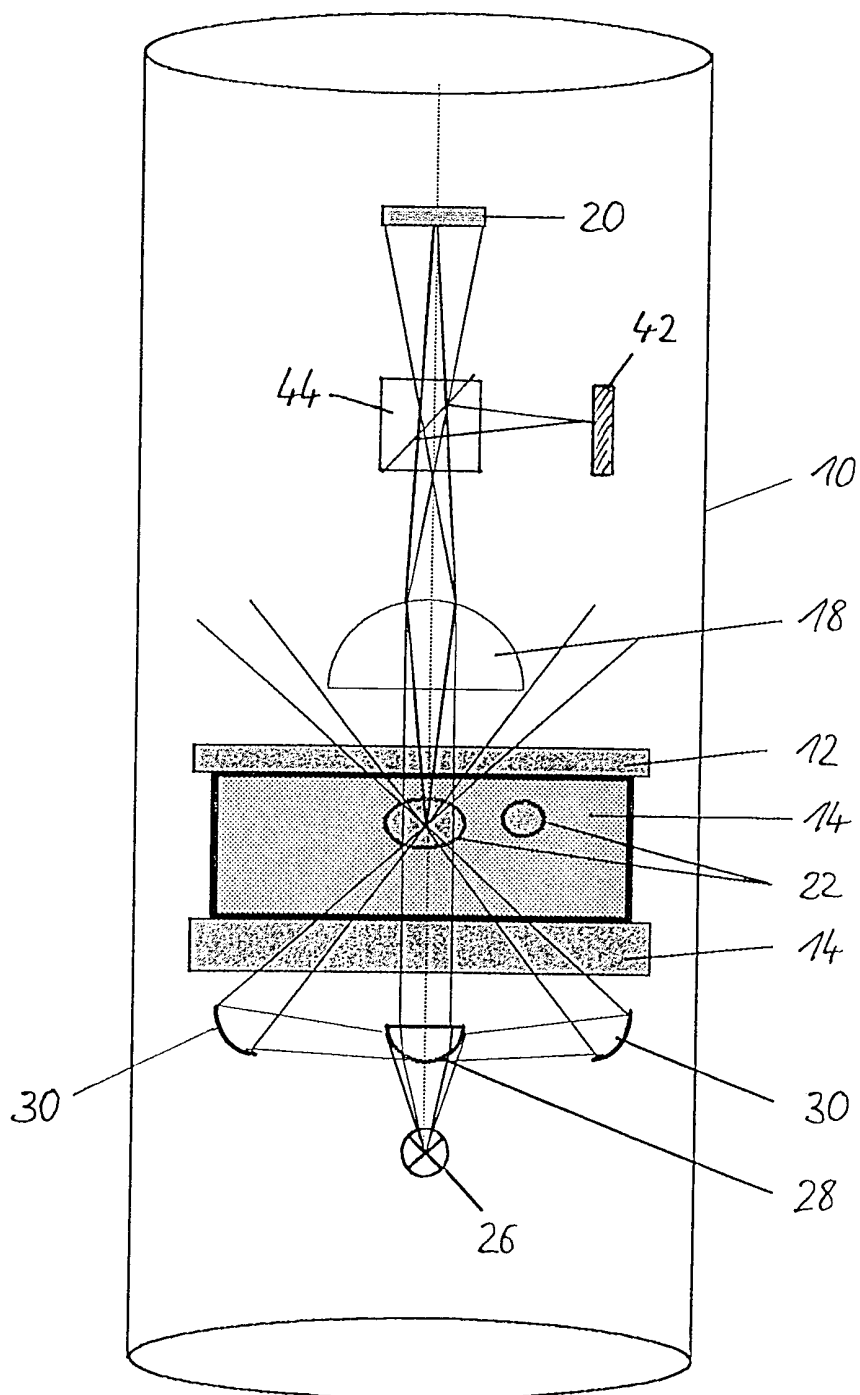


Fig. 3

4/6

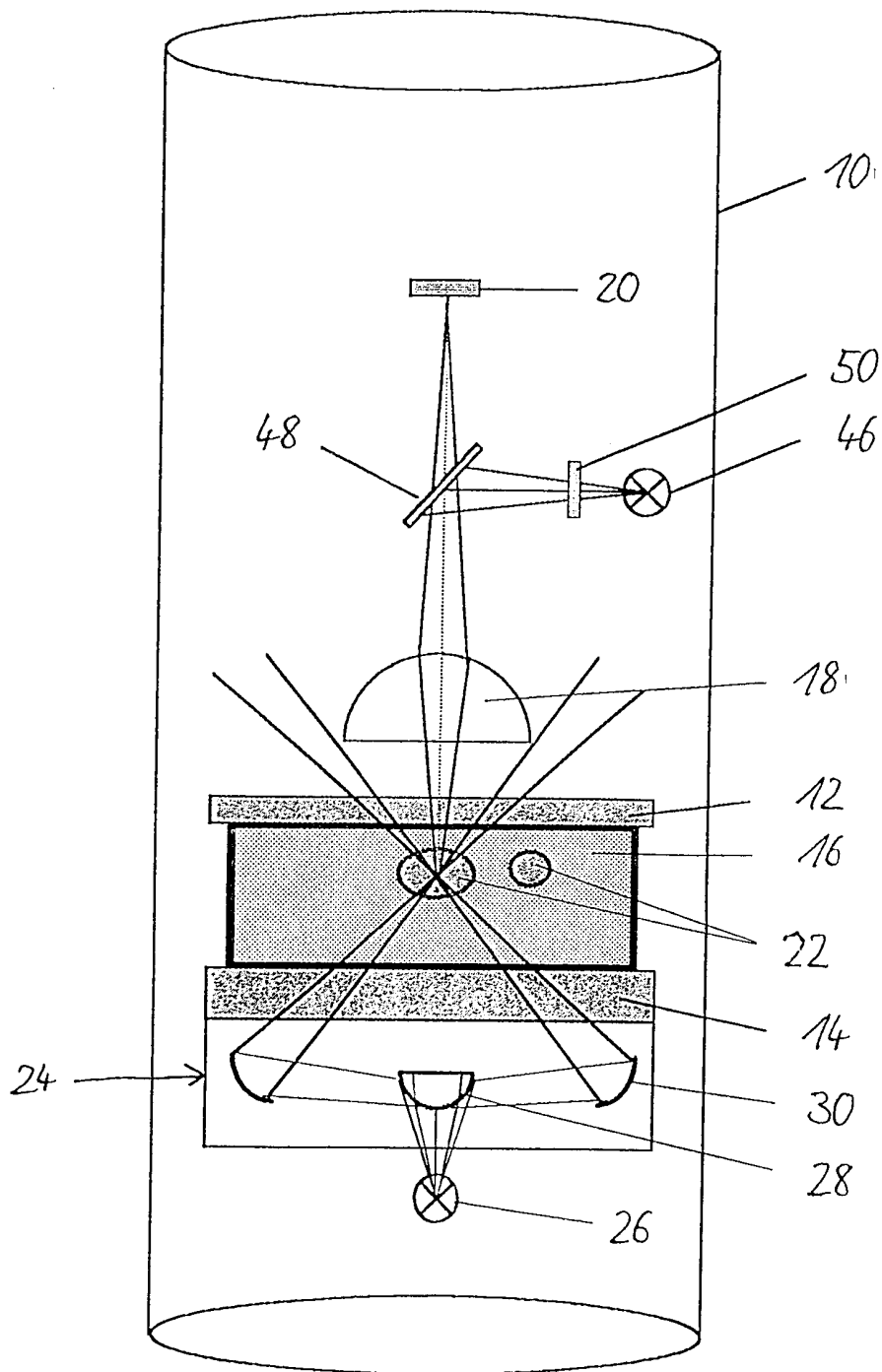


Fig. 4

5/6

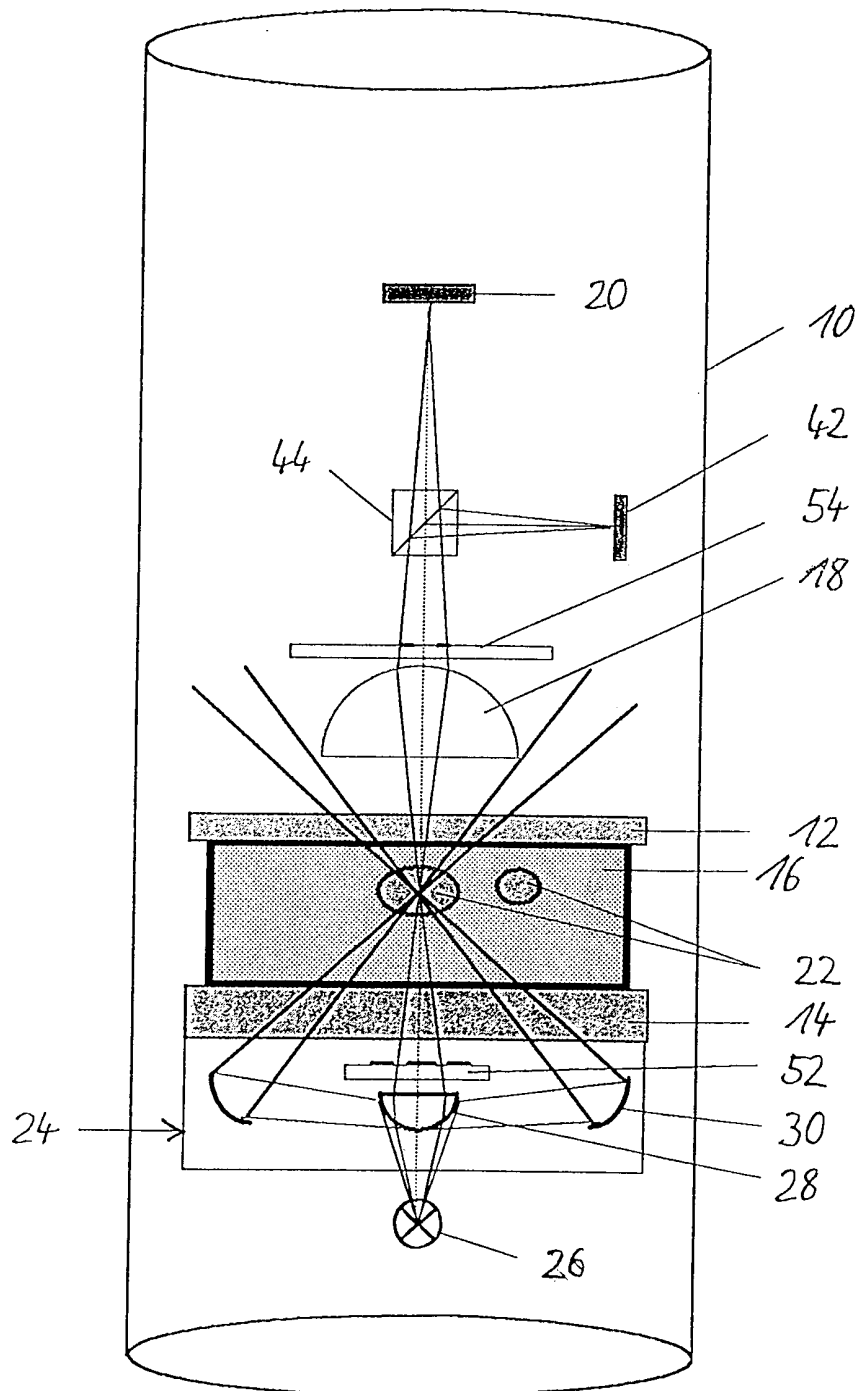


Fig. 5

6/6

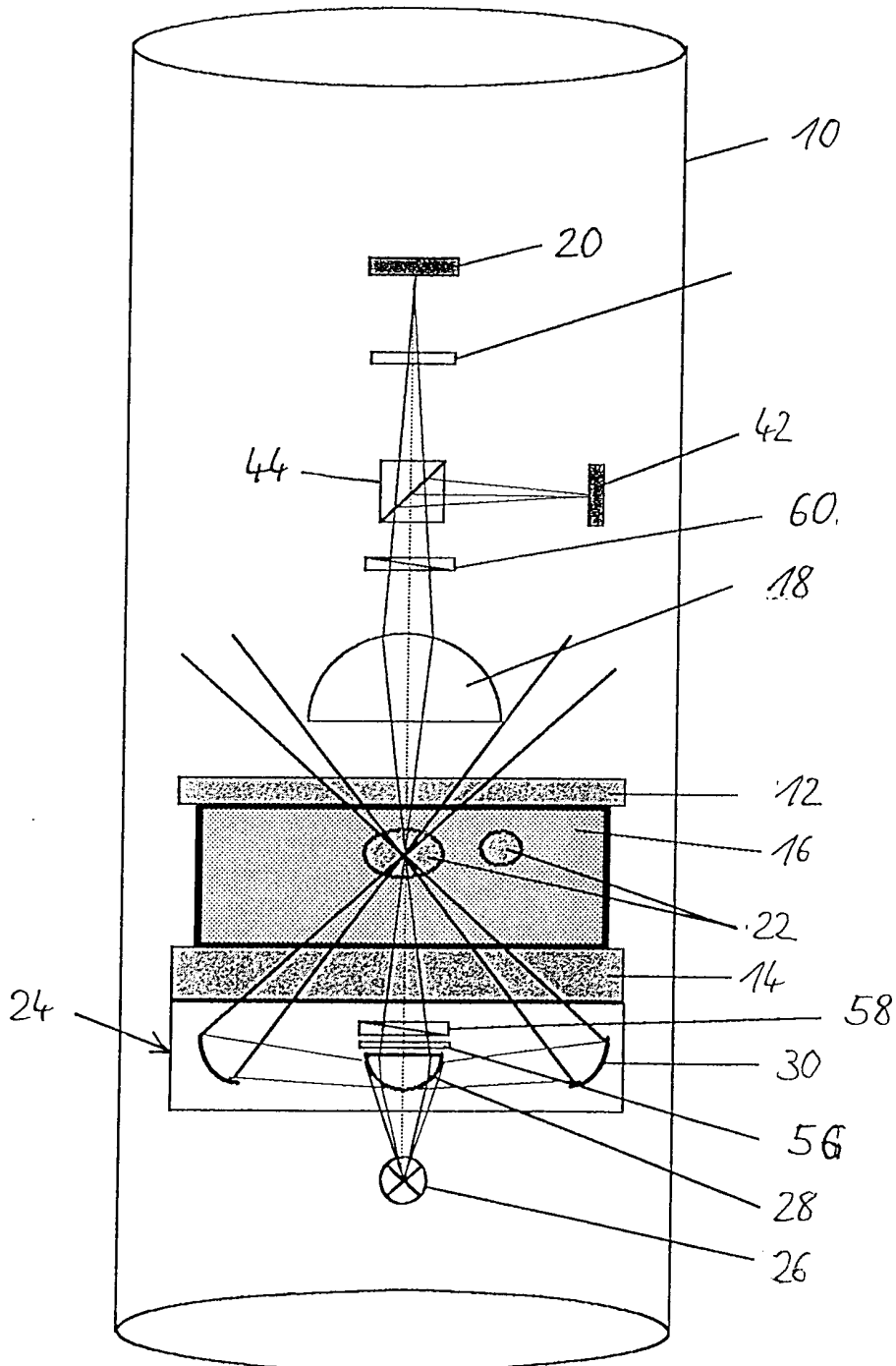


Fig. 6