



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 227 794 A1

4(51) G 01 N 21/00
G 01 N 27/56

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 268 683 1	(22)	25.10.84	(44)	25.09.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Pädagogische Hochschule „Wolfgang Ratke“, 4370 Köthen, Lohmannstraße 23, DD

(72) Kramer, Claus-Rüdiger, Prof. Dr. sc. nat.; Borns, Eike, Dr. rer. nat.; Böhm, Heinz, Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) **Vorrichtung für direkte Vergleichsmessung von optischen Eigenschaften und Ionenumsatz in Zellsuspensionen**

(57) Die Erfindung „Vorrichtung für direkte Vergleichsmessungen von optischen Eigenschaften und Ionenumsatz in Zellsuspensionen“ läßt sich im Screeningtest, der Mikrobiologie und der Biotechnologie anwenden. Sie verfolgt das Ziel, optische Analysen bei unterschiedlichen definierten Wellenlängen oder Wellenlängenbereichen sowie Ionenumsatzanalysen über pH-Meßketten oder ionenselektive Elektroden in einem Arbeitsgang durchzuführen und durch Vergleich der Analysenergebnisse Effektoren nach ihrer Wirksamkeit differenzieren und selektieren können. Dazu werden in einem Analysator, pH-Meßketten oder ionenselektive Elektroden mit optischer Meßtechnik über Lichtleitkabel und Phototransistoren so gekoppelt, daß eine optische Analyse und eine Ionenaustauschanalyse in einem Arbeitsgang möglich sind. Dieser Analysator wird mit beliebigen Anzuchtanlagen für Zell-, Zellpartikel- oder Organismenkulturen so verbunden, daß eine Analyse der optischen Eigenschaften sowie des Ionenumsatzes in beliebiger Zeitfolge über die „in situ“-Technik oder über Durchflußküvette erfolgen kann.

Erfindungsansprüche:

1. Vorrichtung für optische Analysen und Ionenaustauschanalysen in Zell-, Zellpartikel- oder Organismenkulturen, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Lichtkarussellthermostat zur Anzucht von Suspensionskulturen mit einem Analysator gekoppelt ist, der optische Analysen und Ionenumsatzanalysen in einem Arbeitsgang in Suspensionskulturen nach der „in situ“-Technik dadurch gestattet, daß eine pH-Meßelektrode oder ionenselektive Elektrode seitlich mit zwei Lichtleitkabeln versehen ist, die Licht definierter und unterschiedlicher Wellenlänge in die Suspensionskultur leiten, das nach Passieren einer Meßstrecke in der Suspensionskultur über Phototransistoren oder Lichtleitkabel wieder aufgefangen und anschließend registriert wird.
2. Vorrichtung nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Anzuchtanlage für Suspensionskultur geschlossene Fermentoren oder beliebig anders gestaltete Anzuchtfermentoren oder -anlagen verwendet werden.
3. Vorrichtung nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optische Analyse und gegebenenfalls die Ionenaustauschanalysen in einer Durchflußküvette erfolgen und die Proben mittels Pumpe transportiert werden.

Hierzu 6 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Analysen der optischen Eigenschaften und des Ionenumsatzes in autotrophen und heterotrophen Zellsuspensionen sowie auspendierten Mikroorganismen, Biotechnologie, Screeningtests, Mikrobiologie, biochemische und biologische Labore

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß optische Analysen von unbehandelten und wirkstoffbehandelten Zellsuspensionen und suspendierter Mikroorganismen wie auch pH-Messungen an solchen Kulturen zur Wachstumskontrolle benutzt werden. Erfindungsgemäß wird das in den Patenten DD 94234 sowie DD 2004 72/1 als getrennte Verfahrensmöglichkeit beschrieben. Dazu stehen eine Vielzahl an industriell gefertigten Meßgeräten zur Verfügung, die optische Analysen und pH-Messungen getrennt oder parallel gestatten. Solche Messungen werden bisher getrennt und nebeneinander durchgeführt. Besonders in größeren Reihen unterschiedlicher Kultivierung bedingen die Probenentnahme, der Probentransport sowie die getrennte Analyse der optischen Verhältnisse und des Ionenumsatzes einen großen Arbeitsaufwand.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, eine Vorrichtung zu entwickeln, die optische Analysen bei einer gegebenenfalls bei mehreren definierten Wellenlängen beziehungsweise Wellenlängenbereichen im infraroten, sichtbaren und ultravioletten Spektrum sowie Ionenaustauschanalysen, besonders pH-Analysen, in einem Arbeitsgang und definierter Zeitfolge, in suspendierten Zell-, Zellpartikel- und Organismenkulturen beliebiger Anzahl zur Beurteilung der Wirksamkeit von Bioeffektoren ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Lichtkarussellthermostat gemäß der Erfindung mit einem Analysator gekoppelt wird, der gleichzeitig eine optische Analyse und eine Ionenaustauschanalyse von suspendierten Zell-, Zellpartikel- oder Organismenkulturen gestattet. Im Lichtkarussellthermostat angezogene Zellsuspensionen, die mit Bioeffektoren behandelt werden und solche, die nicht behandelt wurden, werden dem Analysator zur Vergleichsmessung mittels Pumpen zugeführt, oder es taucht der Analysator direkt in solche Kulturen ein.

Dabei können die Kulturen im Licht autotroph oder im Dunkeln heterotroph angezogen werden. Der Analysator wird dazu in der Weise gestaltet, daß eine pH-Meßelektrode seitlich mit 2 Lichtleitkabeln gekoppelt wird, die Licht definierter und unterschiedlicher Wellenlängen in die Zellsuspension leiten, das nach dem Passieren einer Meßstrecke in der Zellsuspension über Phototransistoren wieder aufgefangen wird und mit den pH-Werten zur Auswertung den Meßgeräten zugeleitet wird. Die Meßgeräte werden mit entsprechenden Registriergeräten gekoppelt, die es gestatten, Vergleichs- und Differenzanalysen von optischen Werten und pH-Werten unmittelbar darzustellen. Das Prinzip einer solchen Vorrichtung wird in der Fig. 1 dargestellt. Der Lichtkarussellthermostat 1 dient zur Anzucht der Suspensionskulturen bei definierter Temperatur und gleichen Lichtverhältnissen. Dabei werden die Kulturröhren 4 nach einer programmierten Steuerung kreisförmig in einem temperierten Wasserbad bewegt. Der Lichtkarussellthermostat ist mit dem Tauchheber 2 gekoppelt, der den Analysator 3 zur optischen Analyse sowie zur Ionenaustauschanalyse trägt. Durch Eintauchen des Analysators in die Suspensionskultur oder Probenzuführung mittels Pumpe in eine Durchflußküvette erfolgen die Analysen. Die so erhaltenen Signale der optischen und Ionenaustauschanalyse werden über einen mV-Verstärker und Operator jeweils entsprechenden mV-Schreibern zugeleitet und registriert.

Die Fig. 2 zeigt das Grundprinzip des speziellen Analysators für eine gleichzeitige optische und Ionenaustauschanalyse. Die pH-Meßelektrode 1 ist zeitlich mit zwei Lichtleitkabeln gekoppelt, die Licht unterschiedlicher definierter Wellenlängen zuführen, das nach Durchstrahlen einer Meßstrecke 4 von Phototransistoren 3 wieder aufgefangen wird. Die erhaltenen Signale werden verstärkt, gegebenenfalls verglichen und anschließend registriert.

Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Von der zu prüfenden Substanz A werden in einem Autotrophtest die Beeinflussungen der optischen Eigenschaften bei 680 und 759 nm sowie des pH-Wertes während des Wachstums von Chlorellasuspensionen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung untersucht. Hierzu werden frisch geschlüpfte Aplanosporen synchroner Kulturen einzelliger Grünalgen der Species *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, Stamm BÖHM und BURNS 1972/1 in eine anorganische Nährlösung N so überführt, daß im Autotrophtest jeder Kubikzentimeter der Suspension etwa sechs Millionen Algenzellen enthält.

1 l der Kultur-Nährlösung N setzt sich dabei aus den drei Teilnährlösungen N₁, N₂ und N₃ zusammen:

$1000 \text{ ml} = 998 \text{ cm}^3 \text{ N}_1 + 1 \text{ cm}^3 \text{ N}_2 + 1 \text{ cm}^3 \text{ N}_3$.

Für die Nährlösung N₁ werden zunächst die Stammlösungen 1 bis 4 durch Abfüllen der genannten Substanzmengen mit Aqua dest. hergestellt:

Stammlösung 1: $100 \text{ g K NO}_3 / 1000 \text{ cm}^3$

Stammlösung 2: $25 \text{ g Ca Cl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O} / 1000 \text{ cm}^3$

Stammlösung 3: $250 \text{ g Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} / 1000 \text{ cm}^3$

Stammlösung 4: $160 \text{ g K H}_2 \text{ PO}_4 / 1000 \text{ cm}^3$

Aus je 5 cm^3 der Stammlösung 1, $0,5 \text{ cm}^3$ der Stammlösung 2, 1 cm^3 der Stammlösung 3 und 5 cm^3 der Stammlösung 4 werden durch Auffüllen mit destilliertem Wasser entweder 1000 cm^3 bzw. bei Beachtung der entsprechenden Verhältnisse eine andere gewünschte Menge der Nährlösung N₁ hergestellt.

Die Nährlösungen N₂ und N₃ enthalten in 1000 cm^3 Lösung 61 mg $\text{H}_3 \text{ BO}_3$, 169 mg $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 287 mg $\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 mg $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 12,4 mg $(\text{NH}_4)_2 \text{ MoO}_4$ bzw. 6,9 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 9,3 g Na-EDTA.

Je 80 cm^3 der so hergestellten Suspension werden in je eine Kulturröhre eingebracht und mit je 1 cm^3 verschiedener konzentrierter wäßriger Lösung der zu prüfenden Substanz A beimpft. Die so vorgeschalteten Kulturröhren werden dann in den „Licht-Karussellthermostaten“ der erfindungsgemäßen Vorrichtung eingesetzt, durch ein Gemisch aus gereinigter Luft mit 2 Vol. % Kohlendioxid begast und bei $37,5^\circ \text{C}$ belichtet, so daß alle erforderlichen Voraussetzungen für die Photosynthese gegeben sind. Die Analysen der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm und des pH-Wertes der Suspensionen erfolgten in diesem Fall in der in situ-Technik mit Hilfe des beschriebenen Analysators.

Die Ergebnisse der Analysen sind den Fig. 3 A₃ und A₅, Fig. 4, A₇ und Fig. 5, A₈–A₁₂ zu entnehmen.

Die Fig. 3, A₃ enthält die dekadischen Logarithmen der Extinktionsmessungen bei 680 nm für die unbehandelte Kontrolle K und mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen der Substanz A versetzten Proben 1 bis 4 und Fig. 3, A₅ die entsprechenden Ergebnisse solcher Extinktionsmessungen bei 750 nm. Während in Fig. 3, A₃ erst nach einiger Zeit ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt nachweisbar ist, der bis zum Ende des Versuchs erhalten bleibt, übersteigen in Fig. 3, A₅ die Extinktionsmessungen bei 750 nm auch Konzentrationsabhängig sogar den Kontrollwert, was auf eine Beeinflussung der Streueigenschaften der Zellen durch Substanz A zurückzuführen sein dürfte. Nach etwa 4 Stunden stimmen die Extinktionswerte behandelter und unbehandelter Proben wieder weitgehend überein. Erst danach erweisen sich die Proben 1 bis 4 auch bei dieser Wellenlänge als merklich gehemmt.

Deutlich zeigen sich die unterschiedlichen Beeinflussungen der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm bei Korrelationen der dekadischen Logarithmen der Extinktionswerte zueinander bzw. bei Auftragungen der Q-Werte, $Q = E_{680}/E_{750}$, in Abhängigkeit von der Wirkdauer.

Zu weiterreichenden Schlußfolgerungen gelangt man, wenn die Analysenergebnisse der pH-Wertbeeinflussungen, die proportional mit den Beeinflussungen des Stickstoffhaushaltes der Zellen korrespondieren, in die vergleichenden Betrachtungen einbezogen werden. In Abhängigkeit vom Anfangs-pH-Wert der substanzbehandelten Suspensionen lassen sich prinzipiell drei Typen von pH-Zeit-Wirkbilder unterscheiden, wie es anhand der Wirkbilder Fig. 4, C, B und A₇ für die Effektoren A, B und C in Fig. 4 illustriert wird.

Die Fig. 4, A₇ zeigt die Analysenergebnisse der wachstumsbedingten pH-Wertbeeinflussungen, die durch die Substanz A determiniert sind. Auffällig ist hier neben der dosisabhängigen Verringerung der pH-Wertzunahme eine starke dosisabhängige Absenkung des Anfangs-pH-Wertes, die durch die Säure-Basen-Eigenschaften der Substanz A bestimmt wird, und eine zur Kontrolle vergleichsweise überhöhte pH-Wert Beeinflussung durch Dosis 1. Einen besseren Überblick dieses Sachverhaltes vermittelt das normierte Wirkbild Fig. 5, A₈. Im Unterschied zu Fig. 4, A₇ wurden die einzelnen pH-Zeitkurven parallel zur Zeitachse so angehoben, daß die Anfangs-pH-Werte aller Graphen mit dem der Kontrolle übereinstimmen.

Auftragungen der lg E-Daten für 680 und 750 nm in Abhängigkeit der entsprechenden pH-Werte zeigt für beide Wellenlängen weitgehend vergleichbare Kurvenverläufe der lg E-pH-Kurven für die Kontrollen und substanzbehandelten Suspensionen, Fig. 5, A₉/A₁₀. Die entsprechend normierten Wirkbilder Fig. 5, A₁₁, bzw. A₁₂ zeigen, daß mit größer werdender Dosis die wachstumsbedingte pH-Wert-Zunahme vergleichsweise zu den optischen Eigenschaften zunehmend stärker gehemmt wird. Damit kann aus den gezeigten Analysenergebnissen für die Beeinflussung autotroph kultivierter Chlorellasuspensionen geschlußfolgert werden, daß der Effektor A ein vorrangiger Hemmer des Stickstoffhaushaltes ist.

2. Ausführungsbeispiel

Mit Substanz E wurde wie im 1. Ausführungsbeispiel verfahren. Die Analysen der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm und des pH-Wertes der Suspensionen erfolgten ähnlich wie im 1. Ausführungsbeispiel in der „in situ“-Technik, aber mit einem modifizierten Analysator, bei dem das Licht definierter Wellenlänge nach Passieren der Meßstrecke über Optokabel dem Empfänger zugeleitet wird.

Von der Substanz E, über deren Analysenergebnisse und Auswertungen Fig. 6 informiert, wurde der Einfluß von 6 abgestuft zunehmenden Konzentrationen 1 bis 6 auf Wachstum und Stickstoffhaushalt von Chlorellasuspensionen untersucht. Ein Vergleich der Wirkbilder für die Wachstumsbeeinflussungen, die durch Extinktionsmessungen bei 680 nm, Fig. 6, E₁, bzw. bei 750 nm, Fig. 6, E₂ erhalten wurden, mit dem Wirkbild für die Beeinflussung des pH-Wertes der Suspensionen der Substanz E, Fig. 6, E₃, zeigt deutliche Unterschiede im Einsetzen, Verlauf und in der Beständigkeit der Wirkungsausprägung in Abhängigkeit von der Dosis und von der Einwirkungsdauer des Effektors. Das wird besonders durch die unterschiedlichen dosisabhängigen Wirkungsverläufe in den Wirkbildern Fig. 6, E₄ bis E₆ verdeutlicht. Auftragungen der Logarithmen der Extinktionen bei 680 und 750 nm zueinander, Fig. 6, E₄, zeigen für die Dosen 2 bis 4 eine zunehmend stärkere Wachstumshemmung bei 680 nm an. Das weist diese Substanz als einen Photosynthesehemmer aus. Ein Vergleich der Wachstumsbeeinflussungen bei 680 bzw. 750 nm mit der entsprechenden Beeinflussung des pH-Wertes, Fig. 6, E₅ und E₆, illustrieren in ähnlicher Weise besonders in den ersten Wirkungskurvenabschnitten, daß mit zunehmenden Dosen der Substanz E die optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm stärker beeinflußt werden als der wachstumsbedingte Stickstoffhaushalt. Damit kann Substanz E als primärer Photosyntheseeffektor bestätigt werden.

3. Ausführungsbeispiel

Auch mit Substanz F wurde wie im 1. Ausführungsbeispiel verfahren. Allerdings erfolgten die Analysen der optischen Eigenschaften bei 680 und 750 nm in einer spezifischen Durchlaufküvette, während der pH-Wert der Suspensionen in „in situ“-Technik mit Hilfe einer pH-Meßsonde, die mit der Ansaugvorrichtung für die Durchlaufküvette fest verbunden ist, analysiert wurde.

Die entsprechenden Analysenergebnisse für Substanz F sind der Fig. 7, F₁ bis F₆ zu entnehmen.

Auch hier zeigen die Fig. 7, F₁, F₂ und F₃ die zeitabhängigen Beeinflussungen der optischen Eigenschaften bei 680 nm, Fig. 7, F₁ und bei 750 nm, Fig. 7, F₂, sowie des pH-Wertes, Fig. 7, F₃. Eine Auftragung der Logarithmen der Extinktionen bei 680 und 750 nm gegeneinander, Fig. 7, F₄, zeigt auch hier, daß das Wachstum dosisabhängig bei 680 nm stärker gehemmt wird als bei 750 nm. Das weist Substanz F zunächst als einen vorrangigen Photosynthesehemmer aus. Aber einen Vergleich der Wachstumsbeeinflussungen mit der Beeinflussung des Stickstoffhaushaltes durch Substanz F in Form von Austragungen der Logarithmen der Extinktionen bei 680 nm, Fig. 7, F₅, bzw. bei 750 nm, Fig. 7, F₆, in Abhängigkeit vom pH-Wert der Suspensionen zeigt in beiden Wirkbildern, daß die wachstumsbedingte pH-Wert-Zunahme und damit der Stickstoffhaushalt mit zunehmender Dosis im ersten Wirksamkeitsabschnitt stärker gehemmt bzw. beeinflußt werden, als die Chlorophyllbildung oder das Zellwachstum. Gleichzeitig verdeutlicht Fig. 7, F₅, vergleichsweise zu Fig. 7, F₆, daß die pH-Wertbeeinflussung und damit die Störung des Stickstoffhaushaltes eine vergleichsweise stärkere Hemmung der Chlorophyllbildung nach sich zieht, wie die weiteren Verläufe der Graphen in Fig. 7, F₅ zeigen.

Damit kann Substanz F als ein primärer Effektor des Stickstoffhaushaltes eingestuft werden.

Vergleicht man die Aussagen der Fig. 2 bis 6 für die Substanzen A bis F miteinander, so wird deutlich, daß gleichzeitige pH-Wertmessungen, die nur eine von mehreren möglichen Ionenumsatzanalysen darstellen, neben Wachstumsanalysen in einem Arbeitsgang sehr differenzierte Aussagen hinsichtlich der Hauptwirkung und Charakterisierung der Wirkspezifität von Effektoren und damit eine sehr differenzierte Selektion solcher Effektoren ermöglichen.

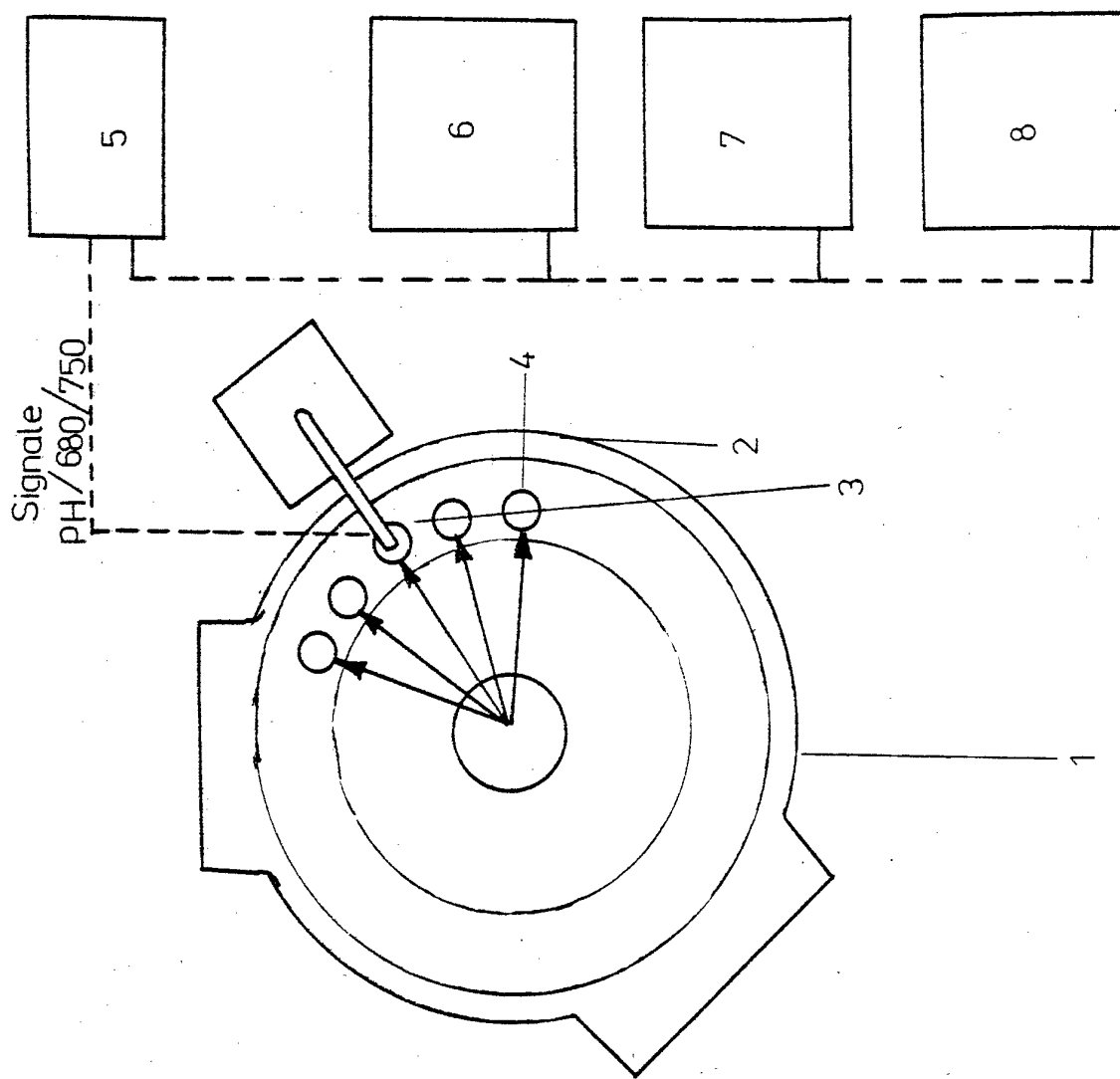


Fig.1

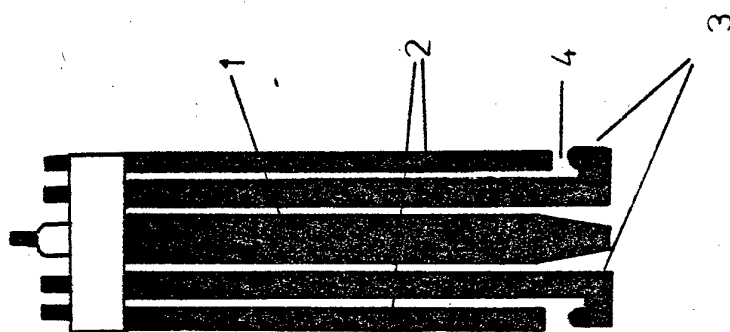
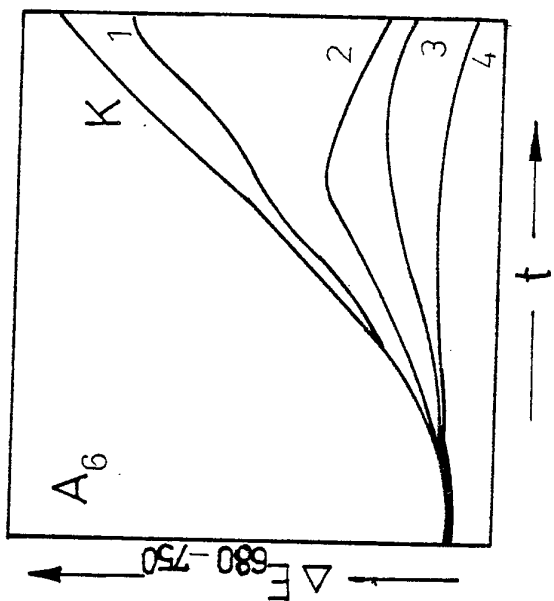
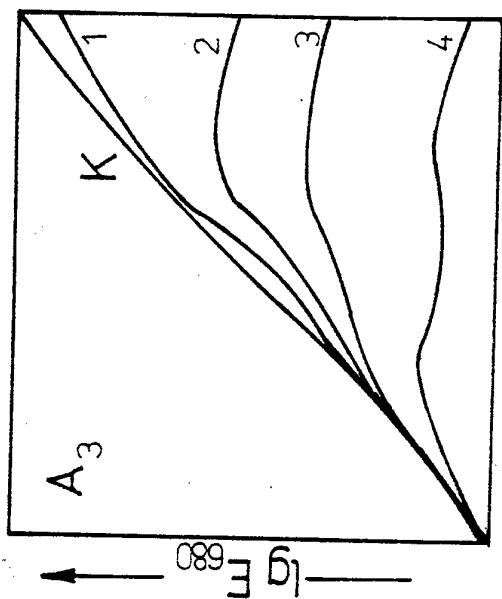
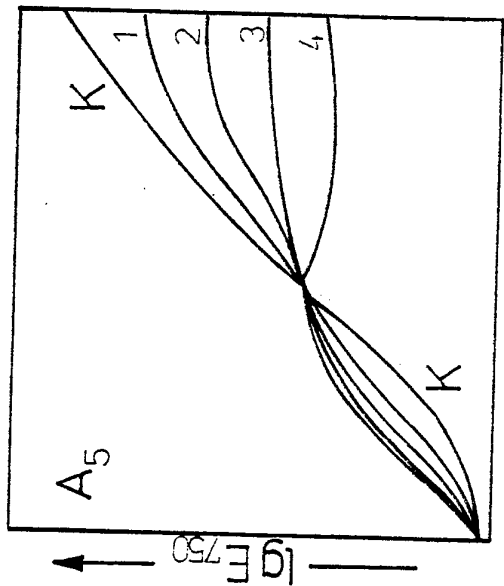
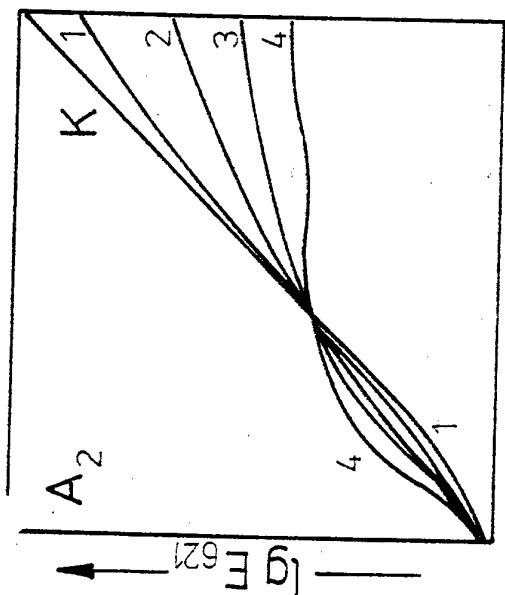
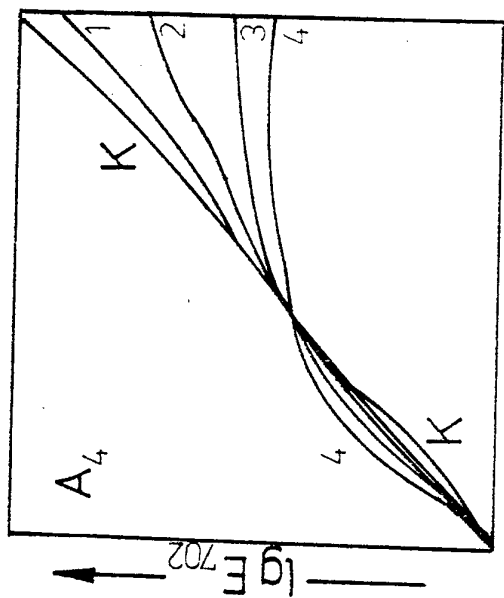
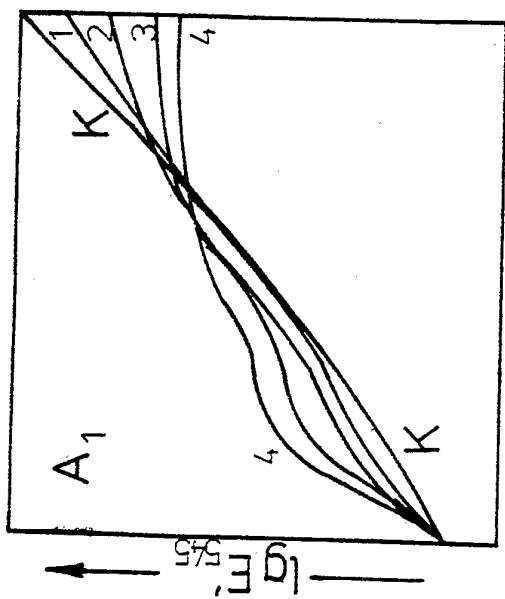


Fig.2



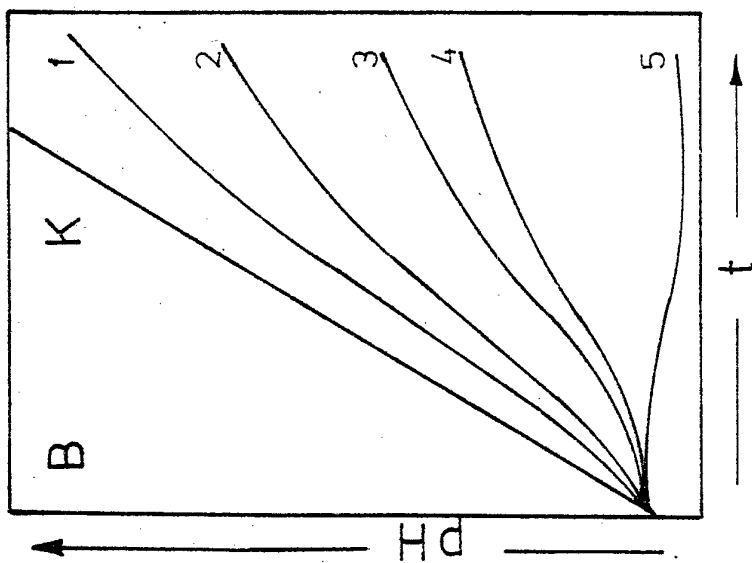
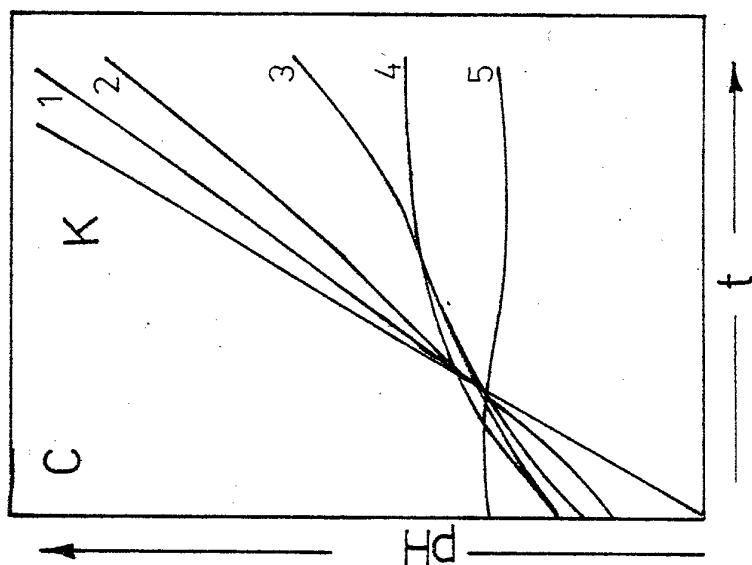
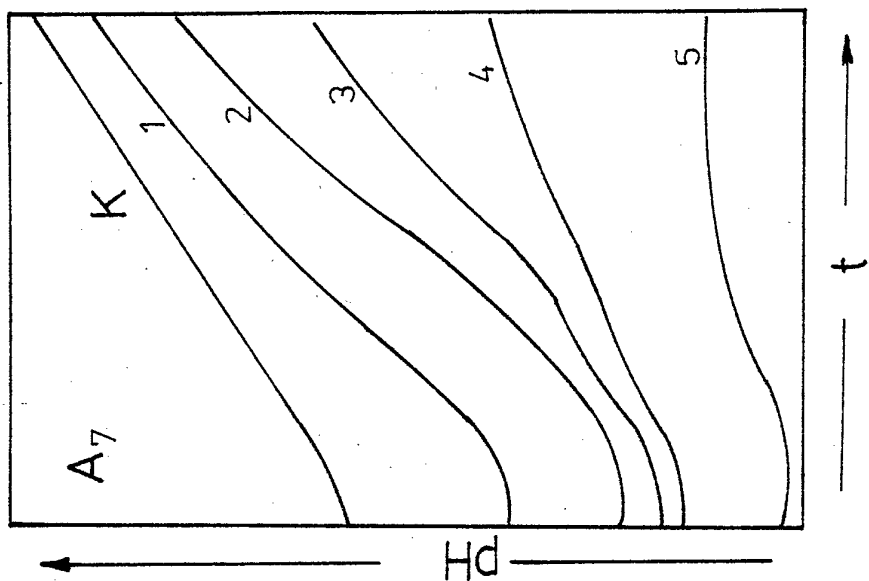


Fig.4

251084-0206716

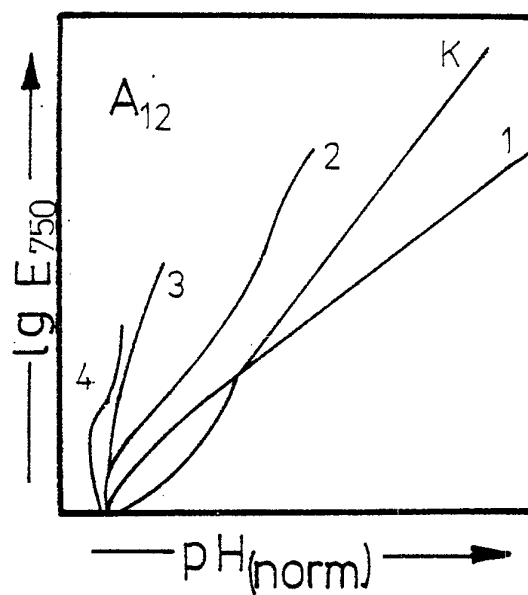
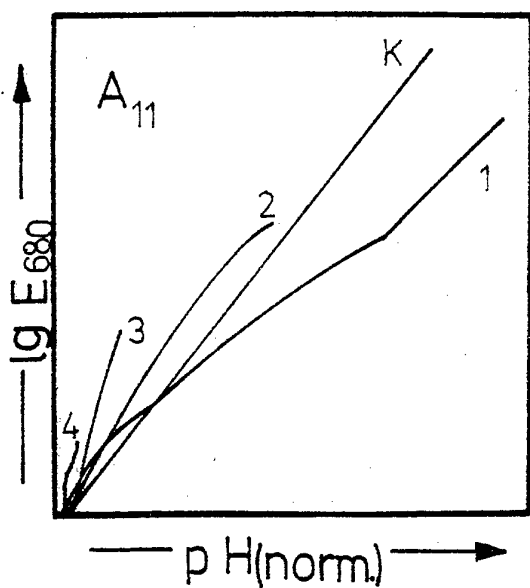
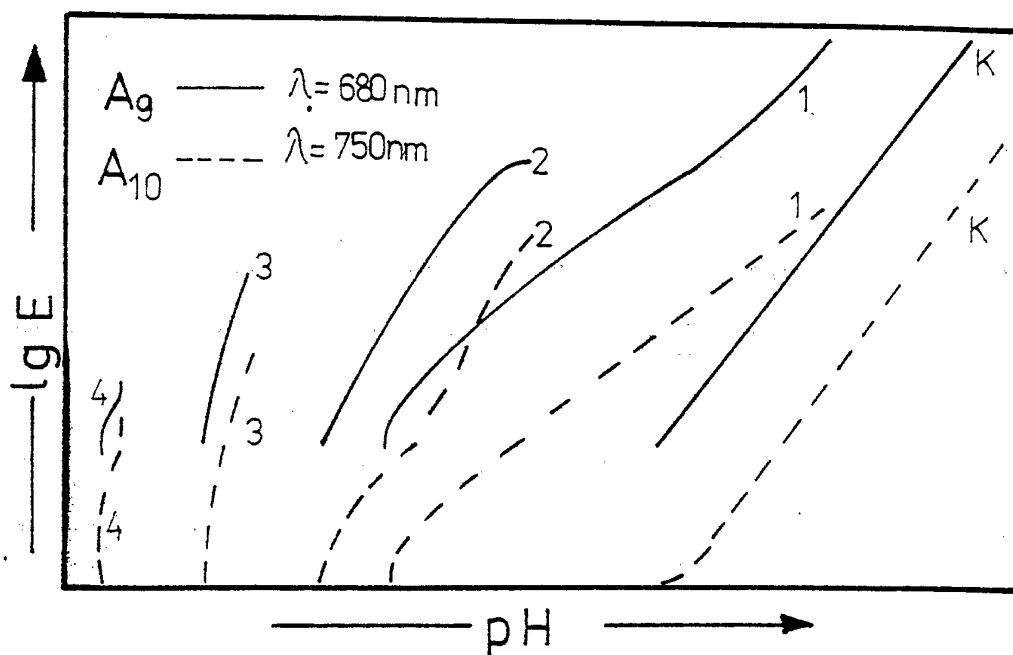
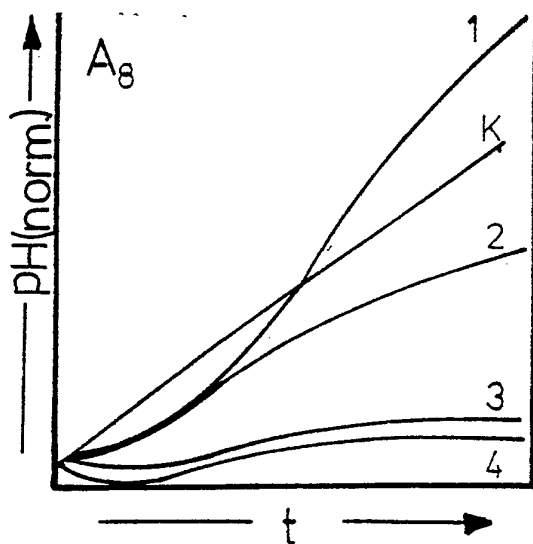


Fig.5

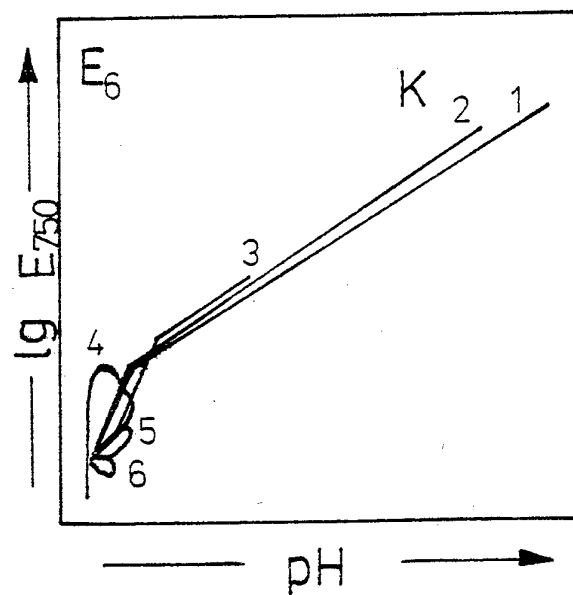
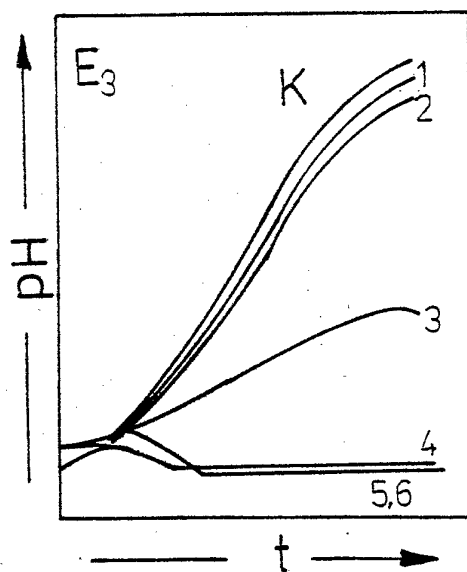
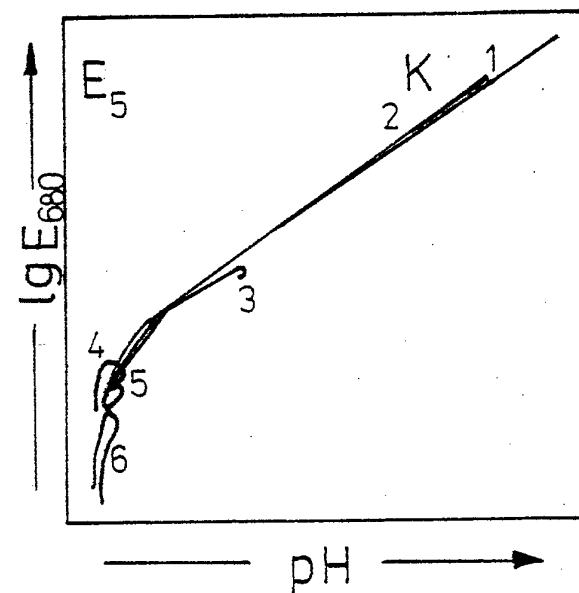
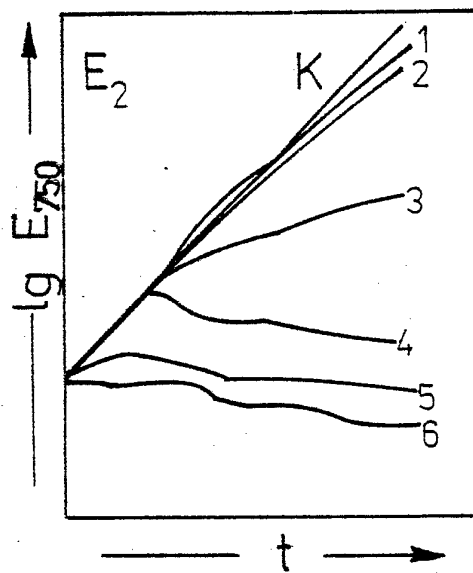
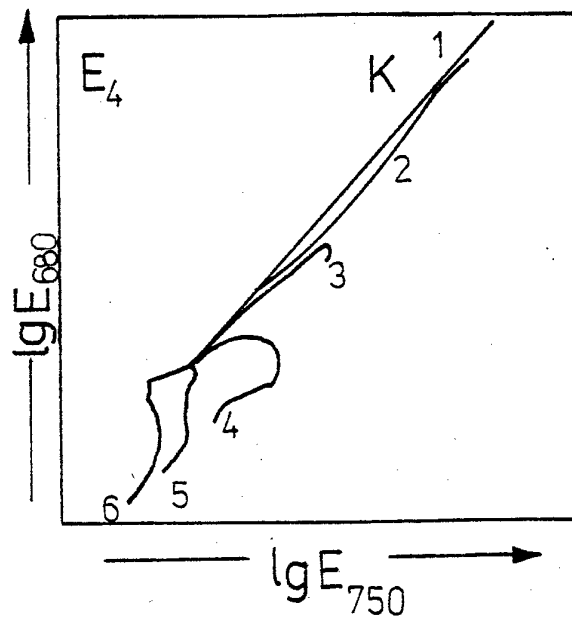
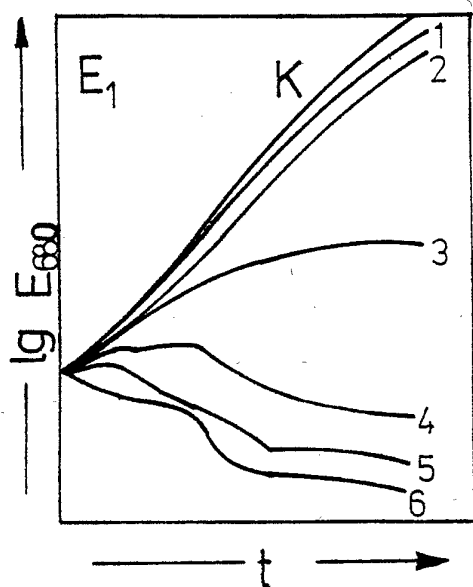


Fig. 6

251024-0206716

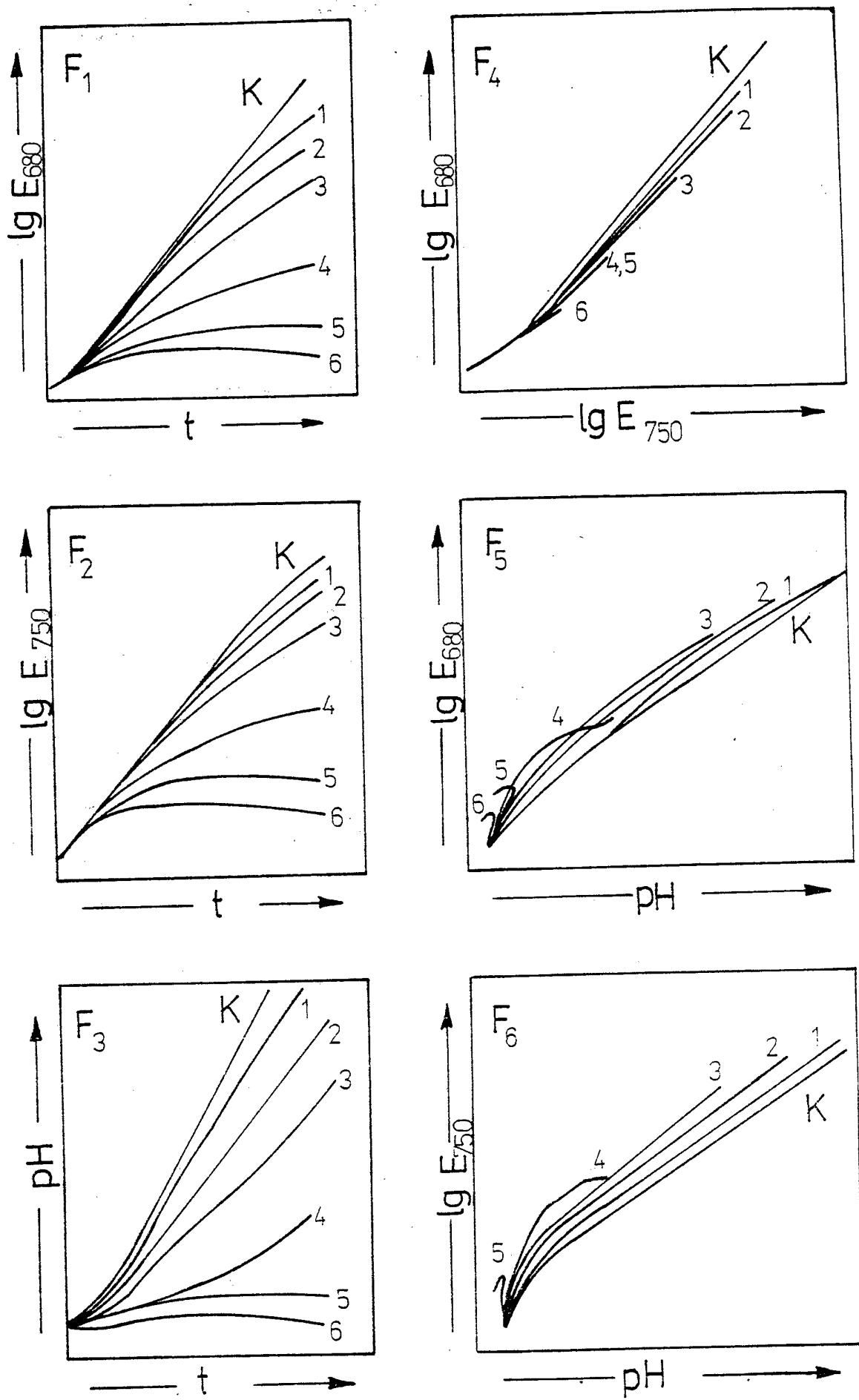


Fig. 7