



Opublikowano dnia 30 maja 1956 r.



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 36968

Kl. 42 1, 3/06

Ludwika Lepszowa

(Kraków, Polska)

Sposób elektrycznego pomiaru żywotności bakterii oraz urządzenie do wykonywania tego sposobu

Udzielono patentu z mocą od dnia 10 listopada 1952 r.

Wynalazek dotyczy sposobu elektrycznego pomiaru żywotności bakterii oraz urządzenia do wykonywania tego sposobu.

Znany dotychczas sposób pomiaru żywotności bakterii polega bądź na dokonywaniu posiewów bakterii na różne podłoża i kultywowaniu tych posiewów w odpowiedniej temperaturze, bądź też na wykorzystywaniu zjawiska kataforezy i mierzeniu szybkości ruchu bakterii w polu elektrycznym, zmieniającej się pod wpływem wszystkich tych czynników, które zmieniają i hamują żywotność bakterii.

Ponieważ wzrost bakterii, zależnie od ich rodzaju i stopnia hamowania ich żywotności, wymaga okresu czasu wynoszącego od 48 godzin do 3 miesięcy, przeto przy zastosowaniu pierwszego z wyżej wymienionych sposobów pomiaru żywotności bakterii, zahamowanie ich żywotności można stwierdzić dopiero po upływie tego czasu, drugi natomiast z podanych sposobów nie nadaje się do stosowania w praktyce, gdyż mikrosko-

powa metoda pomiaru szybkości kataforetycznej wymaga dokonania dużej liczby pomiarów czasu potrzebnego do przebycia przez bakterie pewnej określonej drogi w jednostkowym polu elektrycznym, wytworzonym przez prąd stały i wykonania przeliczeń licznych wzorów.

Niedogodności te usuwa sposób elektrycznego pomiaru żywotności bakterii, stanowiący przedmiot wynalazku i polegający na mierzeniu za pomocą podziałki śruby mikrometrycznej mikroskopu tylko głębokości warstwy cieczy, w której znajdują się badane bakterie, posiadające mierzoną szybkość kataforetyczną ($V' = 0$) równą zeru. Sposób według wynalazku nie wymaga zatem mierzenia czasu potrzebnego bakteriom na przebycie określonej drogi w jednostkowym polu elektrycznym wytworzonym przez prąd stały — jak to ma miejsce przy znanej dotychczas metodzie pomiaru żywotności bakterii.

Doświadczenia wykazały, że głębokość warstwy cieczy z bakteriami, którą oznacza się sym-

bolem X_{11} , zmienia się wraz ze zmianą szybkości kataforetycznej bakterii, a więc tym samym i żywotności bakterii.

Wynalazek jest bliżej wyjaśniony na rysunku, przedstawiającym schematycznie przykład wykonania urządzenia do wykonywania powyżej opisanego sposobu elektrycznego pomiaru żywotności bakterii. Sposób i urządzenie stanowiące przedmiot wynalazku, wykorzystując znane zjawisko elektroforezy, pozwalają na skrócenie czasu określenia żywotności bakterii do bardzo krótkiego okresu, bowiem zaledwie do 10—20 minut, przy czym wynik otrzymuje się w procentach w stosunku do prędkości elektroforetycznej bakterii świeżo wyhodowanych, czyli w stosunku do prędkości elektroforetycznej tak zwanych bakterii wyjściowych.

W myśl wynalazku w zagłębieniu płytki podstawowej *A*, do której przymocowane są najkorzystniej przestawnie, uchwyty *D*, służące do umocowania w nich kapilarów *E* z umieszczonymi w nich elektrodami platynowymi *B*, osadzona jest kuwetka *C*, składająca się z dwóch umieszczonych nad sobą szkiełek różnej długości, na dolnym z których, posiadającym większą długość, naklejone są równolegle dwa szklane pręciki jednakowej grubości i długości, nie uwidocznione na załączonym rysunku.

Do wspomnianych elektrod *B* przyłączony jest z jednej strony woltomierz *W*, z drugiej zaś strony miliamperomierz *mA* oraz opornik potencjometryczny *R*, do zacisków którego przyłączone jest dowolnego rodzaju źródło prądu stałego *F*.

Jeżeli na dolne szkiełko kuwetki *C* z naklejonymi na nim szklanymi pręcikami nalać kilka kropli cieczy, w której zawieszone są badane bakterie, i nakryć ją górnym szkiełkiem nakrywkowym, to między tymi szkiełkami otrzyma się równoległą warstwę cieczy z zawieszonymi w niej bakteriami, ograniczoną z góry i z dołu tymi szkiełkami oraz z obu boków dłuższych tych szkiełek wspomnianymi szklanymi pręcikami.

Następnie płytkę *A* wraz z kuwetką *C*, zawierającą ciecz z bakteriami, umieszcza się na stole mikroskopu lub ultramikroskopu i włącza prąd do elektrod *B*, które jak już wspomniano są umieszczone w kapilarach *E*. Kapilary *E* są zamocowane w uchwytych *D* pionowo. Elektrody *B* są przy tym tak ustawione, że ich dolne końce opierają się o dolne szkiełko kuwetki *C*. Takie ustawienie elektrod *B* w kapilarach zapewnia dobry ich styk z równoległą warstwą badanej cieczy dzięki włoskowatości oraz pozwala na łatwe usuwanie produktów elektrolizy.

Przy włączeniu elektrod *B* w obwód prądu elektrycznego, składającego się ze źródła prądu stałego *F*, np. baterii, anodowej lub prostownika ze stabilizatorem, opornika potencjonetycznego *R*, miliamperomierza *mA*, i równoległej warstwy cieczy, zawartej między szkiełkami kuwetki *C* — między elektrodami *B* wytwarza się pole elektryczne. Po włączeniu prądu obserwuje się przez okular mikroskopu bakterie wędrujące do katody lub anody, w zależności od znaku ich ładunku.

W urządzeniu według wynalazku prędkość elektroforetyczną (kataforetyczną) mierzy się zatem metodą mikroskopową lub ultramikroskopową, posługując się znanym wzorem na rzeczywistą szybkość w równoległej warstwie cieczy. Zakłada się przy tym, że obserwowana przez okular szybkość V' bakterii lub cząstek zawieszonych, lub cząstek roztworów koloidalnych jest wypadkową szybkości kataforetycznej bakterii (cząstek stałych zawiesiny) i prędkości cieczy (wody) pod wpływem wytworzonego pola elektrycznego. Szybkość rzeczywista V ruchu bakterii jest w każdej głębokości warstwy cieczy jednakowa dla danego rodzaju (szczepu) bakterii, natomiast szybkość samej cieczy zależy od głębokości warstwy, w której dokonano pomiaru. Szybkość ruchu bakterii, mierzona jako suma obu tych prędkości, zależy więc od głębokości warstwy zawiesiny.

Znany jest następujący wzór na głębokość warstwy cieczy, w której szybkość cieczy równa się zeru, czyli mierzona szybkość bakterii jest rzeczywistą szybkością ruchu bakterii:

$$X_1 = d \cdot \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{\sqrt{12}} \right) \quad (1)$$

Ze wzoru tego wynika, że ta głębokość X_1 warstwy cieczy zależy od grubości d tej warstwy.

W równoległej warstwie cieczy między szkiełkami kuwetki *C* znajduje się także taka głębokość, w której mierzona szybkość V' bakterii równa się zeru. Jeżeliby obserwować pod mikroskopem bakterie w tej właśnie warstwie, to zaobserwowano by, że bakterie te się nie poruszają, pomimo że znajdują się w polu elektrycznym.

Mając więc pewną warstwę zawiesiny o znanej zmierzonej grubości d , zawierającej zawieszone w niej bakterie, znajdujące się w polu elektrycznym, wytworzonym między elektrodami *B*, przez które przepływa prąd, jak również obliczwszy na podstawie wzoru (1) głębokość X_1 przystępuje się następnie do szukania za pomocą

mikroskopu takiej głębokości X_w w tej warstwie w której świeżo wyhodowane bakterie wyjściowe posiadają szybkość wyjściową V' równą zeru. Głębokość tę odczytuje się w następujący sposób za pomocą podziałki śruby mikrometrycznej mikroskopu:

Obserwuje się, począwszy od dna warstwy o grubości d , ruch bakterii, np. bakterium coli, i widzi się że są one przenoszone w kierunku katody. Następnie szuka się takiej głębokości, w której ruch tych bakterii odbywa się jeszcze w kierunku katody i głębokość tę odczytuje się na śrubie mikrometrycznej. Następnie odczytuje się w ten sam sposób głębokość, w której ruch bakterii odbywa się już w kierunku przeciwnym, to jest ku anodzie. Średnią arytmetyczną tych dwóch pomiarów oznacza się powyżej wspomnianym symbolem X_w . Następnie w tenże sposób wyznacza się X_m (mierzone) dla danej próbki bakterii tego samego szczepu, której żywotności się poszukuje. Należy zaznaczyć, że zarówno X_w jak i X_m wyznacza się w warstwie cieczy o tej samej grubości d , przy jednakowym napięciu i przy tej samej odległości elektrod B w obu przypadkach.

Na podstawie uzyskanych w ten sposób danych dla X_1 , X_w i X_m przy zastosowaniu określonego napięcia prądu i określonej odległości między elektrodowej, oblicza się w procentach żywotność Z bakterii według następującego stosunku, określając żywotność bakterii wyjściowej przez jej prędkość elektroforetyczną „wyjściową” jako 100%-ową.

$$\frac{X_w - X_1}{X_m - X_1} = \frac{100}{Z\%} \quad (2)$$

W przypadku gdy $X_m < X_1$ cm, wyrażenie $X_m - X_1$ staje się mniejsze od zera i wówczas szybkość kataforetyczna bakterii zmienia znak i żywotność bakterii zostaje całkowicie zahamowana.

Jeżeli zatem X_m jest mniejsze od X_1 , czyli X_m leży w zakresie liczb między 0 X_1 , to bez korzystania ze stosunku podanego we wzorze (2) można stwierdzić, że żywotność bakterii jest zahamowana. Procent żywotności oblicza się dla X_m , leżących w zakresie wartości X_1 X_w .

Jest rzeczą oczywistą, że podczas dokonywania pomiarów należy włączyć miliamperomierz mA i odczytywać głębokości przy ustalonym prądzie, kontrolując za pomocą woltomierza U napięcie na elektrodach B .

W przypadku gdy szybkość kataforetyczna bakterii jest > 0 , co ma np. miejsce przy bada-

niu żywotności gronkowca złocistego, żywotność procentową bakterii oblicza się ze wzoru:

$$\frac{X_1 - X_w}{X_1 - X_m} = \frac{100}{Z\%} \quad (3)$$

przy czym $X_1 > X_w$ i $X_1 > X_m$, lecz $X_m > X_w$

Jeżeli X_m leży w obrębie podziałki śruby mikrometrycznej mikroskopu między X_w X_1 , czyli jeżeli:

$$X_w < X_m < X_1$$

wówczas żywotność bakterii oblicza się na podstawie wzoru (3), przy czym im X_m jest większe, tym $Z\%$ jest mniejsze.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób elektrycznego pomiaru żywotności bakterii, prątków *B. C. G.* i bakterii innych szczepów plemników oraz innych ożywionych komórek, znamieny tym, że początkowo mierzy się za pomocą śruby mikrometrycznej mikroskopu lub ultramikroskopu taką głębokość (X_w) warstwy cieczy z zawieszonymi w niej ustrojami, umieszczonej między dwoma szkiełkami i ograniczonej bocznie dwoma szklanymi pręcikami, w której świeżo wyhodowane bakterie posiadają mierzoną szybkość elektroforetyczną równą zeru, a następnie dokonuje się pomiaru takiejże głębokości warstwy cieczy, w której bakterie tego samego szczepu co świeżo wyhodowane, lecz poddane działaniu czynnika hamującego żywotność tych ustrojów, wykazują mierzoną szybkość kataforetyczną (X_m) równą zeru, po czym na podstawie tych dwóch wartości (X_w) i (X_m) określa się żywotność danych ustrojów w procentach za pomocą wzoru

$\frac{X_w - X_1}{X_m - X_1} = \frac{100}{Z\%}$ dla ustrojów, których prędkość elektroforetyczna < 0 i za pomocą wzoru $\frac{X_1 - X_w}{X_1 - X_m} = \frac{100}{Z\%}$ dla ustrojów, których prędkość elektroforetyczna > 0 , gdzie

$$X_1 = d \cdot \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{\sqrt{12}} \right)$$

zaś d oznacza grubość warstwy cieczy.

2. Urządzenie do wykonywania sposobu według zastrz. 1, znamienne tym, że jest zaopatrzone w kuwetkę (C), składającą się z dwóch różnej długości szkiełek, umieszczonych jedno nad drugim, między którymi wstawione są jednakowej grubości i długości pręciki szklane, przy czym przestrzeń między tymi pręcikami oraz między szkłem dolnym i górnym jest wypełniona cieczą z ustrojami, których żywotność ma być

mierzona oraz wyposażona jest w elektrody, osadzone w kapilarach (E), umocowanych w uchwytach (D) płytki podstawowej (A), najlepiej nastawnych, wskutek czego odległość między tymi elektrodami może być dowolnie regulowana.

3. Urządzenie według zastrz. 2, znamienne tym, że kuwetka (C) jest umieszczona we wgłębieniu płytki podstawowej (A).

L u d w i k a L e p s z o w a

Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych

