

Středoškolská odborná činnost

Ústí nad Labem

2017

Kultivační komora

Radim Tauber

Obor SOČ: 10, Elektrotechnika, elektronika a telekomunikace

Škola : Spšul Resslova 5, Ústí nad Labem

Konzultant : Ing. Pavel Koblre

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, konzultace atd.) uvedené v seznamu zdrojů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Ústí nad Labem dne 14.3. 2017

Radim Tauber

Obsah

1	Abstrakt	4
2	Úvod	5
3	Prostředí pro kultivaci	6
3.1	Typy kultur.....	6
3.1	Živný roztok, hydrosféra, povrch kultivace	6
3.3	Atmosféra	7
3.4	Teplota	8
3.5	Sterilizace.....	8
3.5	Separace a založení nové kultury	9
4	Návrh kultivačního systému	9
4.1	Požadavky na kultivační podmínky	9
4.2	Návrh kultivačního systému	9
5	Praktická realizace konkrétního zařízení	11
4.1	Řešení kultivačního systému	11
5.2	Elektronická část systému	14
5.2.1	Řídící a senzorová část	15
5.2.2	Zdrojová a spínací část.....	16
5.2.3	Injekční pumpy	18
5.3	Konstrukční část systému	19
5.4	Řízení a komunikace.....	21
6	Možné vylepšení a pokračování.....	22
7	Závěr	23
8	Zdroje a použitá literatura	24

Abstrakt

Tato práce shrnuje základní poznatky o kultivaci savčích tkáňových kultur. Tyto poznatky jsou následně využity pro návrh kultivačního systému a jeho fyzickou realizaci. Přitom si dávám za cíl využít jiné než standardně užívané technologie v kultivacích. Cílem je plně autonomní kultivační komora, která nepotřebuje údržbu člověka minimálně 30 dní, a přitom se vejde na běžný pracovní stůl. Dalším požadavkem je, aby mohla být umístěna i v běžném nesterilním prostředí. Hotový přístroj demonstruje udržování základních kultivačních parametrů a je od samého začátku navržen a zkonstruován tak, aby byl plně funkční. Avšak pro reálnou kultivaci zde chybí autoklávovatelná skleněná krytka kultivační nádoby, jejíž realizace byla pro soutěž příliš finančně nákladná. Pro demonstraci základních kultivačních funkcí je zde nahrazena krytkou plastovou.

Klíčová slova

Kultivace, savčí tkáňové kultury

Úvod

Výpočetní technika prošla během posledních několika desítek let bouřlivým rozvojem, stejně tak i jiné technické obory, zejména pak informatika, kde počítače člověka předčí mnohonásobně. Naši nejpokročilejší vědou musí být bezpochyby matematika a teoretická fyzika, které si drží náskok oproti ostatním oborům tak 100 let. Jejich schopnost předvídat je vždy mnohem dál než samotná realizace v dané době. Kdybych to měl porovnat s biologickými, zejména pak buněčnými a molekulárně biologickými obory, nenacházím zde mnoho situací, kde by teorie předběhla praxi. Biologická technika stojí na pár, dnes již zastaralých technologiích. Nové inovace samozřejmě existují, ale nejsou příliš dostupné. Samotná realizace experimentálního bádání může být drahá a zdlouhavá, navíc v biologii je snad více než v jiném oboru potřebná zpětná vazba ve formě měření, získávání empirických dat a výsledků experimentů. Tento celý proces poměrně zásadně brzdí vývoj v oblasti biologie. Řešení nalézám v usnadnění dílčí vědecké práce, která nesouvisí nijak s výzkumem, ale pro jeho realizaci je zásadní. A proto jsem se rozhodl napsat práci o usnadnění kultivace buněk in vitro. Věřím, že právě kultivace buněk je zásadní pro další rozvoj studia oborů jako je genové inženýrství, onkologie, toxikologie, farmacie, nano-studia, a mnoho dalších oborů, ve kterých jde o dlouhodobý výzkum kultur buněk. Navíc usnadnění kultivace může mít uplatnění i ve výuce a v celé škále dalších oborů

Má práce má tři hlavní části:

1. Snažím se analyzovat obecné kultivační požadavky a převést je na technické prostředky.
2. Navrhnout vlastní koncepci kultivačního zařízení, které by mělo usnadnit vědeckou činnost. To znamená zařízení, které umožní: autonomní řízení vyměňování živin a udržování životních funkcí včetně sterility, zároveň však splní i následující parametry: minimální rozměry, levná sériová výroba a prodej, rozšířitelný systém pro bezstarostné aplikace v různých procesech.
3. Vlastní realizace reálného zařízení jako prototyp a jeho zprovoznění.

V závěru úvodu bych chtěl zdůraznit, že je pravdou, že v rámci experimentů vznikají mnohem rozsáhlejší a složitější kultivační technologie, jako například matrix pro kultivaci neuronů. Ale zásadním problémem těchto projektů je, že nejsou příliš univerzální a dostupné.

3 Prostředí pro kultivaci

3.1 Typy kultur

Kultivací se v mikrobiologii a buněčné biologii rozumí cílené udržování životních (kultivačních) podmínek určitého organismu, který jsme odebrali z jeho přirozeného prostředí, tedy kultivace in-vitro. Kultivovat se dají prakticky všechny biologické organismy. Pro různé organismy existují různé způsoby kultivace, jiné podmínky a jiné techniky. V zásadě se dají kultivace rozdělit na:

- kultivace bakterií
- kultivace rostlin
- kultivace viru
- kultivace živočichů

Kultivace bakterií má asi největší využití, a to jak pro vědecký výzkum nebo analýzu, tak pro komerční využití v potravinářství (například výroba jogurtu), čištění odpadních vod, rozklad biomasy na skládkách odpadu, rekultivační činnost. Kultivační podmínky se zde často velmi razantně liší, to ale přirozeně odpovídá i tomu, že bakterie jsou nejpočetnější a nejrozmanitější skupina organismů na zemi. Ačkoliv se dá kultura připravit i v nesterilních podmínkách na „starém pečivu“, v praxi se zpravidla využívají fermentátory a bioreaktory, které upravují atmosféru a hydrosféru tak, aby kultura přežila. Samozřejmě při zachování sterility, aby nebyla kultura ohrožena.

Kultivace rostlin je obecně nejsnadnější technika, i když se značně liší, v závislosti na tom, jestli budeme kultivovat například řasu nebo rostlinu s více strukturovaným tělem. Prakticky zde ale nehrozí tak vysoké riziko kontaminace. Provozní teplota kultury se může pohybovat ve velkých rozmezích a přísun živin nemusí být tak častý, protože rostliny umí na rozdíl od živočichů fotosyntetizovat, přísun živin může být klidně i jednou za několik let.

Kultivace viru je zvláštní v tom, že se vlastně provádí taková kultivace kultury v jiné kultuře. Viry totiž pro své přežití potřebují jiný hostitelský organizmus. Takže v praxi necháme viry, aby nakazily buněčnou kulturu případně embryu.

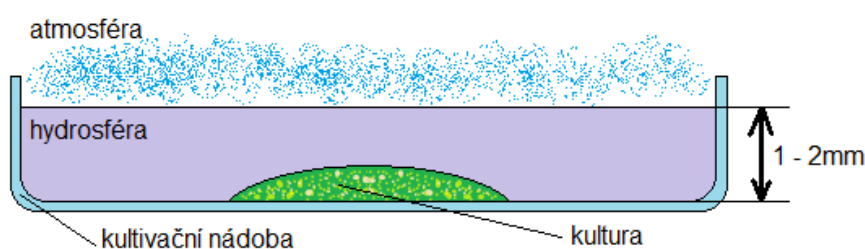
U živočichů se dají kultivovat buňky hmyzu a jiných bezobratlých, populace protist, avšak převážně se kultivují tkáně obratlovců. V mojí práci se budu zabývat výhradně kultivací tkání savců o jejich kultivačních podmínkách se zmíním níže.

3.2 Živný roztok, hydrosféra, povrch kultivace

Živné sérum, které tvoří hydrosféru, je to první s čím se kultura setkává. Jendá se tedy o to, v čem kultura plave a, nebo čím je zalita, pokud je přichycena ke dnu kultivační nádoby. Kultivační sérum má zpravidla napodobit funkci extracelulární matrix tedy mezibuněčné kapaliny. Složení kultivačního séra se většinou podobá krevní plazmě, ze které se také vyrábí a to tak, že se z ní odseparují nežádoucí složky jako jsou hormony, krvinky a proteiny pro srážení krve. Tudíž kultivační sérum je tvořeno: vodou, a živinami ve formě malých molekul tj. cukry, tuky, soli atd. Navíc se kultivační sérum obohacuje o antibiotika většinou penicilin nebo streptomycin, dále o růstové faktory a indikační látky, kterými jsou například barviva pro indikaci vyčerpání živin.

Záměrně jsem do názvu uvedl hydrosféra, protože kultivační sérum neplní pouze roli výživného faktoru, ale také média pro přenos požadovaného tepla k buňkám. Kultivovaná tkáň nemá žádný oběhový systém, který by zásoboval buňky kyslíkem, proto musí médium plnit i tuto funkci, tedy přenos kyslíku z interní atmosféry k buňkám, aby mohly dýchat. Buňky nemohou být v přímém kontaktu s atmosférou. Kyslík se k buňkám dostává difúzí přes médium, proto musí být vrstva dostatečně tenká, aby transport probíhal rychle, stejně jako v původním prostředí.

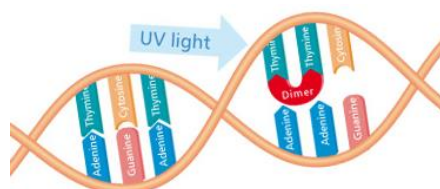
Při výběru povrchu kultivace musíme zohlednit, jaký typ buněk chceme kultivovat. Například pokud se bude jednat o kultivaci krevních buněk, požadavky musí být směřovány na volnou nepřichycenou kultivaci. V případě pevných struktur, jakými jsou například fibroblasty, je třeba kultivovat na rovném povrchu sklo, ocel, plast, s různými úrovněmi hladkosti / hrubosti povrchu. V některých případech se dno vyleje tenkou vrstvou agaru.



Obr. 1: Nádoba z kulturou v slabé vrstvě séra.

3.3 Atmosféra

Interní atmosféra má stejný atmosférický tlak jako naše atmosféra, má i stejné složení až na CO_2 který je zde zastoupen v 5%. Atmosféra musí být samozřejmě sterilní. Většinou se používá přímo ta okolní, jen se v ní zvýší obsah CO_2 a vysterilizuje se. Je přirozené, že se v atmosféře mohou nacházet škodlivé mikroorganismy. Nejčastěji se jedná o bakterie a spory plísní, které se obtížně hubí a pro své malé rozměry představují největší problém. Nakažení virem je nepravděpodobné. V zásadě se v praxi atmosféra čistí pomocí mikrobiologických filtrů s průměrem pórů 0,2 μm , a nebo sterilizací pomocí UV-C záření o vlnové délce 254 nm, které u živých organismů způsobuje vznik reaktivních forem kyslíku, dimerizaci pirimidinových bází v DNA a zabraňuje tak její replikaci z důvodu vnitřních regulačních mechanismů, a nebo natolik poškodí genom že je jejich genetická informace irelevantní. Atmosféra by navíc měla mít takovou vlhkost, aby se neodpařovalo kultivační sérum.



Obr. 2: dimerizace DNA převzato (<http://sterilinnovations.com/technology.html>)

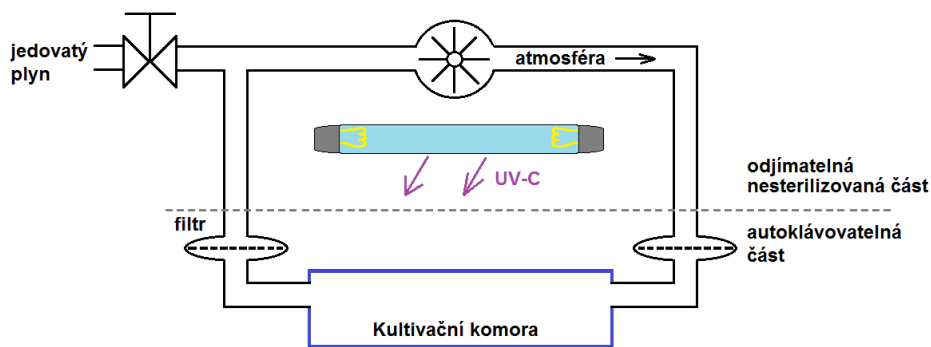
3.4 Teplota

Teplota kultivačního séra by měla být stejná jako teplota prostředí (organismu), ze kterého kultura pochází. Standardně se používá 37°C. Avšak mělo by být možné teplotu měnit pro zvláštní účely. Dalším požadavkem je kontrola teploty atmosféry, aby nedocházelo k odpařování, kultivačního séra a tím k jeho houstnutí.

3.5 Sterilizace

Sterilizace kultivačního zařízení se provádí před každou novou kultivací. Záleží na tom, jaký má náš systém parametry a podle toho volíme sterilizaci. Pro samostatnou dezinfekci jednotlivých komponent a jejich očištění od biologických nánosů používáme většinou autokláv, který mikroorganismy ničí nasycenou vodní parou při vysoké teplotě (121 °C) a zvýšeném tlaku, nebo lze použít chemické látky založené na směsích oxidačních činidel jako například látky obsahující chlór, alkohol, aldehydy, kvartérní amoniové soli, tenzidy apod. Pro sterilizaci prostředí můžeme použít UV-C záření a pracovat v laminárním boxu. Pro sterilizaci samostatné kultivační nádoby/misky je nejvhodnější použít ke sterilizaci právě autoklavování, protože kultivační nádobu stačí uzavřít víkem a výstupy opatřit filtry s póry 0,2 µm, které před autoklávem obalíme do ochranného obalu, aby se filtry nepoškodily. Takto vysterilizovanou kultivační nádobu lze pak opět zapojit do systému jako sterilní. Navíc se při správném seřízení autoklavu dá sterilizovat i kultivační médium. Je možné též využít již hotovou sterilní nádobu, která se používá jednorázově. Těm se ale v mé práci nevěnuji.

Vysterilizovaná nádoba opatřená filtry účinně zabrání kontaminaci bakteriemi nebo sporami plísní. Stále tu však existuje málo pravděpodobné riziko vzniku virové nákazy. Tento problém se dá vyřešit napuštěním komory jedovatým plynem nebo ionizovaným vzduchem (ozonem), který vzniká jako vedlejší produkt UV-C záření. I UV-C záření můžeme použít pro sterilizaci a to tak, že část nádoby bude průhledná skrze křemenné sklo a my necháme nádobou cirkulovat proud vzduchu.



Obr. 3: sterilizační metody



Obr. 4: injekční filtr převzato (<https://www.coleparmer.com/c/syringe-filters>)

3.6 Separace a založení nové kultury

Pro přípravu buněčné kultury je nejjednodušší použít takovou tkáň, která obsahuje větší množství zárodečných nebo nediferencovaných buněk (u buněk rakovinných taková selekce z principu není).

Při odebírání buněk z živého organismu je nejprve nutné mechanicky oddělit masu tkání, z které chceme buňky dále kultivovat. Následně je nutné masu rozložit na jednotlivé buňky a vybrat daný druh tkáně ke kultivaci. Tkáně se mohou rozkládat například použitím enzymu trypsinu spolu s chelatačním činidlem EDTA.

Veškerá manipulace s kulturou musí probíhat velmi opatrně, aby se nám s ní do komory nedostala i nějaká infekce. Pracovat můžeme například v laminárním boxu a se sterilními pomůckami. Takto budeme postupovat i při odebírání vzorků z kultury a při jejich přemísťování, které se provádí u rychle se množících linií. Buňky by se jinak začaly vrstvit a postupně odumírat.

4 Návrh kultivačního systému

4.1 Požadavky na kultivační podmínky

Z předchozího rozboru požadavků na kultivování vyplívá, že je nutné zajistit následující parametry

- Konstantní teplota kultivačního média a s ní i samotné kultury
- Zabránění odpařování média
- Periodická výměna kultivačního média
- Vhodný kultivační povrch sklo, ocel, silikon, či nějaký biopolymer
- Periodická výměna kyslíku v atmosféře
- Udržování hladiny CO_2 v atmosféře na úrovni 5%
- Stálá sterilita atmosféry
- Stálá sterilita v kultivační komoře
- Manipulovatelnost s kulturou
- Možnost analýzy kultury

4.2 Návrh kultivačního systému

1) Za předpokladu, že bude kultivační komora sloužit pro opakované dlouhodobé kultivace musí být kultivační nádoba z materiálů, které jsou dostatečně odolné a časově stálé. Tuto vlastnost splňuje ocel nebo sklo. Ocel se však zdá vhodnější, protože má lepší tepelnou vodivost, která je důležitá, pro to, aby kultura měla stálou teplotu. Velmi důležitý je i podklad, na kterém se bude kultivovat. Pokud bude potřeba kultivovat na velmi hladkém povrchu, můžeme ke kultivaci použít skleněnou petriho misku, kterou do ocelové nádoby vložíme. Obecně se mi zdála ocel univerzálnější než sklo, jednak kvůli vyměnitelnosti kultivačních povrchů a také kvůli lepší odolnosti při manipulaci. Ocel jsem si pro konstrukci vybral také proto že je snadněji obrobitelná při vytváření prototypu.

2) Kultura musí být stále ohřívána na určitou teplotu ($37^{\circ}C$). Některé kultivační nádoby k tomuto účelu používají lampu, která ale nedokáže sama hřát na požadovanou teplotu

a teplota se zde reguluje ztrátami. Já jsem vybral plošné tepelné těleso, které se samo dokáže ohřát na požadovanou teplotu a při malých rozměrech kultivační nádoby a velkém výkonu tělesa dochází k zanedbatelným ztrátám které, se dají dodatečně kompenzovat. Jeho nevýhodou je nelineární tepelný tok, který je ale hysterezi ocelové komory kompenzován. Hlavní předností tepelného tělesa jsou však jeho minimální rozměry, a přitom vysoká rychlost změn teploty. Takže dokáže flexibilně reagovat při změně teplot.

3) Výměna CO_2 a výměna atmosféry musí probíhat vždy po určité době, kdy kultura spotřebuje kyslík. Veškerá atmosféra z komory se vysaje a zároveň se nasaje nová, následně se musí přidat CO_2 aby ho v atmosféře byla úroveň 5%. Výsledná atmosféra nesmí z komory unikat, aby se neměnila úroveň CO_2 . Za tímto účelem můžeme použít elektronické ventily, Já se však rozhodl oddělit atmosféru komory vodní bariérou v podobě probublávačky, do které je dovnitř i ven vzduch vháněn vzduchovou pumpou. CO_2 do ní také zavádím, ale elektronickým ventilem z CO_2 bomby. Probublávačka má tu výhodu, že se ve vodě zachycují nebezpečné mikroorganismy a mikroskopický prach, kterým by se systém po čase zanášel. Navíc pokud budu probublávačky z křemenného skla, můžeme je ozařovat UV-C zářením, čímž hrozbu kontaminace ještě minimalizujeme.

4) Jak již bylo na začátku zmíněno kultivační komora by měla pracovat pokud možno co nejvíce autonomně. Proto i výměna séra by měla být autonomní. Zpravidla se sérum vyměňuje po několika dnech. Přesný čas nelze předem odhadnout kvůli rozdílným nárokům různých kultur. Proto by měla Komora mít nastavitelné dávkování za určitou periodu. V lékařství se k takovýmto účelům používají injekční pumpy, které mohou být libovolně programovány. Tuto možnost jsem použil i já, protože je to snadná a přesná metoda výměny séra. Použil jsem dvě pumpy jednu pro odsávání spotřebovaného séra a druhou pumpu pro dávkování nového séra. Výhodou je i to, že injekce jsou snadno vyměnitelná komponenta. Z jedné injekce o objemu 50ml může být průměrná kultura vyživována až 20 dní.

5) sterilizace doplněného CO_2 a vyměněné atmosféry probíhá průchodem přes probublávačku a ozařováním UV-C zářením. Ve velkých kultivačních zařízeních se interní atmosféra běžně přečišťuje přes UV-C světlo. Tento systém jsem zde také začlenil, ve formě křemenných trubic s ventilátorem, kterým proudí vzduch interní atmosféry. Hlavním zdrojem sterility uvnitř kultivační nádoby by měly být filtry o velikosti pórů 0,2 μm . Ty se dají zapojit na vstupní i výstupní hadice pro výměnu interní atmosféry i na vstup a výstup injekčních pump, v kombinaci s autoklávováním vznikne uvnitř sterilní prostředí, do kterého se mohou dostat jen organismy s velikostí pod 0,2 μm se kterými by si mělo poradit UV-C světlo.

6) Řízení by se mělo skládat ze čtyř samostatných podprogramů.

a) Podprogram pro ovládání injekčních pump, který my měl pracovat jako periodický spouštěč. To znamená, že například podprogram zkontroluje, jestli už uběhla perioda výměny séra. Pokud ano spustí se série instrukcí, které budou po nějakou dobu ovládat motory pump a vymění sérum. Na závěr se vynuluje časování pro nové měření času. V opačném případě se bude pokračovat v časování. Zvláštní výjimkou jsou koncové polohy pump, ve kterých se musí dát znamení člověku, že má vyměnit sérum a vrátit pumpy do výchozích poloh.

b) Podprogram pro řízení teploty, musí pracovat neustále, a hlídat nastavenou hodnotu teploty. Pokud se teplota kultivační nádoby změní, například důsledkem změny teploty v místnosti, ve které máme kultivační zařízení, musí na to programový regulátor reagovat.

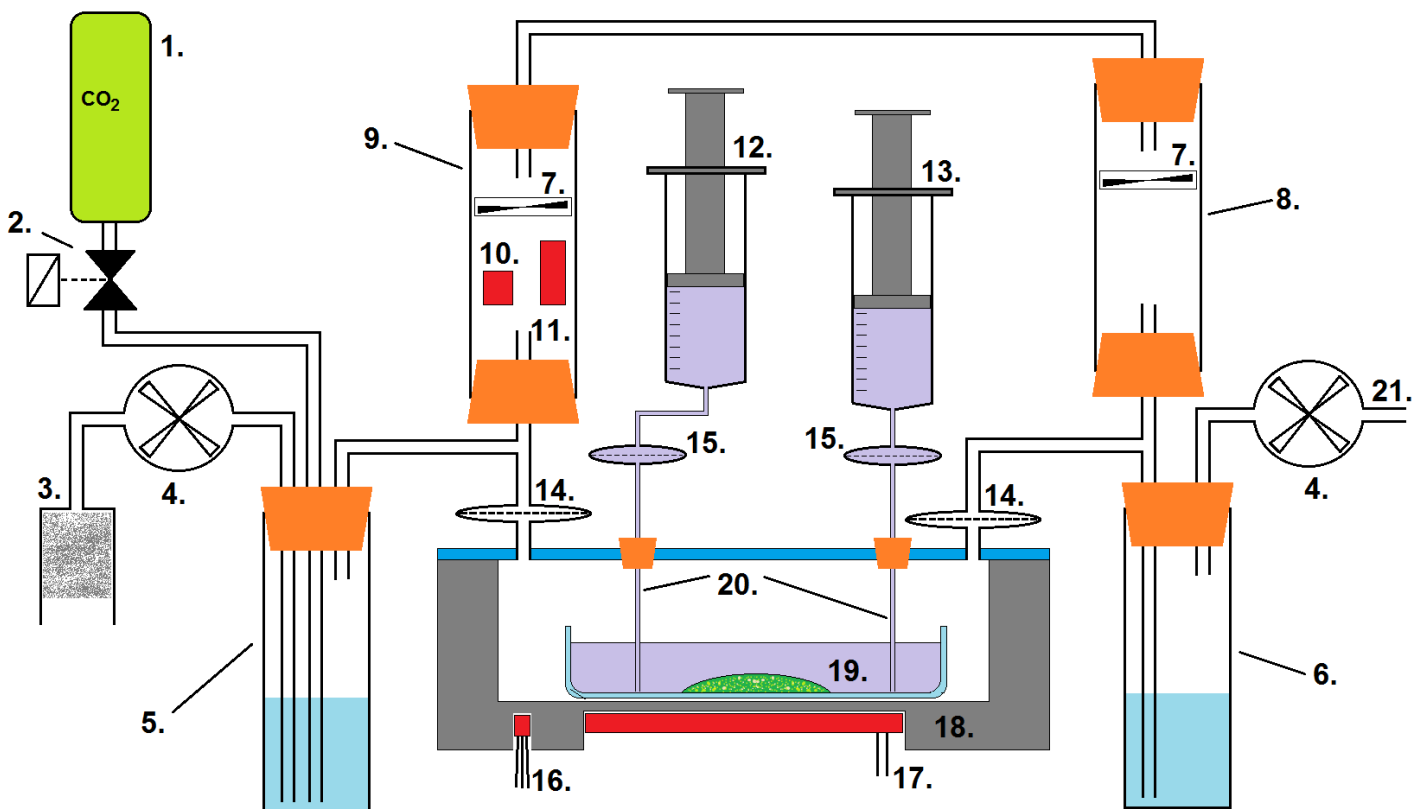
c) Podprogram pro řízení Atmosféry je také periodický. Když uplyne nějaká doba pro výměnu kyslíku v atmosféře, celá interní atmosféra se vysaje ven a zároveň se nasaje z vnějšku nová. Poté se musí doplnit CO_2 , to je vhodné doplňovat po malých dávkách a vždy interní atmosféru rozdmýchat zmíněným ventilátorem, protože senzory na detekci plynů jsou většinou pomalé a reagují s několikaminutovým zpožděním. Tento program tedy musí ovládat vzduchové pumpy, CO_2 ventil, a navíc ventilátor a UV-C zářič pro sterilizaci vzduchu.

Ventilátor a UV-C zářič by měl mít navíc i svůj vlastní malý podprogram pro průběžné čištění

d) Celý kultivační systém by měl mít nakonec tyto podprogramy implementované do intuitivního ovládání přes ovládací panel zařízení a přes osobní počítač.

5 Praktická realizace konkrétního zařízení

5.1 Řešení kultivačního systému

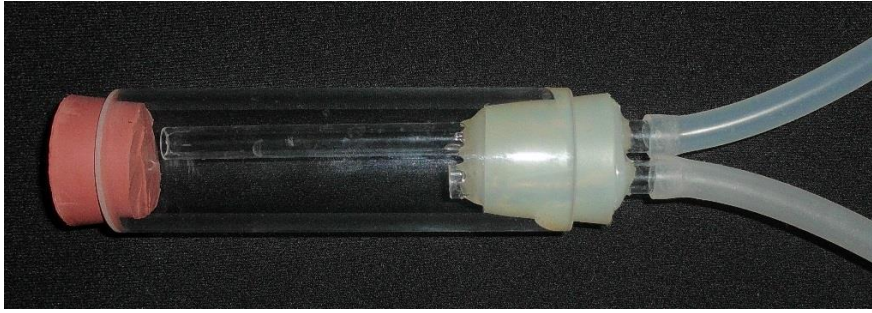


Obr. 5: řešení transportu látek + nezbytná koncová elektronika a senzory.

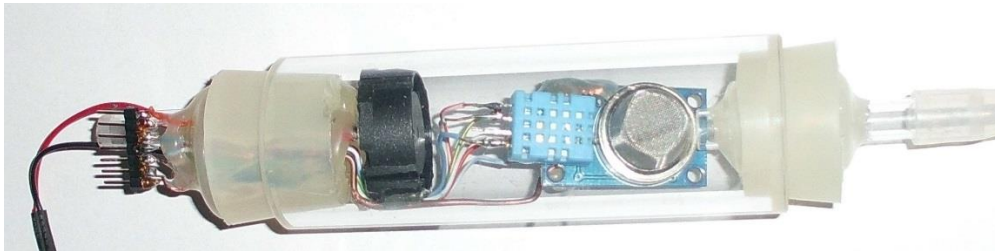
1. plynová bomba s CO_2
2. elektronický ventil s CO_2

3. vstupní filtr proti prachu pro výměnu atmosféry
4. vzduchová pumpa
5. vstupní probublávač se vstupem pro novou atmosféru a CO_2 . Také plní funkce jako okruh na čištění vzduchu který pokračování ke kultivační nádobě
6. výstupní probublávač
7. ventilátor pro rozdmýchání vzduchu pro urychlení senzorů na CO_2
8. Křemenná trubice určená pro průběžnou sterilizaci ozařováním atmosféry
9. Křemenná trubice určená pro průběžnou sterilizaci ozařováním atmosféry + analýza senzory na CO_2 , teploty, a vlhkosti vzduchu
10. Senzor detekující CO_2
11. Senzor vlhkost vzduchu a teplotu atmosféry
12. Vstupní injekční pumpa
13. Výstupní injekční pumpa
14. Filtry na separaci částic větších než 0,2um
15. Injekční filtry na separaci částic větších než 0,2um
16. Senzor Teploty kultivační nádoby. Tip „TMP36GZ“
17. Keramické topné těleso pro ohřev kultury
18. Kultivační nádoba s chirurgické oceli a odnímatelným víkem.
19. Kultura v Petriho misce
20. Vyjmutelné kapiláry (injekce)
21. Výstup použité atmosféry

Čtyři křemenné trubice z obrázku 5 budou umístěny dohromady, uvnitř izolované komory, spolu se zdrojem UV-C záření, který je bude ozařovat. Izolované musí být proto, že UV-C záření je velmi škodlivé pro lidské oko a pokožku. Budou tvořit samostatný systém filtru. Každá křemenná trubice je řešená tak, že se skládá ze skleněné trubice, jež je uzavřená silikonovými špunty. Každý špunt má různý počet výstupů a vstupů, jež jsou napojitelné na silikonové hadice. Ze špuntů (8 a 9 viz obrázek č.5) jsou navíc vyvedeny napájecí a datové vodiče ze senzorů a ventilátorů. Jsou lepené opět silikonem.

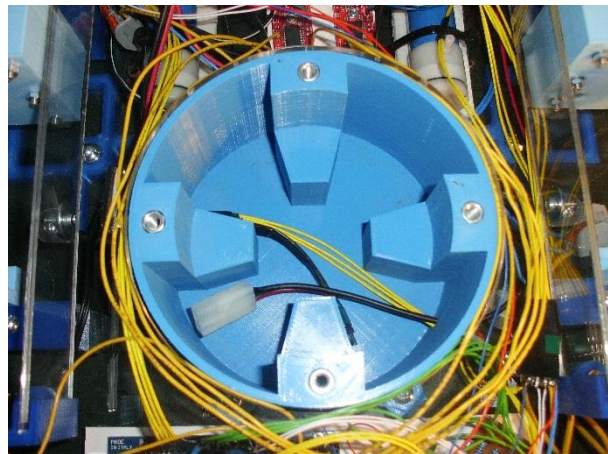
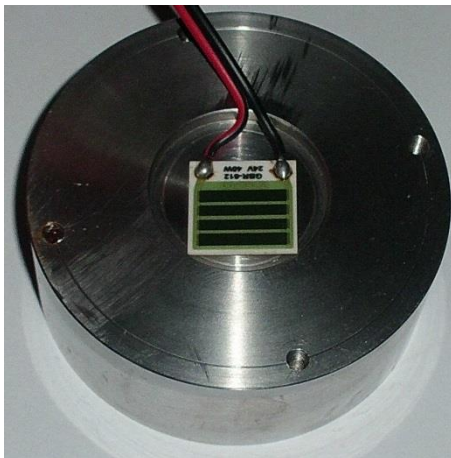


Obr. 6: Detailní pohled na křemennou trubici (bod 6 na obrázku 5), která plní funkci probublávavačky. Princip je takový, že se částice ze vzduchu zachytí ve vodě a UV-C zlikviduje případné mikroorganismy.



Obr. 7: Detailní pohled na křemennou trubici (bod 6 na obrázku 5) která plní dvojí funkci sterilizátoru a senzoru CO_2 , teploty a vlhkosti atmosféry.

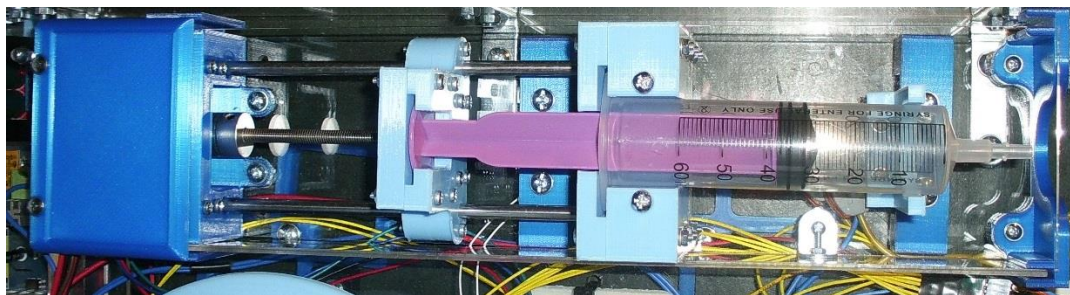
Další částí bude ocelová komora pro samotnou kultivaci spolu se čtyřmi filtry, topným tělesem a tepelným senzorem. Musí být v samostatném pouzdře které bude omezovat tepelné ztráty do okolí a tím zlepšovat regulaci. Komora musí být i s filtry vyjimatelná, aby se dala autoklávovat. Použité materiály, proto musí odolávat teplotám až $200^{\circ}C$. Vhodnými materiály jsou tedy: silikon, tvrzené sklo, ocel a filtry, které jsou od výrobce garantovány jako autoklávovatelné.



Obr. 8: a) Kultivační nádoba s topným tělesem. Pohled zespoda b) Tepelný a konstrukční obal kultivační nádoby. Materiál konstrukce PLA, 3D tisk.

Poslední samostatný systém tvoří injekční pumpy. Každá pumpa se skládá z injekční 50ml stříkačky, jež je umístěna do plastové konstrukce (materiál PLA), která je připevněná na plexisklové desce. Každá pumpa je poháněna krokovým motorem

(obchodní název: NEMA17). Hřídel injekce se pohybuje pomocí kovových os, jež jsou tlačeny šroubovým převodem od motoru.



Obr. 10: Injekční pumpa, pod modrým blokem vlevo je schovaný krokový motor.

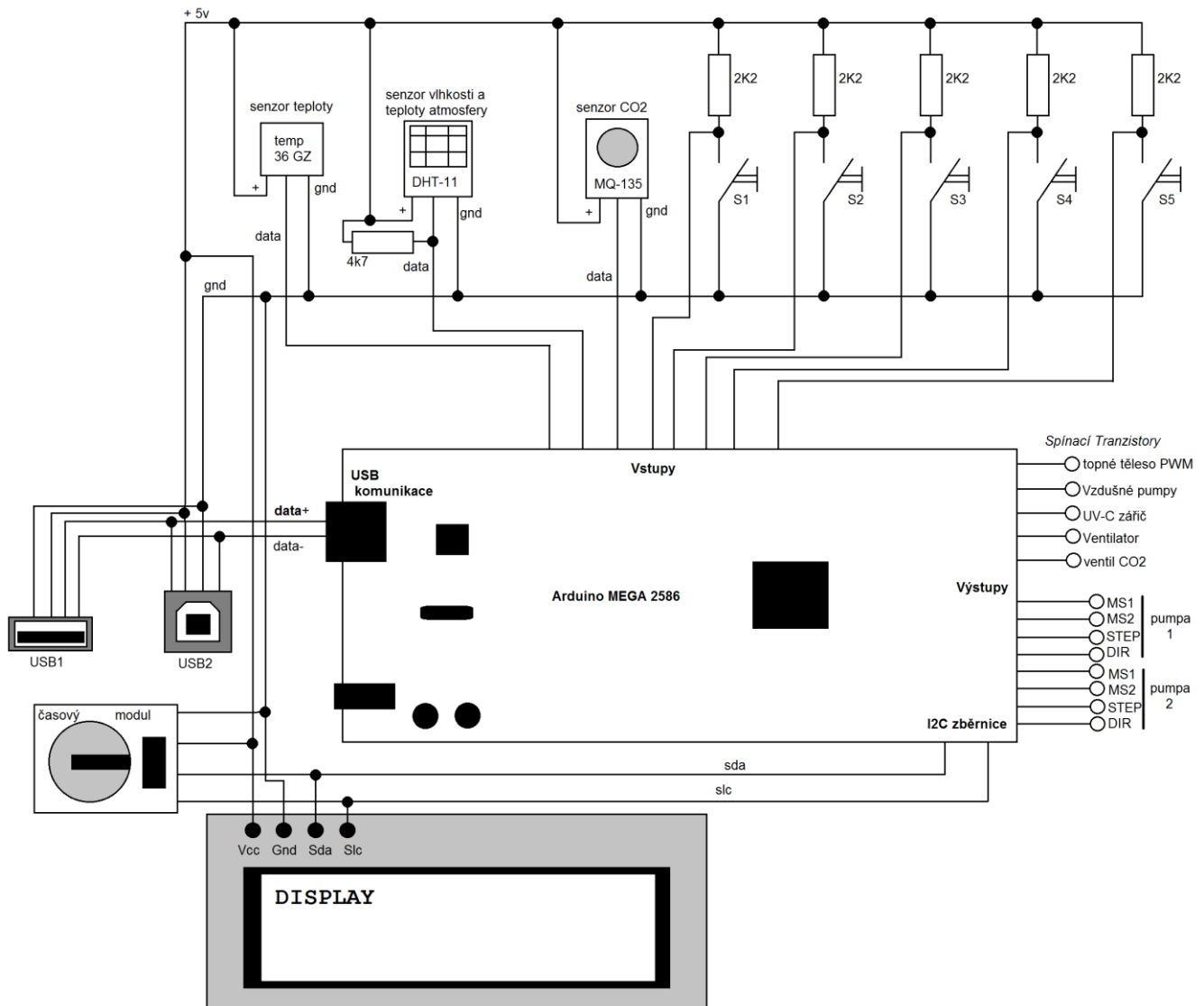
5.2 Elektronická část systému

Veškeru použitou elektroniku bych mohl rozdělit do dvou samostatných částí

- Řídící a senzorová část.
- Zdrojová a spínací část.

5.2.1 Řídicí a senzorová část

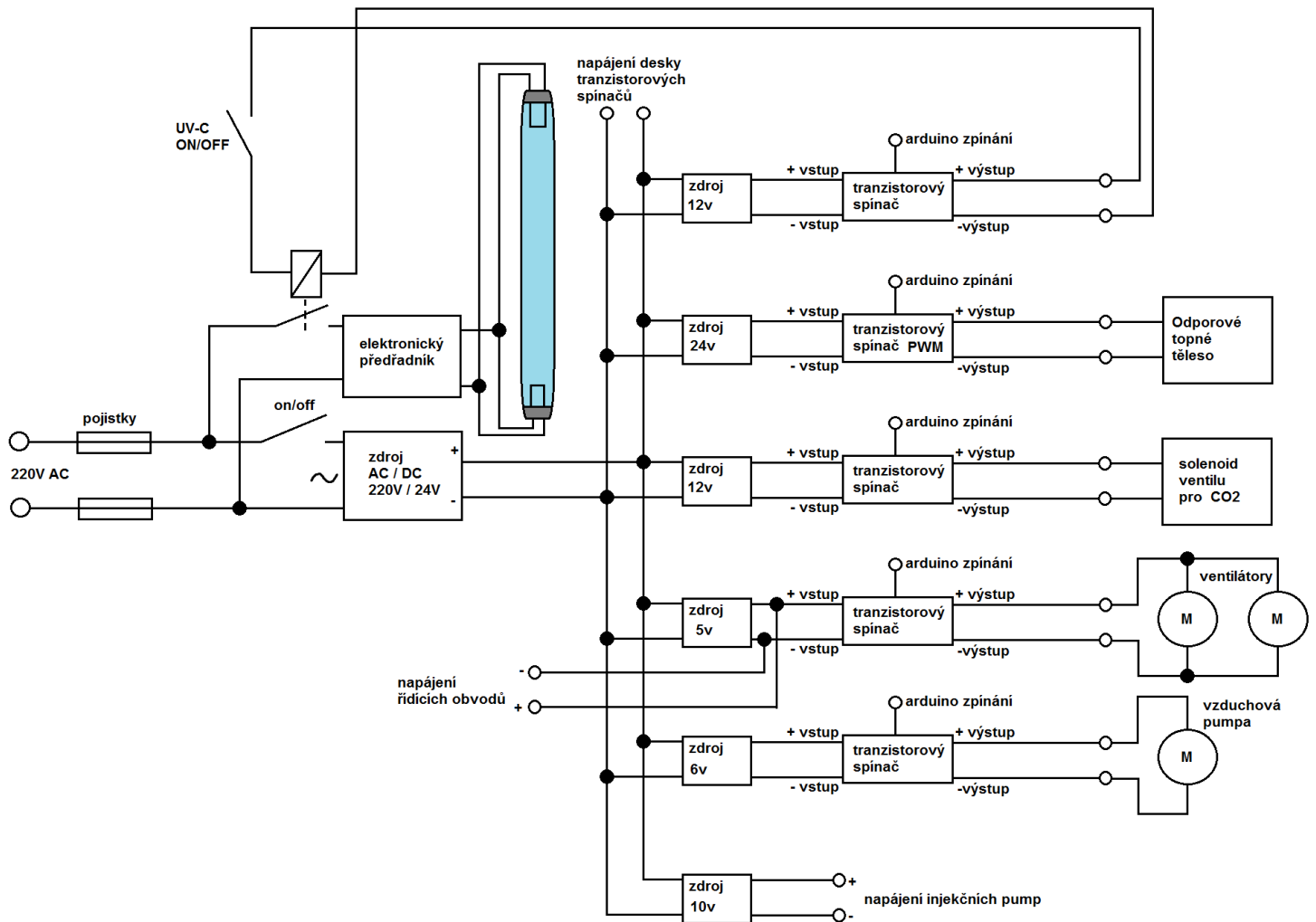
Jedná se o část, která má za úkol zprostředkovat naměřená data ze senzorů a ovládacích prvků jako je klávesnice nebo propojení s osobním počítačem a na základně těchto dat řídit kultivační komoru v podobě spínání regulačních podprogramů a výsledných informací v podobě zobrazení na display a odeslaných dat do osobního počítače.



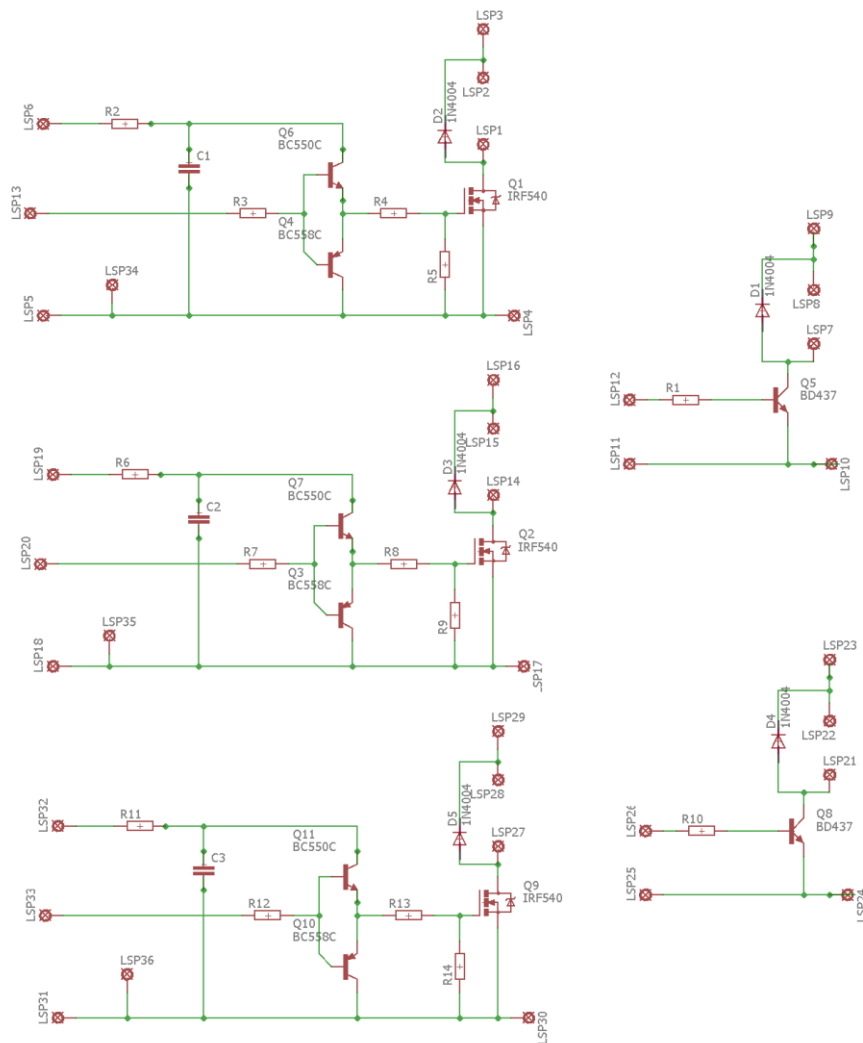
Obr. 11: Zapojení řízení a senzorové části s použitým mikropočítače Arduino. Můžeme zde vidět jednodeskovou klávesnici, která je tvořená pěti tlačítky v kombinaci z pull-up odpory, dále 2x USB s rozdílnými konektory napájené na společné desce, modrý LCD display 20x4 znaků, časový modul pro i2c sběrnici, 3 senzory temp 36gz, které jsou umístěny u topného tělesa v obvodu regulátoru, a senzory DHT-11 a MQ-135 které jsou umístěné v jedné z křemenných trubice pro analýzu atmosféry. Poslední část tvoří volné konektorové výstupy, které spínají koncové spotřebiče a výstupy pro ovládání injekčních pump. Zapojení není koncipováno na jedné desce nýbrž na několika deskách propojených po celém zařízení.

5.2.2 Zdrojová a spínací část

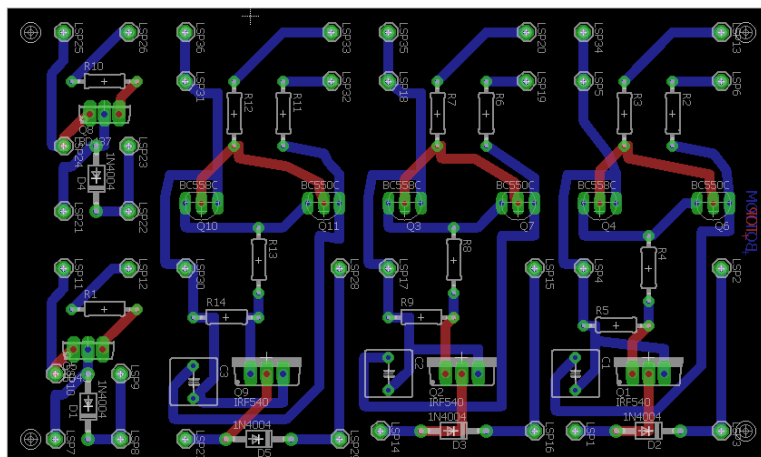
Je tvořena několika zdroji různých napětí, které vedou do tranzistorových spínacích obvodů, které vedou ke koncovým spotřebičům. Vše je řízeno mikropočítačem Arduino. Je zde také zapojena ochrana v podobě pojistek. Dále 2x spínač první ON/OFF zařízení, druhý ON/OFF elektronického předřadníku. Spínač tam je z důvodu zabezpečení při údržbě UV-C zářivky, která je normálně schovaná a izoluje člověka od UV záření.



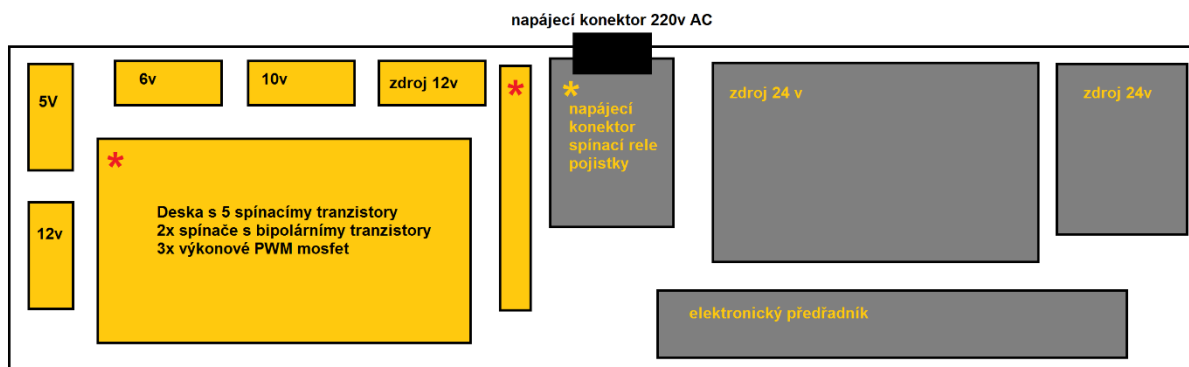
Obr. 12: Zdrojová část zařízení. Je zde začleněno více zdrojů napětí, protože zařízení má více koncových spotřebičů s různými napájecími požadavky.



Obr. 13: Spínací tranzistory zapojení je na jedné desce vlevo jsou 3x výkonové spínače (max 130W) pro ventil na CO_2 , vzdušné pumpy, a PWM topné těleso nalevo spínače pro malý výkon jako jsou ventilátor a relé.



Obr. 14: DPS deska tranzistorových spínačů



Obr. 15: prostorové uspořádání zdrojů a spínačů z obrázku 12

Části označené „*“ jsou vlastní výroby, ostatní jsou kupované zdroje. Hlavní zdroj, který převádí síťové napětí na 24V DC, výkon 150W. Ostatní zdroje z něj napětí již pouze snižují. 5x spínaný zdroj s integrovaným obvodem LM2596 a úplně vpravo je stabilizátor napětí na 24V, elektronický předřadník pro zářivku je také kupovaný.

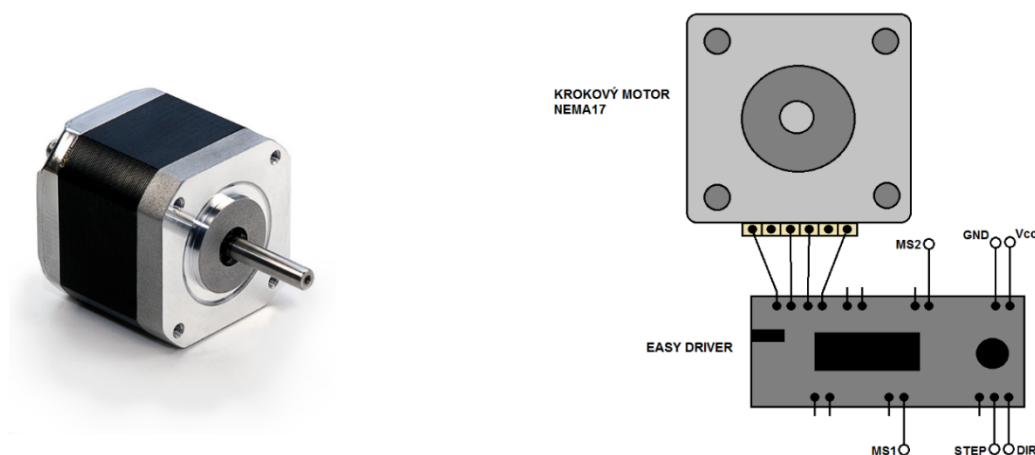
5.2.3 Injekční pumpy.

Pro pohánění injekčních pump mechanickou energií jsem si vybral krokové motory „nema17“ pro jejich levnou cenu a dostačující tah. Standardně se k nim dodává i řadič se zesilovačem integrovaný na jedné desce pod označením „EASYDRIVER“ tento řadič se ovládá čtyřmi přívody (bity) od mikro počítače.

- MS1, MS2 binární kombinací bitů na těchto vstupech se zajišťuje síla tahu krokového motoru, viz následující tabulka:

MS1	MS2	Tah motoru
0	0	1/8
0	1	1/4
1	0	1/2
1	1	1

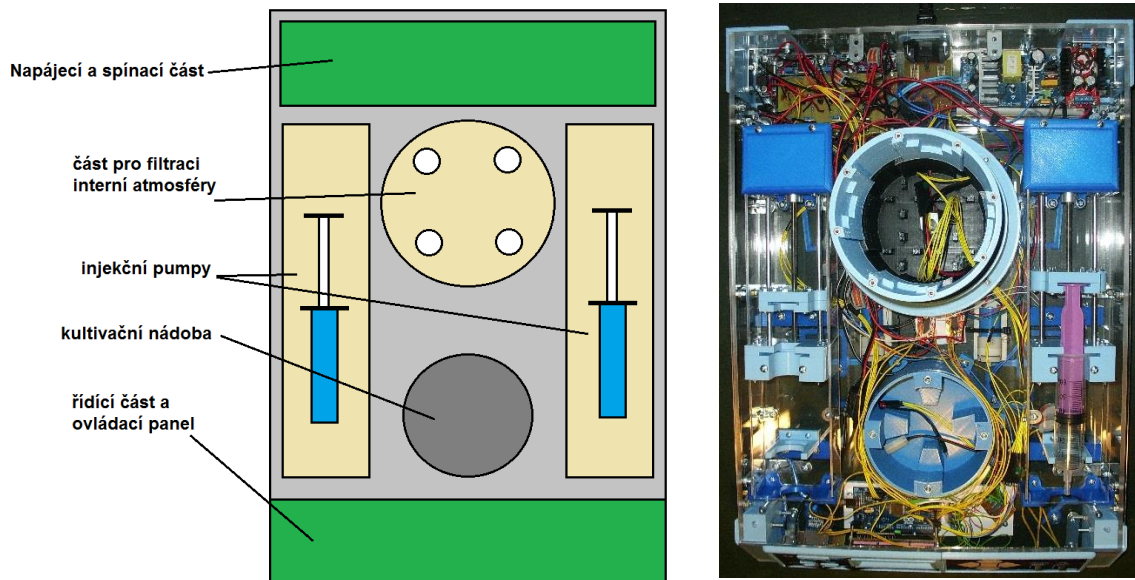
- DIR určuje směr otáčení motoru (1=vlevo), (0=vpravo).
- STEP při každém překlopení vstupu tohoto bitu se motor pohne o elementární krok který je určen tabulkou.



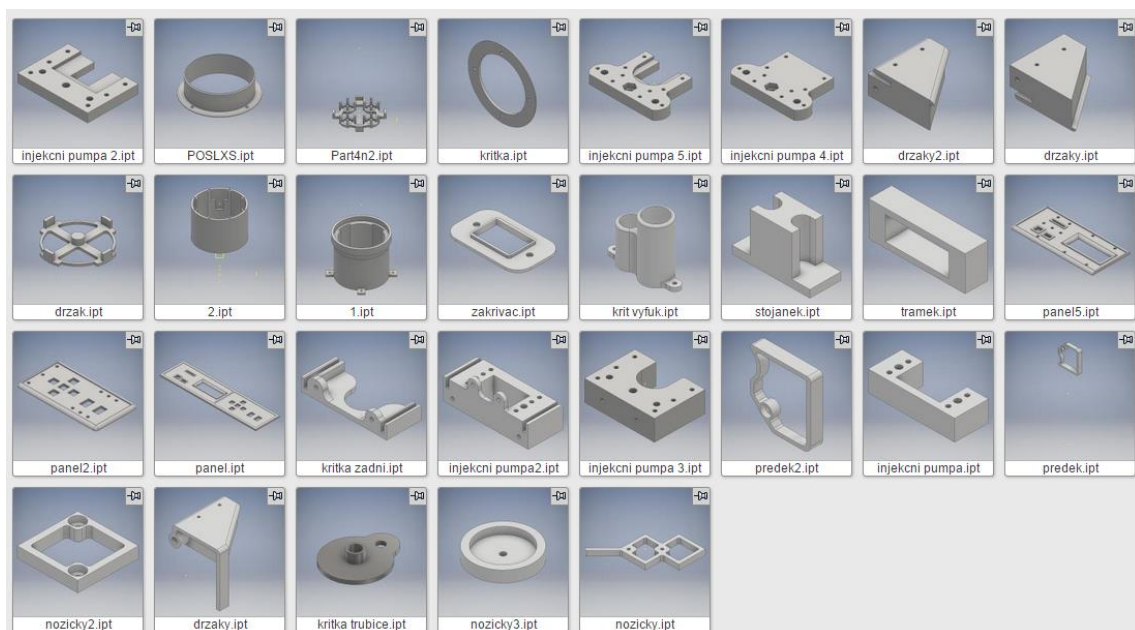
Obr. 16: Krokový motor nemá 17 zapojený na Easy Driver

5.3 Konstrukční část systému

Při konstrukci byly použity plastové PLA díly z 3D tiskárny, které jsou v konstrukci dominantní. Tvoří všechny funkční konstrukční součástky (například konstrukce injekčních pump). Dále je využívám jako spojovací díly pro plexisklové desky, které nesou celou konstrukci a integrují ji do uzavřeného systému. Díly k sobě spojují kovovými L-profilů, šrouby a maticemi.



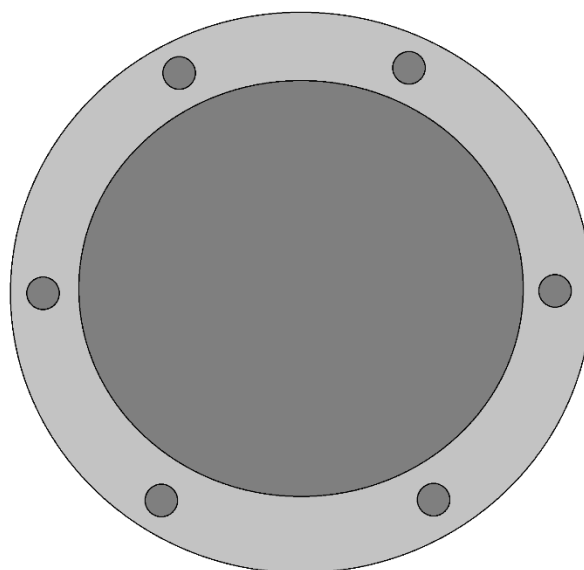
Obr. 17: konstrukce komory rozmístění funkčních částí. Vlevo schéma, vpravo reálný snímek otevřené komory.



Obr. 18: ukázka několika součástek z 3D tiskárny použitých v konstrukci.

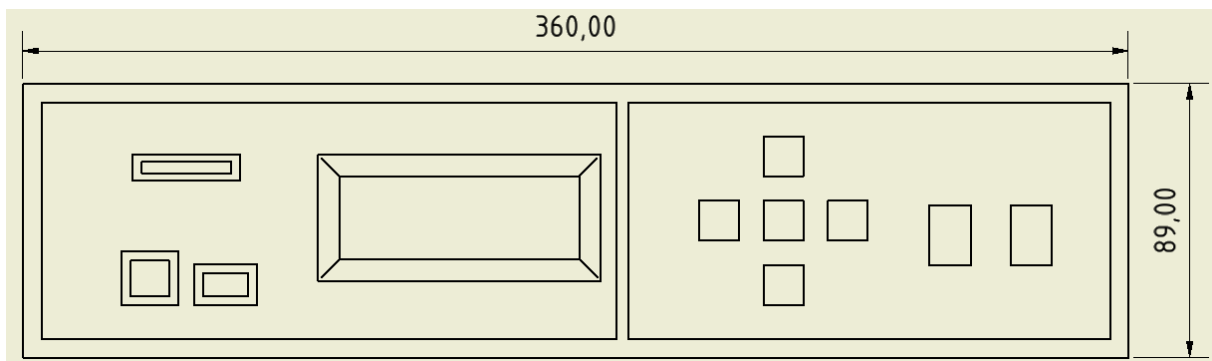


Obr. 19: Ukázka uchycení křemenných trubic v konstrukci z 3D tiskárny. Konstrukce se konkrétně skládá z pěti samostatně vytisknutých dílů.

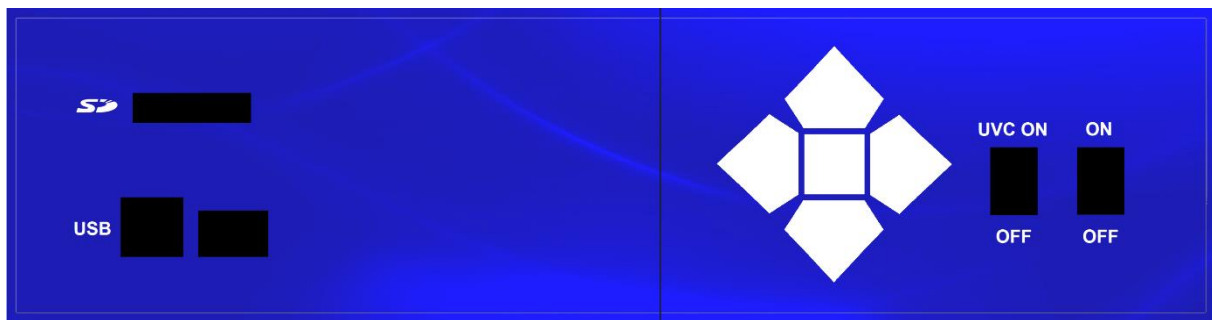


Obr. 20: Kultivační nádoba vysoustružená z chirurgické oceli, po stranách díry na šrouby.

Výroba předního panelu probíhala tak, že jsem si připravil čiré plexisklo do kterého jsem vyvrtal díry, ke kterým jsem pak našrouboval jednotlivé komponenty panelu (klávesnice display, USB, spínače, Micro SD) a následně jsem šrouby zakryl plastovou konstrukcí z 3D tiskárny. Navrch jsem ještě nalepil foliovou nálepku pro překrytí panelu pro zlepšení designu.



Obr. 21: plastový přední panel.



Obr. 22: Fóliová nálepka panelu.

5.4 Řízení a komunikace

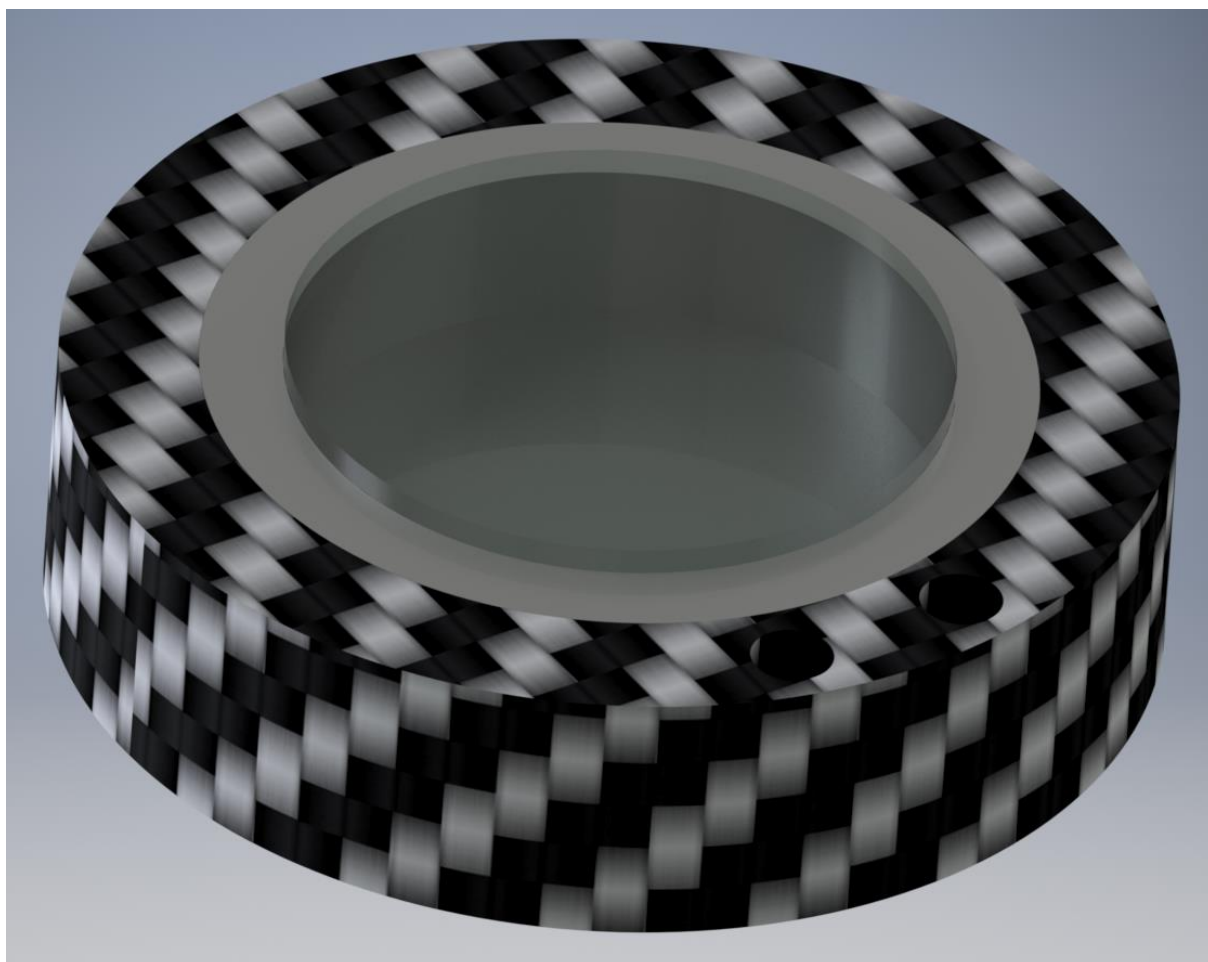
Pro řízení celého systému jsem si vybral platformu Arduino. Jedná se o miniaturní 8 bitový počítač. Konkrétně jsem použil tip „Arduino Mega 2586“, protože má velký počet vstupních a výstupních pinů a velkou programovatelnou paměť. Nastavování kultivačních hodnot se dá dělat buď pomocí klávesnice nebo přímo z programátoru přes počítač. Vizualizaci dat lze zajistit tak, že měřené hodnoty odešleme do osobního počítače pomocí instrukce „println“ odkud je můžeme číst a vizualizovat buď pomocí nějakého tabulkového procesoru, například excel nebo nějakého jiného programového řešení např. matlab.

6 Další pokračování práce

Z nově nabytými vědomostmi vidím jako další možné pokračování své práce návrh nové koncepce, která by opravdu poskytovala mnou navržené parametry jako je minimální velikost (například 15x15x7cm,) plně autonomní chod, další libovolná rozšiřitelnost jako zapojení více samostatných kultivačních komor do většího systému, nebo rozšíření o další zařízení, například pro analýzu, komunikaci s buňkami nebo použití kultury pro syntetizování určité látky například nějakého léku atd. Návrh by měl odpovídat standardům z koncepce industry 4.0, kde je každá podjednotka většího systému samostatný „agent“.

Koncepce by měla odpovídat spíše uzavřené petriho misce s elektronikou po stranách než kultivačnímu boxu nebo fermentátoru.

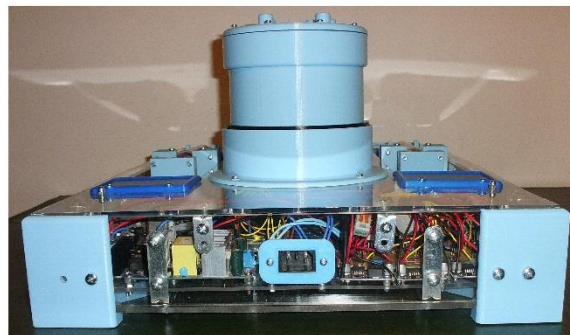
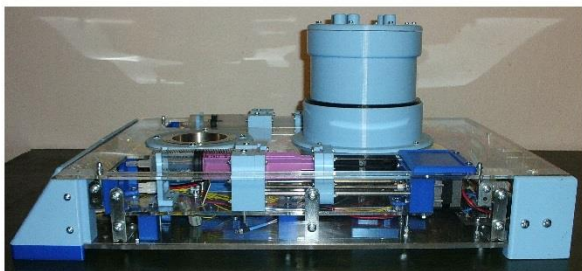
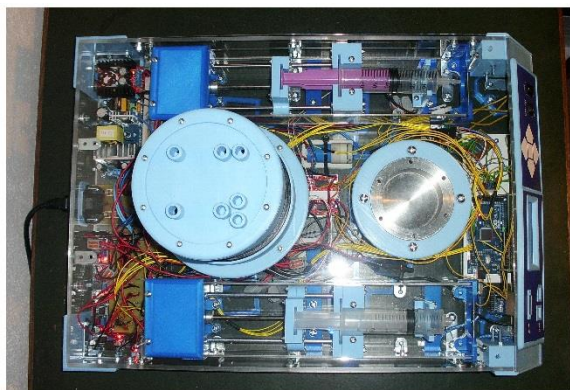
Takovýto nápad bych si už dovolil nabídnout jako startupový projekt investorovi.



Obr. 21: Možný vzhled kultivátoru „inteligentní Petriho miska“.

7 Závěr

Tato práce pro mě byla velmi přínosná po stránce nově nabytých zkušeností z několika odvětví jako je strojnictví, elektrotechnika, biologie a programování. Mnou sestavená kultivační komora je plně funkční po stránce regulace kultivačních parametrů, ale abych mohl opravdu kultivovat živé buňky, musel bych si ještě nechat na zakázku vyrobit skleněné autoklávovatelné víko ke kultivační nádobě. Pro prezenci používám pouze z víko z plastu.



Obr. 22: Hotová kultivační komora bez Víka kultivační nádoby a propojovacích hadiček pro lepší pohled.

8 Literatura a použité zdroje

1. ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, 1998.
2. Lenka Tůmová phd, ustav molekulární genetiky avčr, emailová konzultace o kultivování buněk.
3. Martin Vejražka, Buněčné kultury. *Www.cuni.cz* [online]. [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>