

一种简易恒化器的装置和使用

郑 重

(浙江农业大学,杭州)

摘要 本文介绍一种简易恒化器的装置和使用方法。其主要特点是依靠重力作用维持培养基的连续供给,省却了动力泵。装置和操作简便可靠。

关键词 恒化器;连续培养

在实验室的微生物连续培养技术中,恒化器(chemostat)已得到广泛的应用。恒化器的主要优点是提供了一个得到充分控制的培养环境。在这一环境下,培养物群体一直处于对数生长期,但生长速度低于其最大生长速度,而且在调控后保持稳定。从而为研究微生物的代谢生理,微生物的适应与突变,以及特定条件下的微生物生态体系提供了一个实验系统^[1,2]。

在一般连续培养的过程中,由于新鲜培养基的不断加入,同时有相应数量的旧培养液不

断排出,因而培养物的生长可持续下去。而且保证微生物所处的环境条件(如底物浓度、代谢产物浓度、溶氧浓度、pH等)可以始终保持恒定,使微生物的生长和代谢活性都处于稳定状态。如果用恒化器作连续培养,它所用的培养基中所有为培养对象所必须的养分都是过量的,只有某一种营养成分的含量比较低,其浓度只能维持培养物作有限的生长,称为生长限制底物(Growth-limiting nutrient)。碳源、氮源、无机盐类、溶解氧等都可以作为限制底物。

由于受培养基中限制底物补充速度的限制,恒化器内培养物的生长速度低于其最大生长速度,而且可以通过调节稀释速度而使微生物按所需的较低速度生长,同时保持培养物有足够和稳定的菌体密度^[1-3]。

根据以上原理,恒化器装置的设计应满足以下基本要求:(1)系统内的培养基和培养物不受污染;(2)新的培养基以可调控的速度逐滴加入培养瓶,同时有相应数量的老培养液排出,保持培养物总量恒定;(3)培养瓶内培养物应充分搅匀,保持均一,使流入的新培养基在瞬间即可均匀地分布到整个培养物中;(4)以某一营养成分为生长限制底物的液体培养基;(5)根据需要对温度、通气程度、培养物 pH 的监测和调节设相应的附加装置。

由于高级的恒化器装置比较昂贵,因此已有不少简易恒化器的设计^[4-6]。简易恒化器与同类高级装置的差异主要在于控制系统的复杂和可靠程度。而所需要的控制程度当然取决于实验的要求。本文介绍一种简易恒化器的装置,已成功地用于对环境污染物的降解微生物作菌株筛选和代谢生理的研究。作者以为,它可以满足用恒化器作连续培养的一般要求。

(一) 简易恒化器的组成

由图 1 可见,这种恒化器主要由三部分组成:贮液瓶、培养瓶、取样瓶及培养液收集瓶。三部分之间以玻璃管和特氟隆 (teflon) 胶管(或用其他耐高压灭菌的胶管,要求在试验条件下不会产生干扰实验的化学物质)相连。连接处应无漏气,因此需用胶密封。由于这一设计中培养液连续流动的动力是重力作用,因此装置时三部分应依次作阶梯式放置。

1. 贮液瓶:以 2L 容量的三角瓶为宜。装 1.5L 液体培养基,在 5ml/小时的供液量下,可维持 12—14 天。

2. 培养瓶:可根据实验对培养物总量的要求选用不同容量的三角瓶。如用 250ml 三角瓶加连支管,支管位置以维持瓶内培养物在有磁棒搅动时,总量 125ml 左右为宜。培养液的输入可用大号针头插入培养瓶橡皮塞,针尾部连

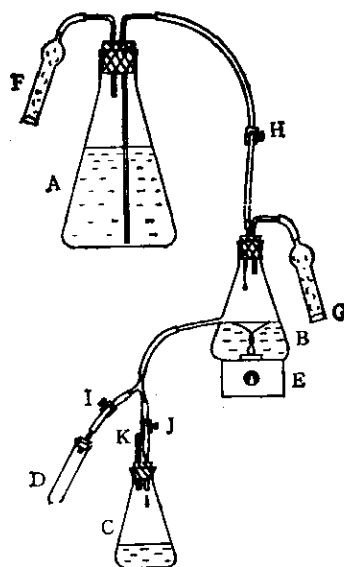


图 1 简易恒化器装置

A 贮液瓶 B 培养瓶 C 培养液收集瓶 D 取样管
E 电磁搅拌器 F、G 空气过滤管 H、I、J 可调螺旋夹
K 空气过滤玻管(内塞棉花)

接胶管并密封,防止漏液。

3. 取样瓶和培养液收集瓶:规格可根据需要及工作方便而定。

(二) 操作方法

装置的各部分,包括连接管道均应常规高压灭菌。为方便计,可于灭菌后在无菌条件下组装。在连续培养开始时,培养瓶内应有相当于以后工作容量的新鲜培养液(并在灭菌前预置搅拌用的磁棒),无菌接入培养物。在培养 12—18 小时后开始输入新鲜培养基。这一连续流动系统的启动可以通过从 K 处抽气,或从 F 处吹气来进行。一般,吹气方便但有造成污染的可能,抽气较为安全。一旦培养液流通,立即关小控制夹 H,调节到所需的流量。可以通过记录每滴需几秒钟,以 20 滴为 1ml 估算出新鲜培养液流入速度 (ml/小时)。

在连续培养进行的过程中,开动电磁搅拌器。

(三) 讨论

与其他已有的简易恒化器相比^[4-6],本文介绍的恒化器主要是省却了输液用的动力泵,因此整个装置简单,价廉而操作方便。曾试图用

细嘴下口瓶来作贮液瓶，这样新鲜培养基流加到培养瓶更为方便。缺点是一般下口瓶不耐高温，而且盛满液后作高压灭菌的可靠性亦差。

根据连续培养的稳态理论^[3]，在本文介绍的装置容量和操作条件下，稀释率 D 为 0.04/小时。因为在稳态下微生物的比增殖速率 (Specific growth rate) μ 与 D 相等，所以在上述稀释率条件下，培养物群体的比增殖速率显然低于其最大比增殖速率 μ_m 。而且，根据稀释率与培养物细胞浓度 X 的关系^[3]，在上述稀释率下，细胞浓度是稳定的。因此符合恒化器的基本要求。

参 考 文 献

[1] van Es, F. B. *et al.*: Microbial ecology: an over-

view, In *Aspects of Microbial Metabolism and Ecology* (Ed. G. A. Codd), Academic Press, London, 1984, pp. 1—33.

[2] Robinson, P. M.: *Practical Fungal Physiology*, John Wiley & Sons, New York, 1978, pp. 100—106.

[3] Tempest, D. W.: 'Theory' of the chemostat, In *Methods in Microbiology*, Vol. 2 (Eds. J. R. Norris and D. W. Ribbons), Academic Press, London, 1970, pp. 259—276.

[4] Primrose, S. B.: *Laboratory Practice*, 24: 88—89, 1975.

[5] Novick, A. and L. Szilard: *Science*, 112: 715—716, 1950.

[6] Evans, C. G. T., D. Herbert, and D. W. Tempest: Construction of a chemostat, see Ref. 3, 1970, pp. 278—327.