

Laboratorní aparatura pro jednorázové a kontinuální průtokové kultivace mikroorganismů

JAN ŘIČICA a JAN HOSPODKA, Biologický ústav Československé akademie věd, Praha

578

V květnu 1960 uspořádal n. p. Laboratorní potřeby v Kulturním domě strojírenství na Smíchovské výstavě prototypů nejrůznějších laboratorních přístrojů, na které jsme představili naši laboratorní kultivační aparaturu, vyrobenou ve Vývojových dílnách ČSAV. Stejná aparatura se v tomto roce vystavovala také na výstavách „Československo 1960“ v Moskvě a Kijevě. V článku chceme podat stručnou a předběžnou zprávu o této aparatuře.

V laboratorních technické mikrobiologie Biologického ústavu ČSAV se již mnoho let věnuje pozornost správnému chápání a zkoumání dějů probíhajících kontinuálně v dynamickém ustáleném procesu za různého fyziologického stavu organismů, který je konec konců pro ovládání a řízení procesu rozhodující (Málek 1955, 1958, 1960). Při studiu mnoha mikrobiologických, biochemických a genetických otázek nevystačíme již zpravidla s kontinuálním systémem jednostupňovým. Zejména systém s přítokem živné půdy také do druhého stupně, spojuje výhody chemostatu i turbidistatu a umožňuje studovat jevy, které při použití konvenčních kultivačních způsobů nelze v plné šíři zvládnout.

Máme-li svoji práci s nejrůznějšími mikroorganismy rozvinout v plné šíři, kladli jsme důraz na metodické vybavení dokonalou aparaturou, která by byla co nejvíce univerzální, snadno ovladatelná a spolehlivá i při dlouhodobých pokusech; aparaturou, v níž by se za laboratorních podmínek dala zvládnout co nejbohatší paleta nejrůznějších kvasných procesů, zejména aerobních, která by současně umožnila získat co nejvíce parametrů použitelných k přímému převodu do většího měřítka, v mnoha případech i provozního.

Abychom splnili podmínky matematického zdůvodnění homokontinuálních procesů převážně chemostatového typu, bylo třeba zajistit stálý a dokonalé promíchávaný objem udržovaný konstantním přítokem a odtokem média za konstantní teploty. K těmto základním prvkům přistupují ještě další, podle podmínek studovaného procesu, jako např. dokonalé provzdušňování, pH, koncentrace různých látek v médiu, koncentrace buněk apod. Na základě svých dlouholetých zkušeností i zkušeností z literatury (Elsworth, Meakin, Pirt a Capell 1956, Elsworth, Capell, Telling 1958, Heden 1958), jsme vyvinuli zařízení použitelné jak pro procesy jednorázové, tak i pro procesy kontinuální průtokové. Při konstrukci se přihlíželo na možnost práce jen s organismy nepathogenními a technicky využitelnými. Pro kultivace pathogenních organismů by se musely z bezpečnostních důvodů některé součástky vhodně upravit.

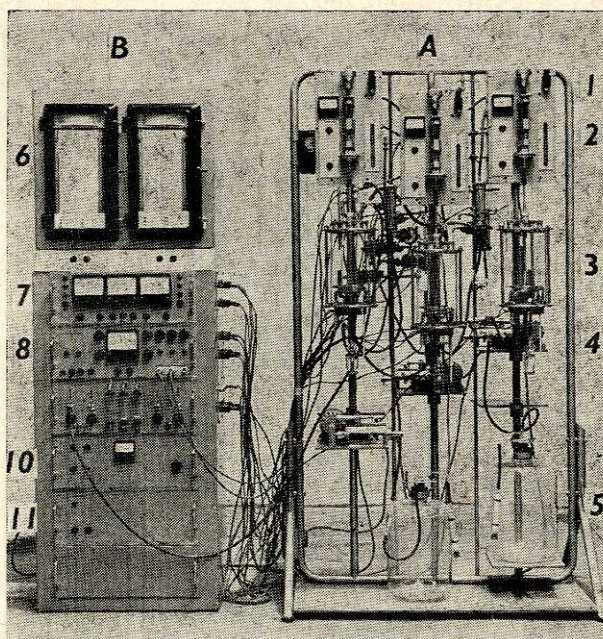
Celé zařízení se skládá ze dvou hlavních a samostatných částí, a to:

1. Z části kultivační (obr. 1, A).
2. Z ovládacího panelu s registračními a regulačními přístroji (obr. 1, B).

Kultivační část je tvořena stojanem, na němž jsou upevněny 3 kultivační jednotky (obr. 1, 2) s možností vertikálního i horizontálního posunu.

Jednotky jsou samostatné a mohou pracovat buď paralelně, nebo při vícestupňových kontinuálních procesech zapojeny do série, a to se stejným nebo rozdílným pracovním objemem média. Jednotka se skládá z pohonu míchadla i s regulací přívodu vzduchu, kultivační nádoby, dávkovacího čerpadla pro živnou půdu a pomocného zařízení. Pohon je samostatně posunovatelná část, která obsahuje elektromotor, frikční převod pro plynulou regulaci otáček od 100 do 1200 ot/min a tachometrické dynamo s ukazatelem. Stabilita otáček je zajištěna předimenzovaným třífázovým elektromotorem, který pracuje prakticky v synchronních otáčkách v širokém rozmezí kolísání napětí sítě. V panelu pohonu je rovněž umístěn vypínač motoru, přepínač rozsahu ukazatele otáček, regulační ventil pro průtok vzduchu a diferenciální manometr jako průtokoměr vzduchu. Stlačený vzduch se přivádí přes redukční ventil upevněný na stojanu přístroje. Výstupní tlak je možno nastavit s přesností 0,05 at v rozmezí 0 až 1,5 at. Množství vzduchu se řídí od 0 do 2 litrů za minutu jehlovým ventilem a odčítá se na průtokoměru. Vzduch přiváděný do kultivátoru pod míchadlo se steriluje filtrem, tvořeným kovovou trubicí vyplněnou filtrační hmotou.

Při konstrukci kultivační nádoby se použilo ne-rezavějící oceli, neutrálního skla, tepelně odolných umělých hmot a pryže. Tím se pokusilo dosáhnout odolnosti vůči korozi. Kultivační nádoba je skle-



Obr. 1. A. Kultivační část

1 — stojan; 2 — pohonná část míchadla s regulátorem otáček a regulátorem průtoku vzduchu; 3 — kultivační nádoba; 4 — dávkovací čerpadlo; 5 — zásobní a sběrné nádoby.

B. Registrační a regulační panel

6 — zapisovače; 7 — zákaloměr, regulátory teploty a automatický dávkovač protipěnidla; 8 — regulační pH-metr; 9 — analyzátor O₂ a CO₂; 10 — stabilizátor napětí; 11 — napájecí zdroje.
(Foto Fiala — BÚ ČSAV.)

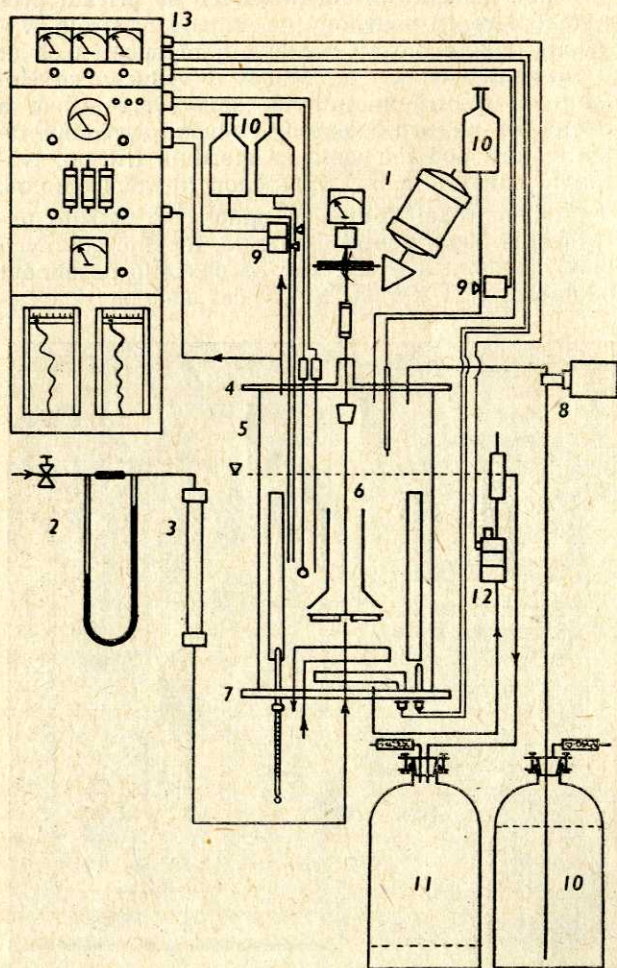
něný válec, který je upevněn čtyřmi svorníky mezi dvěma víky z nerez oceli. Těsnění mezi kovem a sklem je provedeno kaučukovými kroužky. Nádobu je upravena tak, že objem kultivačního média lze měnit od 500 do 2000 ml. Horním víkem prochází osa míchadla, která je vedena kuličkovými ložisky, kaučukovými a teflonovými ucpávkami a je spojena s pohonem pružnou spojkou. Uvnitř tanku je osa opatřena kleštinou, do níž je možno upevnit celoskleněné nebo celokovové míchadlo. Odstředivé míchadlo turbinového typu se sací trubicí (Řiřica, Grünwald 1954) velmi dokonale promíchává a provzdušňuje kulturu. Měřeno metodou oxydace siřičitanu (Cooper, Fernstron a Miller 1944), může se dosahovat hodnot přenosu kyslíku až do 350 m Mol O₂/l/h. Míchadlo současně mechanicky ruší tvořící se pěnu, takže snižuje na minimum spotřebu chemických protipěnidel. V horním víku jsou tři tubusy stabilně používané pro odvod vzduchu, pro elektrodu automatického odpěňovače a pro přidávání protipěnidla. Dále je ve víku šest tubusů s vnitřním NZ konusem, uzavřených pryžovými konickými zátkami pomocí převlečných ma-

tek. Tyto tubusy slouží k zavedení různých elektrod, sond, přívodů a odvodů podle potřeby experimentu. Na spodním víku jsou umístěny dvě trubky ve tvaru jednoho závitů pro topení žhavanou spirálou a pro chlazení vodou, společně se sondou automatického termistorového regulátoru teploty a se sondou pro kontrolní rtuťový teploměr. Dnem dále procházejí tubusy stabilně používané pro odběr vzorků, pro přepadové trubice na řízení výšky hladiny při průtoku a pro přívod vzduchu centrálně umístěný jako tryska pod míchadlo. Čtyři konické tubusy, stejné jako u horního víka, doplňují vybavení dna. Při manipulaci nebo při sterilizaci v autoklávu se dá celá kultivační nádoba snadno odpojit od pohonu a odejmout ze zvláštních držáků, jimiž je upevněna na stojanu. Tam, kde je k dispozici vyvíječ páry, lze sterilovat propařením přímo v sestavě přístroje. Dávkovací čerpadlo, pracující bez ventilů, je modifikací již dříve známého principu, který využívá otočného pístu (Begeman a Hunstad 1959). Jeho použití pro mikrobiologické kontinuální procesy je nadějně, neboť zde odpadají chyby a nevýhody ventilů, hlavně při dávkování suspensí. Pohybující se části jsou kryté proti okolní atmosféře. Píst pracuje v teflonovém pouzdře a je navíc utěsněn teflonovou a kaučukovou ucpávkou, což zabezpečuje aseptickou práci. Výkon čerpadla se reguluje od nuly do maxima mikrometrickým šroubem, ovládajícím zdvih pístu. Maximum a rozmezí výkonu je určeno průměrem pístu, jeho zdvihem a otáčkami motoru, což umožňuje změny v širokém rozmezí. Hlava čerpadla, která je snadno odnímatelná od pohonné části, se steriluje společně s gumovými přívodními hadicemi. Čerpadlo je na samostatném nosníku, který lze upevnit v libovolné výši na stojanu.

K příslušenství patří držáky, elektromagnetické tlačky, pomocné posuvné stolky a zásobní nádoby pro kyselý a alkalický roztok k regulaci pH a pro protipěnidlo. Láhve se zásobním živným roztokem a sběrné láhve pro odpad při průtoku stojí na podlážce u paty stojanu nebo v libovolné výši na pomocných stolicích.

Ovládací panel je samostatný, je spojen s kultivační částí prodlužovacími kabely a může být tedy umístěn i mimo prostor, v němž se nachází kultivační část. Na dvou šestikřivkových bodových zapisovačích, které jsou umístěny v horní polovině panelu, se registrují měřené veličiny. Ve spodní části jsou umístěny regulační jednotky, jež mohou pracovat zcela samostatně i mimo skříň. První jednotka obsahuje tři regulátory teploty, pracující s přesností $\pm 0,1^\circ \text{C}$ a tři regulátory s můstkovým zapojením s nastavitelnou citlivostí pro řízení dávek protipěnidla, přidávaného do tanku pomocí solenoidových ventilů. Dále jsou zde umístěny tři zákaloměry pracující každý se dvěma fotodiodami v můstkovém zapojení pro průtokové kontinuální měření turbidity, ovšem mimo vláknité organismy. Rušivý vliv zabarvení živného roztoku při měření se eliminuje zabarveným roztokem ve srovnávací trubici. Zákaloměr má dva rozsahy citlivosti a musí se kalibrovat pro každý použitý organismus.

Ve druhé jednotce je umístěn regulační a registrační pH-metr s automatickým přepínačem tří měřících míst vždy po 20 vteřinách. Citlivost měření pH-metru je 0,05 pH. Regulace pracuje s přesností $\pm 0,1 \text{ pH}$ a je třípolohová. Šíři nulového pásma lze nastavit na obě strany nezávisle. Regu-



Obr. 2. Kultivační jednotka

1 — motor s plynulým frikčním převodem pro regulaci otáček a s tachodynamem; 2 — jehlový ventil a průtokoměr pro řízení průtoku vzduchu; 3 — filtr na vzduch; 4 — horní víko s ložiskovým blokem, elektrodami a tubusy pro přívody a odvody kapalin a plynů; 5 — skleněný válec; 6 — míchadlo; 7 — spodní víko s topným a chladicím hadem, s termistorovým regulátorem teploty, sondami a tubusy pro odběr vzorků, přívody a spoje; 8 — čerpadlo; 9 — magnetické tlačky; 10 — zásobní láhve; 11 — odpadní sběrná láhev; 12 — sonda zákaloměru; 13 — regulační a registrační přístroje.

lačním orgánem jsou solenoidové ventily na způsob tlačky, které uvolňují potřebné množství kyselého nebo alkalického roztoku, přiváděného kapilárami do těsné blízkosti skleněné elektrody. Přístroj pracuje na principu můstkového elektronového voltmetru se vstupním odporem až 500 megohmů, takže lze používat pancéřových elektrod. Stabilita nuly je lepší než $\pm 0,2$ pH za 24 hodin. Srovnávací kalomelová elektroda se nesteriluje, neboť měří přes asbestový přestupník zatavený ve skle, který se steriluje společně s tankem v autoklávu. Kalomelová elektroda se zasunuje do vystěrovaného přestupníku naplněného roztokem KCl. Skleněná elektroda se steriluje chemicky a po sterilaci se vkládá za aseptických podmínek do kultivační nádoby.

V třetí jednotce je analyzátor plynů pro O_2 a CO_2 ve vzduchu vycházejícím z kultivátoru. Pracuje na principu tepelné vodivosti. Tento přístroj byl zhotoven podle Nováka (1956).

Další jednotky obsahují napájecí a stabilizované zdroje pro uvedené přístroje. Pro žhavení topných spirál a pro solenoidové ventily je použito z bezpečnostních důvodů napětí 24 V.

V budoucnu bude aparatura doplněna dalšími součástkami, takže možnost jejího univerzálního použití se ještě zvýší.

Souhrn

Popsali jsme univerzální laboratorní kultivační aparaturu pro jednorázové a hlavně pro kontinuální průtokové jednostupňové i vícestupňové kultivace. Kultivační objem média se může měnit od 500 ml do 2000 ml. Dají se provádět jak aerobní, tak anaerobní kultivace. Přístroj je vybaven dokonalým míchacím a provzdušňovacím systémem, dále regulátorem teploty a pH, analyzátozem plynů O_2

a CO_2 odcházejících z fermentace s proudem vzduchu, zákaloměrem a dávkovačem protipěnidla. Většina operací probíhá automaticky. Všechny parametry, které se mohou snímat elektrickou cestou, se dají registrovat na zapisovačích. Průtok média při kontinuálních procesech je řízen dávkovačem, který využívá principu otočného pístu. Velikost dávky je plynule nastavitelná mikrošroubem. Kultivační část přístroje je složena ze tří samostatných jednotek, které se dají posunovat vertikálně i horizontálně a které se dají propojit hadicemi do série při vícestupňových kontinuálních procesech. Kultivační nádoby se po odejmutí se stojanu sterilují v autoklávu. Přístroj podle návrhu pracovníků technické mikrobiologie biologického ústavu ČSAV vyrobily vývojové dílny ČSAV.

Literatura

- [1] Begeman C. R., Hunstad N. A.: A unique chemical metering pump. Ind. Eng. Chem. **51**, 495 (1959).
- [2] Cooper C. M., Fernstrom G. A., Miller S. A.: Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. **36**, 504–509 (1944).
- [3] Elsworth R., Capell G. H., Telling R. C.: Improvements in the design of a laboratory culture vessel. J. Appl. Bact. **21**, 80–85 (1958).
- [4] Elsworth R., Meakin L. R. P., Pirt S. J., Capell G. H.: A two litre scale continuous culture apparatus for micro-organisms. J. Appl. Bacteriol. **19**, 264, 278 (1956).
- [5] Heden C. G.: A biological pilot plant designed for a high degree of flexibility. Nord. Med. **60**, 1090–1099 (1958).
- [6] Málek I.: O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií. Nakl. ČSAV Praha 1955.
- [7] Málek I.: The physiological state of microorganisms during continuous culture. Continuous cultivation of microorganisms. NČSAV Praha, 1958.
- [8] Málek I.: The development and further perspectives of the continuous-flow method of cultivation of microorganisms. Symposium on continuous culture of micro-organisms. London 1960.
- [9] Novák L.: Vliv rtg záření na průběh respiračního metabolismu u ozářených zvířat. Kandidátská práce BÚ ČSAV, Praha, 1956.
- [10] Říčka J., Grünwald H.: Odstředivé laboratorní míchadlo. Chem. listy **48**, 1250 (1954).

Došlo do redakce 21. 6. 1960.

ЛАБОРАТОРНАЯ ПРОТОЧНАЯ АППАРАТУРА НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

В статье описывается универсальная лабораторная аппаратура проточного типа для периодического и непрерывного одноступенчатого и многоступенчатого развития культур микроорганизмов. Объем питательной среды может изменяться в пределах от 500 мл до 2000 мл. Аппаратура обеспечивает возможность как аэробных, так и анаэробных процессов. Аппаратура оборудована надежной, эффективной мешалкой, аэрирующим устройством, регулятором pH, анализатором газов т. е. O_2 и CO_2 , измерителем степени помутнения и дозатором пеноудалительных реактивов. Большинство нужных операций осуществляется автоматически. Все параметры проходящего в аппаратуре процесса измеримые при помощи электрических приборов регистрируются самозаписывающими устройствами. Движение среды регулирует дозатор работающий на принципе вращающихся поршней. Пространство предназначено для собственного разведения культур состоит из трех сосудов, которые могут перемещаться в горизонтальном и вертикальном направлениях. При многоступенчатых непрерывных процессах сосуды можно соединить в серию при помощи шлангов.

LABORAPPARATUR FÜR STATIONÄRE UND KONTINUIERLICHE MIKROORGANISMENZÜCHTUNG IM DURCHFLUSS

Es wird eine universale Laborkultivationsapparatur für stationäre und Durchfluss-Kultivationen beschrieben. Das Kultivationsvolumen des Mediums kann innerhalb der Grenzen von 500 ml bis 2000 ml geändert werden. Aerobe sowie auch anaerobe Kultivationen können durchgeführt werden. Die Apparatur ist mit einem perfekten Rühr- und Belüftungssystem versehen; zu der weiteren Ausstattung gehören folgende Geräte: Temperatur- und pH-Regulator, Gasanalysator für O_2 und CO_2 , Trübungsmesser und Entschäumungsmittel-Dosierapparat. Der grösste Teil der Operationen verläuft automatisch. Alle technische Daten, die elektrisch gemessen werden können, werden auf Schreibapparaten registriert. Ein Dosierapparat, der auf Grund des Drehkeilen-Prinzips konstruiert ist, reguliert den Durchfluss des Mediums. Der eigentliche Kultivationssteil der Apparatur besteht aus 3 selbständigen Einheiten, die in horizontaler und vertikaler Richtung verschoben werden können und die man, bei mehrstufigen kontinuierlichen Prozessen, durch Schläuche in eine Serie verbinden kann.

LABORATORY EQUIPMENT FOR THROUGH PASSING CONTINUOUS CULTIVATION OF MICROBES

The article contains a detailed description of a laboratory equipment for batch as well as continuous single-step as also multi-step cultivation of microbes. The volume of the nutritive medium can be changed from 500 ml to 2000 ml. The equipment can be used for aerobic as well as anaerobic cultivation. The equipment incorporates an efficient agitator and aerating system, temperature and pH controls, gas analyzers for determination of O_2 and CO_2 content, turbidity indicator and metering device introducing foam damping chemicals. Necessary operations are performed mainly automatically. All the parameters of the process, which can be detected and measured electrically, are automatically registered. The amount of medium passing through the apparatus, as well as its rate are controlled by a special device operating on the principle of rotating pistons. The cultivating part of the apparatus consists of 3 compartments which can be arranged vertically as well as horizontally in any desired combination. At multi-step continuous cultivation the compartments can be connected in series with hoses.