103. E. B. CHAIN, S. PALADINO, F. UGOLINI, D. S. CALLOW, e J. VAN DER SLUIS. — **Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.**

Riassunto. — Sono descritti ed illustrati fermentatori da laboratorio della capacità totale di 10 litri per fermentazioni con micro-organismi non patogeni. L'aerazione può essere effettuata sia con il sistema « vortice » che con distributore di aria, in presenza o meno di antivortici. Questi fermentatori hanno funzionato ininterrottamente ed a lungo con un minimo numero d'inquinamento.

Résumé. — Les A. décrivent un fermentateur de laboratoire, entièrement métallique, d'une capacité de 10 litres. Il est destiné aux fermentations aérobiques de germes non-pathogènes. L'aération s'y effectue soit par le système vortex, soit par un disperseur d'air, avec ou sans panneaux de turbulence. Ce fermentateur est d'un maniement aisé et doté de qualités de confiance; l'incidence de contamination en travail continu est très faible. Les détails de construction et de manipulation sont minutieusement exposés.

Summary. — An all metal laboratory fermenter of 10 litres total capacity is described. It is suitable for aerobic fermentations with non pathogenic micro-organisms. Aeration may be effected either by the vortex method or by means of an air sparger in the presence or absence of baffles. The fermenter is easily handled and has been shown to be mechanically reliable and to give a low incidence of contamination when in routine use over a long period. Full constructional and operating details are given.

Zusammenfassung. — Ein aus rostfreiem Stahl hergestelltes Laboratoriumsgärgefäss von 10 l Gesamtinhalt wird beschrieben. Es ist geeignet für aerobe Gärungen in Tiefkultur mit nicht pathogenen Mikroorganismen. Belüftung kann durch das Vortexsystem oder durch Luftverteilung mittels eines Luftverteilers in Gegenwart oder Abwesenheit von Prallblechen erfolgen. Das Gärgefäss ist einfach in der Handhabung und arbeitet mechanisch sehr zuverlässig. Verunreinigungen durch Fremdorganismen kommen sehr selten vor, wenn die nötigen Vorsichtsmassnahmen beachtet werden. Genaue Angaben der Konstruktionseinzelheiten der Gärgefässe und seiner Gebrauchsmethoden werden mitgeteilt.

Introduzione

In una precedente comunicazione sullo studio dei diversi sistemi di aerazione e sui fattori che ne influenzano l'efficacia è stato descritto un sistema di diffusione senza distributore d'aria, (spargerless) in cui la aerazione viene ottenuta aspirando, nel liquido da aerare, l'aria che lo sovrasta mediante un vortice provocato da un'elica che, ruotando velocemente disperde, mediante le sue pale, l'aria in piccole bolle all'apice del vortice (1).

Nel presente lavoro riportiamo la descrizione di un tipo di fermentatore da laboratorio, avente una capacità totale di 10 litri. Esso è adatto per fermentazioni aerobiche e l'aereazione del liquido di coltura può essere effettuata sia per mezzo della formazione di un vortice, sia mediante distributori di aria, in presenza o in assenza di antivortici.

« Parti componenti il fermentatore »

Nella tavola I è riportata una sezione verticale costruttiva del fermentatore, che è presentato, nei suoi vari aspetti, nelle fotografie delle figure da 1 a 4.

Esso è composto sostanzialmente da un corpo cilindrico, costituente il recipiente e da una testata di chiusura, sulla quale sono sistemati la scatola di guida e di tenuta per l'albero dell'agitatore e i vari accessori necessari alla fermentazione.

Corpo del fermentatore

Il corpo del fermentatore è costituito da un cilindro di acciaio inossidabile alla cui estremità sono stati saldati rispettivamente, un fondo semi bombato e una flangia portante sei fori, nei quali sono state saldate le teste di sei bulloni, in acciaio inossidabile, che servono a fissare, mediante bulloni e rondelle di fermo, la testata del fermentatore al corpo.

Sulla faccia superiore della flangia è stata ricavata una sede anulare a spigoli vivi per l'incasso di una guarnizione in gomma di tenuta di sezione quadrata.

Sul corpo di ogni fermentatore è inciso un numero di riferimento, riportato anche sulla testata allo scopo di evitare scambi e di garantire

---

(1) Chain E. B., Paladino S., Callow D .S., Ugolini F., Van der Sluis J. - Bull. World. Health. Org. *6*, 73 (1952).

la corrispondenza dei fori della testata con la posizione dei relativi bulloni portati dal corpo. I particolari costruttivi sono riportati nella tav. I.

Testata del fermentatore e relativa disposizione dei fori

La testata è costituita da una piastra di acciaio inossidabile del diametro di mm. 250 e dello spessore di mm. 12 ed è forata secondo il piano riportato nella tav. II.

I sei fori, non filettati, praticati verso la periferia della testata servono per il passaggio dei bulloni che la fisseranno al corpo del fermentatore, mentre il foro centrale filettato (1) serve per l'alloggiamento della scatola di guida e di tenuta dell'agitatore (vedi appresso). I sei fori (da 1 a 7) sono tutti ad una distanza di mm. 75 dal centro della testata; i fori (2) e (3) sono destinati rispettivamente per l'entrata dell'aria e per la sua fuoriuscita; i fori (4) e (5) per la introduzione di liquidi durante la fermentazione, il foro (6) per introdurre l'inoculo e per effettuare delle aggiunte occasionali di liquidi durante la fermentazione e infine il foro (7) per il prelevamento dei campioni. Nel foro filettato (8), distante dal centro della testata mm. 50, viene avvitata una candela, del tipo usato nei motori a scoppio per l'accensione che, opportunamente modificata come in appresso sarà specificato, funziona da elettrodo rivelatore di schiuma.

E' della massima importanza che la foratura della testata del fermentatore sia fatta secondo il piano riportato nella tav. 1 perchè da essa dipende la facilità di manovra e di uso del fermentatore. La posizione dei fori (7) ed (8) non può essere modificata se nel fermentatore si usa il sistema di aerazione con vortice perchè il tubo per il prelevamento dei campioni passante il foro (7), deve trovarsi quanto è più possibile vicino alla parete del fermentatore allo scopo di ridurre il suo effetto antivortice, ed il foro (8), portante l'elettrodo rivelatore di schiuma, non deve essere invece troppo vicino alla parete del fermentatore per evitare un corto circuito con essa.

Entrata dell'aria

La disposizione per l'entrata dell'aria nel fermentatore è illustrata nella tav. III; per i vari collegamenti sono stati usati, dove possibile e senza alcun inconveniente, dei raccordi commerciali da 1/4'' in ferro in sostituzione di quelli in acciaio inossidabile, non facilmente reperibili in commercio e di alto costo. Tuttavia per il filtro sterilizzatore dell'aria è stato adoperato l'acciaio inossidabile perchè è stato trovato che l'impiego del ferro o dell'acciaio ordinario dopo ripetute sterilizzazioni dava

luogo ad una eccessiva ossidazione che disturbava il normale funzionamento del filtro. Questo consta di un tubo di acciaio inossid. (3 tav. III) filettato esternamente ad una estremità nella quale si avvita il tappo di chiusura da 1'' (4 tav. III) forato e filettato per fissare la curva di raccordo (2 tav. III) dell'entrata; un disco di acciaio inossidabile, saldato elettricamente all'altra estremità, è ugualmente forato e filettato per il collegamento, attraverso il raccordo a vite (5 tav. III) con il T (6 tav. III) e la curva (7 tav. III). Quest'ultima è collegata mediante una valvola di tipo comune (8 tav. III) ad un corto tubo di acciaio inossidabile (9 tav. III) filettato internamente nella parte che entra nel fermentatore in modo da essere collegato, se necessario, con il tubo portante il distributore d'aria (vedi tav. V). Il raccordo a T (6 fig. III) attraverso la curva (10 fig. III) e un corto tubo di gomma, resistente a pressione, è collegato al braccio laterale del complesso per il prelevamento dei campioni, come indicato nella tav. VI. Questa disposizione serve per immettere aria sterile nel fermentatore attraverso il tubo per la presa di campione allo scopo di espellere da esso il liquido di cultura stagnante, durante la fermentazione e, per essere sicuri quindi di prelevare come campione il liquido di cultura giacente nel fermentatore.

La curva (2 tav. III) è collegata mediante il giunto rapido (1 tav. III) portante un tubo di gomma, resistente a pressione, alla rete decompressa di distribuzione di aria.

Uscita dell'aria

I varii particolari sono illustrati nella tavola III B.

Quanto è stato detto per i materiali usati per l'entrata d'aria, vale per l'uscita della stessa dal fermentatore. Essa avviene attraverso il tubo a gomito di acciaio inossidabile (11) collegato al filtro (12); quest'ultimo è simile al filtro descritto per l'entrata dell'aria, (3 tav. III A), ma ha una lunghezza minore. L'uscita di questo filtro è collegata con il raccordo a T (13) portante ad un braccio un manometro per la misura della pressione con scala da 0 a 3 atmosfere, e all'altro la curva (14) e la valvola (15), all'uscita della quale, è avvitato un raccordo di gomma in modo da potervi innestare il tubo di gomma di un flussometro per effettuare le misure relative.

Paccaggio dei filtri sterilizzatori dell'aria

Il paccaggio dei filtri sterilizzatori è costituito da lana di vetro sottile, (fine Corning fiber glass) mediamente compressa, in modo che il filtro di entrata dell'aria (3 tavola III A) ne contenga gr. 30 e quello di uscita (12 tav. III B) gr. 20.

Controllando per mezzo di un analizzatore del tipo Bourdillon (2), la sterilità dell'aria uscente dal compressore usato per l'alimentazione dei fermentatori, si è trovato che essa è « praticamente » sterile; per ciò i filtri sterilizzatori descritti sono stati considerati solo come dispositivi di sicurezza, e non è stata controllata quantitativamente la loro efficacia, come sterilizzatori d'aria. Tuttavia l'uso di essi non ha mai dato luogo nei fermentatori ad inquinamenti dovuti ad aria non sterilizzata.

Queste osservazioni, fanno parte di una serie di studi, non ancora pubblicati, e concordi in linea di massima con quanto trovato da Stark e Pohler (3).

Organi di guida e di tenuta dell'asse ruotante dell'agitatore

Durante lo studio per la progettazione e la realizzazione del complesso degli organi di guida e di tenuta dell'asse ruotante dell'agitatore sono stati presi in particolare considerazione i seguenti punti principali:

1) Usando per l'aerazione il sistema « vortice » l'agitatore deve ruotare ad un numero di giri che variano da 700 a 1500 circa al minuto.

2) Per *alcune* esperienze è necessario che il fermentatore lavori ininterrottamente con l'agitatore in moto per un periodo di tempo di almeno una settimana, durante la quale non è possibile effettuare alcuna riparazione. Deve potersi effettuare, d'altra parte, la lubrificazione del complesso di guida ed il serraggio del pacco di tenuta dell'asse ruotante.

3) Sono da abolire o da ridurre al minimo possibile le perdite d'aria attraverso l'asse dell'agitatore, essendo necessario, per alcuni tipi di fermentazione, mantenere il fermentatore sotto pressione di aria.

Questi concetti base hanno portato, come conseguenza, alla impostazione di parecchi problemi di carattere tecnologico (Paladino - Ugolini - 1953) e fisico (4), comuni a qualunque dimensione del complesso di guida e di tenuta dell'asse ruotante dell'agitatore, dalla soluzione dei quali è stata messa a punto la seguente costruzione che, per questo tipo di fermentatore da laboratorio, è risultata la più idonea (tav. IV).

Da una barra di ottone è stato ricavato il corpo della scatola di guida e di tenuta, che ha la forma e le dimensioni riportate in (2 tav. IV); per i particolari costruttivi vedi (2 tav. IV A). Il foro filettato (a) sulla flangia di base della scatola, chiuso con una vite e una rondella di tenuta di grafite-amianto, del tipo Klingerite, serve durante la fermentazione

---

(2) Bourdillon R. B., Lidwell O. M. e Schuster E. - Spec. Dep. Ser. Med. Res. Counc. London N. 262 Section I, p. 12 (1948).
(3) Stark W. H. e Pohler G. M. - Ind. Eng. Chem., *42*, 1789 (1950).
(4) Paladino S., Ugolini F. - Rend. Ist. Sup. Sanità, *17*, 1234 (1954).

per introdurre il grasso necessario alla lubrificazione del cuscinetto inferiore di guida. La flangia di base è scanalata in due punti (b b) per potervi introdurre una chiave tubolare a denti onde poter avvitare e bloccare tutto il complesso di guida e di tenuta alla testata del fermentatore per mezzo della scatola di acciaio inossidabile (5 tav. IV), filettata in modo da imboccare nella filettatura del foro centrale della testata del fermentatore.

Il corpo cilindrico contenente gli anelli di tenuta è filettato esternamente sopra e sotto la flangia; la filettatura superiore serve a far scendere in piano il cappellotto godronato di ottone (3 tav. IV) del premistoppa (per i particolari costruttivi vedi 3 tav. IV a), che ha lo scopo di comprimere gli anelli di tenuta e di sopportare il cuscinetto a sfere superiore.

Sull'anello interno di quest'ultimo è calettata una pinza cilindro-conica (6 tav. IV) (per i particolari costruttivi vedi 6 tav. IV b), che si stringe all'albero di rotazione (1 tav. IV) per mezzo del controdado godronato (8 tav. IV). Tale disposizione permette all'anello interno del cuscinetto a sfere superiore di seguire il movimento del premistoppa (3 tav. IV) e di fissarlo, all'albero di rotazione, nel grado voluto dopo aver effettuato la compressione necessaria degli anelli di tenuta.

D'altra parte, l'anello interno ed quello esterno del cuscinetto a sfere superiore sono bloccati, il primo per mezzo dell'anello filettato (9 tav. IV) (per i particolari vedi 9 tav. IV b) ed il secondo per mezzo dell'altro anello filettato (4 tav. IV) (per i particolari vedi 4 tav. IV a).

Per gli organi di tenuta sono stati usati degli anelli a sezione quadrata del tipo « Triplex Ammiragliato », costruiti in Italia, composti di treccia di canapa e refe fortemente ritorti, saturati in silicone e grafitati.

Il cuscinetto a sfere inferiore è calettato nella propria sede sotto la flangia della scatola di tenuta; l'anello esterno di esso è stretto dall'anello (10 tav. IV) (per i particolari costruttivi vedi 10 tav. IV b) che lo blocca fra lo spallamento interno della scatola filettata internamente ed esternamente e lo spallamento inferiore della scatola di tenuta (5 tav. IV a) che, essendo interna al fermentatore, è stata costruita in acciaio inossidabile.

La filettatura interna della scatola (5) imbocca nella filettatura esterna inferiore della scatola di tenuta; avvitati i due pezzi, essi vengono stretti mediante una chiave a forcella, che si inserisce nei due fori ciechi creati a questo scopo sulla superficie inferiore della scatola (5).

L'anello interno del cuscinetto a sfere inferiore è bloccato tra il canotto interno della coppa destinata a raccogliere il supero del grasso lu-

brificante (7 tav. IV), (per i particolari vedere 7 tav. IV b), avvitata all'albero rotante dell'agitatore (vedi appresso) e lo spallamento inferiore della parte più larga dell'albero stesso.

Albero ruotante dell'agitatore

L'albero ruotante dell'agitatore (1 tav. IV) è costruito in acciaio inossidabile e porta due filettature: una corrispondente alla posizione, immediatamente susseguente verso il basso, del cuscinetto a sfere inferiore della scatola di guida, per il fissaggio della coppa (7) raccoglitrice dell'eccesso di grasso di lubrificazione onde evitare il gocciolamento in esso nel mezzo di cultura e l'altra corrispondente alla estremità inferiore per il fissaggio dell'elica agitatrice (15 tav. IV c). Nella parte superiore dell'albero è praticata una sede longitudinale fresata, nella quale scorre un perno che collega l'albero con la pinza cilindro-conica di bloccaggio dell'anello interno del cuscinetto a sfere superiore della scatola di guida, allo scopo di evitare che l'albero possa ruotare rispetto all'anello interno del menzionato cuscinetto a sfere.

All'estremità superiore dell'albero è fissato un mezzo giunto elastico per la trasmissione del moto.

Eliche agitatrici

Le eliche adoperate sono state sempre quelle del tipo a turbina (1) costruite in acciaio inossidabile, aventi i diametri esterni approssimativamente di mm. 65,79,90. I particolari costruttivi dell'elica con diametro di mm. 65 sono riportati nella (15 tav. IV) e (15 tav. IV c); le altre di maggior diametro sono state dimensionate in proporzione geometrica rispetto a quella di mm. 65 ad eccezione dell'altezza delle pale, che è stata tenuta per tutte le eliche eguale a mm. 15.

L'elica scelta per la fermentazione viene fissata all'albero di rotazione mediante il dado esagonale (14 b tavola IV) e la rondella di fermo (14 a tav. IV), ambedue in acciaio inossidabile.

Distributori d'aria e antivortici

Se per la fermentazione si vuole utilizzare il sistema di aerazione con antivortici è necessario usare un distributore d'aria, che viene facilmente applicato, avvitandolo al corto tubo filettato dell'ingresso d'aria nel fermentatore (fig. 5).

Il distributore d'aria (2 tav. V) è formato da un tubo di acciaio inossidabile, filettato alle due estremità e sagomato in modo tale che l'aria possa fuoriuscire centralmente sotto l'elica, dirigendosi verso l'alto del fermentatore; la filettatura dell'estremità inferiore serve per potervi avvitare l'ugello polverizzatore d'aria.

Sono stati provati varii tipi di ugelli polverizzatori ed il tipo generalmente usato, riportato nella (2 tav. V), è quello a quattro fori equidistanti, ciascuno del diametro di mm. 1.

Gli antivortici sono costituiti da quattro lame di acciaio inossidabile che misurano mm. 15 di larghezza, mm. 210 di lunghezza e mm. 1 di spessore; esse sono saldate a 90° una dall'altra, alle due estremità, a due anelli metallici aperti, (fig. 4), in modo che, allorquando questi sono inseriti nel fermentatore l'elasticità degli anelli stessi è sufficiente a mantenere gli antivortici aderenti e fissi alla parete interna del fermentatore.

Dispositivo per il prelievo sterile dei campioni

I campioni del liquido di cultura, in condizioni di sterilità, vengono presi sotto pressione attraverso l'apposito tubo di acciaio inossidabile (1 tav. V) che arriva al fondo del fermentatore attraversando il foro (7) della testata. La parte di detto tubo di presa, uscente all'esterno dal foro (7), è sagomata, come è indicato nel disegno, per poter applicare nel tratto verticale un normale morsetto e una pinza da laboratorio al fine di sostenere il complesso relativo alla presa dei campioni, illustrato nella figura 1 e 2; i particolari costruttivi sono riportati nella tav. VI. Il complesso per la presa dei campioni è collegato al tubo di acciaio inossidabile, sopra descritto, per mezzo di un tubo di gomma, resistente a pressione, il quale durante la fermentazione viene chiuso in un punto, per mezzo di una pinza speciale stringitubo riportata nella tav. VII (vedi anche figg. 1 e 2).

Il raccoglitore (1 tav. VI) in vetro pyrex a pareti spesse ha un braccio laterale, anch'esso in vetro, che va collegato mediante un tubo di gomma, resistente alla pressione, al « by pass » (10 tav. III) del filtro sterilizzatore dell'aria che entra nel fermentatore. La parte superiore del raccoglitore è chiusa da un tappo di gomma attraversato da un corto tubo di acciaio inossidabile (9 tav. VI), che ha il compito di collegare, tramite un manicotto di gomma, resistente a pressione, il raccoglitore al tubo di acciaio inossidabile per il prelievo dei campioni (1 tav. V).

Un piccolo anello metallico (13 tav. VI) saldato al tubo (9 tav. VI) impedisce al tappo di gomma di spostarsi verso l'alto; il tubo (9. tav VI) al di sopra di detto anello è rivestito con un pezzo di tubo di gomma

per permettere una più sicura presa al morsetto che sostiene l'intero complesso per il prelevamento dei campioni da fissare alla parte verticale del tubo di presa (1 tav. V).

L'uscita del raccoglitore è collegata mediante un manicotto di gomma, resistente alla pressione, al tubo di acciaio inossidabile (6 tav. VI) da 1/4'', filettato per buona metà della sua lunghezza a partire dall'altra estremità, per permettere il fissaggio del coperchio cilindrico (2 tav. VI) per mezzo del dado e relativo controdado (8 tav. VI). Durante la fermentazione l'estremità inferiore filettata del tubo (6 tav. VI) viene chiusa per mezzo del tappo femmina da 1/4'' filettato (7 tav. VI).

Il raccoglitore, completo della sua parte inferiore, viene bloccato a quella superiore del complesso di presa di campione come illustrato nella tav. VI e precisamente da tre tiranti di ottone (10 tav. VI) che collegano i due anelli di alluminio (5 e 11 tav. VI); il primo dei quali è incastrato in un piccolo anello di gomma (15 tav. VI) infilato sul tubo di uscita del raccoglitore all'altezza del suo innesto con il raccoglitore stesso mentre il secondo è poggiato sul coperchio cilindrico di alluminio (4 tav. VI); l'anello di gomma (15 tav. VI) serve a proteggere il raccoglitore dall'azione di compressione esercitata dai tre tiranti di ottone per mezzo dei tre dadi muniti di galletto (12 tav. VI).

Avvitando alternativamente i galletti si fissa, al grado ritenuto più opportuno, il raccoglitore al tappo di gomma di chiusura.

Lo scopo del coperchio cilindrico di alluminio (4 tav. VI) è quello di allontanare un eventuale pericolo d'inquinamento durante l'operazione di espulsione del liquido di cultura stagnante nella tubazione della presa di campione. Tale pericolo è rappresentato dal fatto che il bordo superiore del raccoglitore in vetro può staccarsi dal tappo di gomma di chiusura a causa di una eventuale pressione eccessiva nel fermentatore; d'altra parte però esso è sempre molto limitato per il fatto che, in questa eventualità, la corrente di aria sterile sotto pressione, impedisce l'ingresso all'interno, ai liquidi o all'aria esterna entrambi non sterili.

Presa campione semplificata

Ad ovviare all'inconveniente sopracitato e per avere una maggiore garanzia di funzionamento per fermentazioni effettuate sotto la pressione di una o due atmosfere tutto il complesso descritto è stato modificato come illustrato nella fig. 3. Il raccoglitore in vetro è stato sostituito da un T da 1/4'' l'estremità superiore del quale è collegata tramite una vite doppia e un tubo di gomma resistente a pressione al tubo di acciaio della presa di campione, mentre l'estremità inferiore è collegata attraverso il manicotto (14 tav. III) al tubo di acciaio inossidabile (6 tav. VI); il

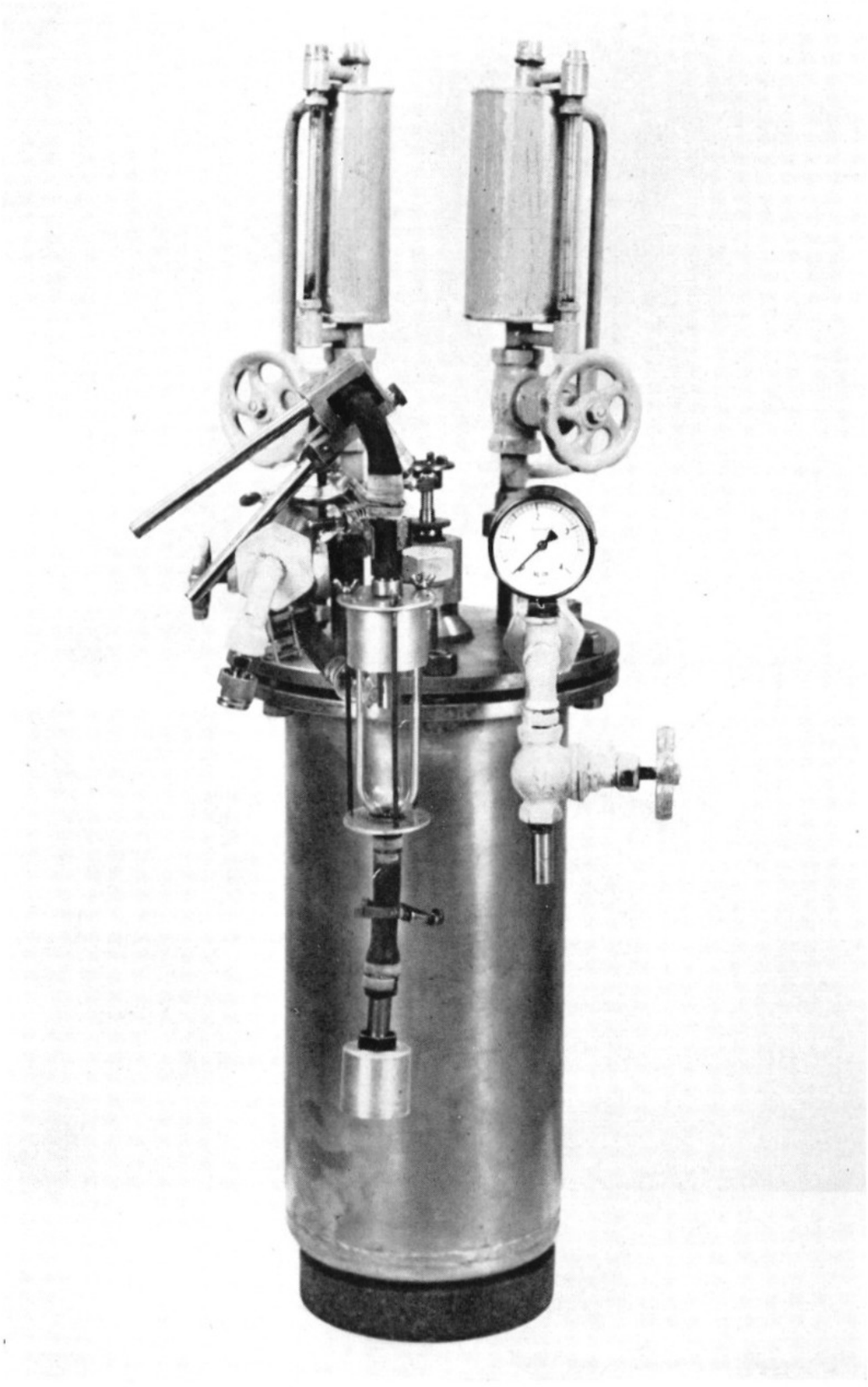


Fig. 1. - Fermentatore completo di dispositivo per la presa di campioni e di recipienti di aggiunta, visto di fronte.

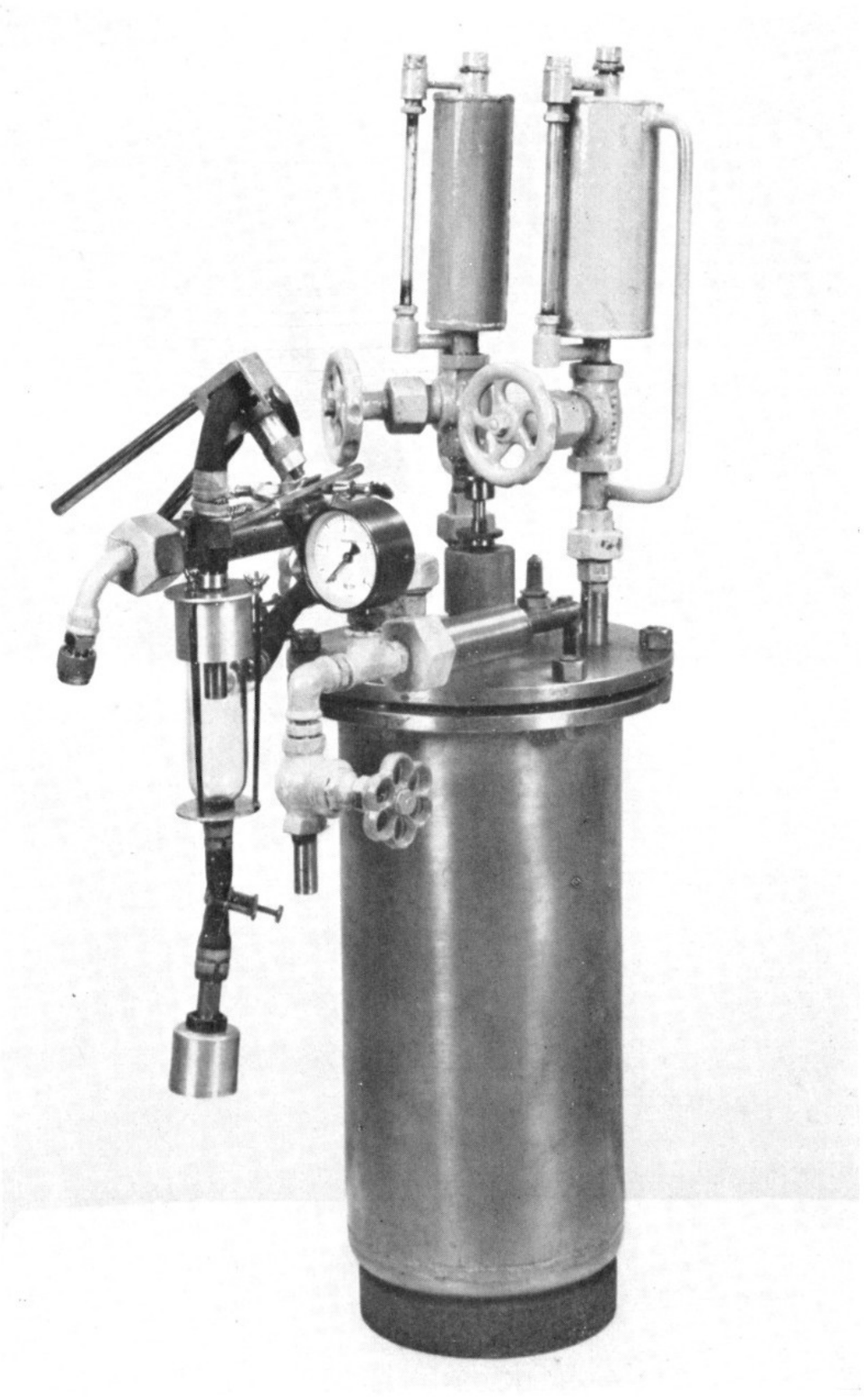


Fig. 2. - Fermentatore completo di dispositivo per la presa di campioni e di recipienti di aggiunta, visto da un lato.

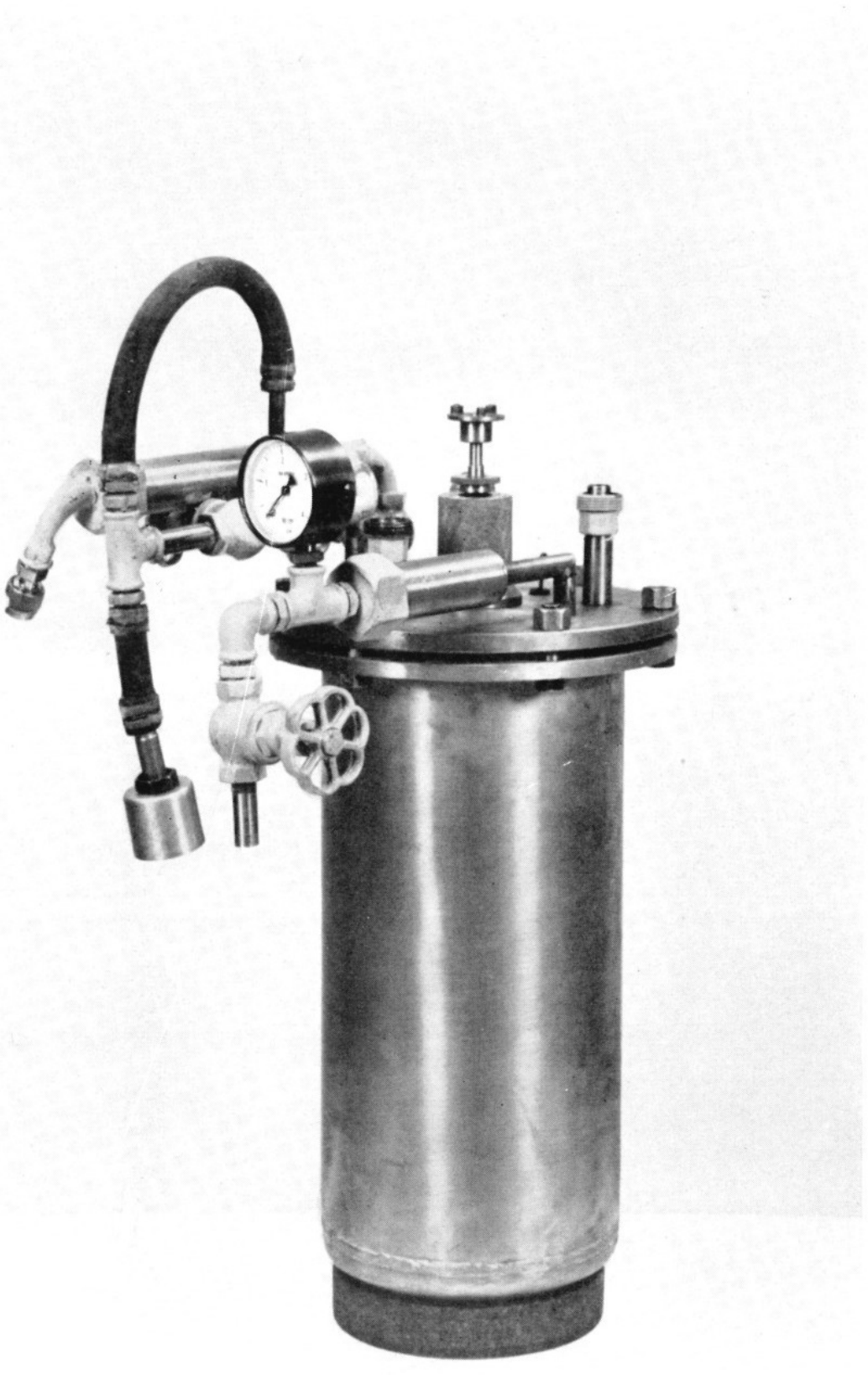


Fig. 3. - Fermentatore senza i recipienti di aggiunta, modificato per l'uso di pressioni maggiori, visto da un lato.

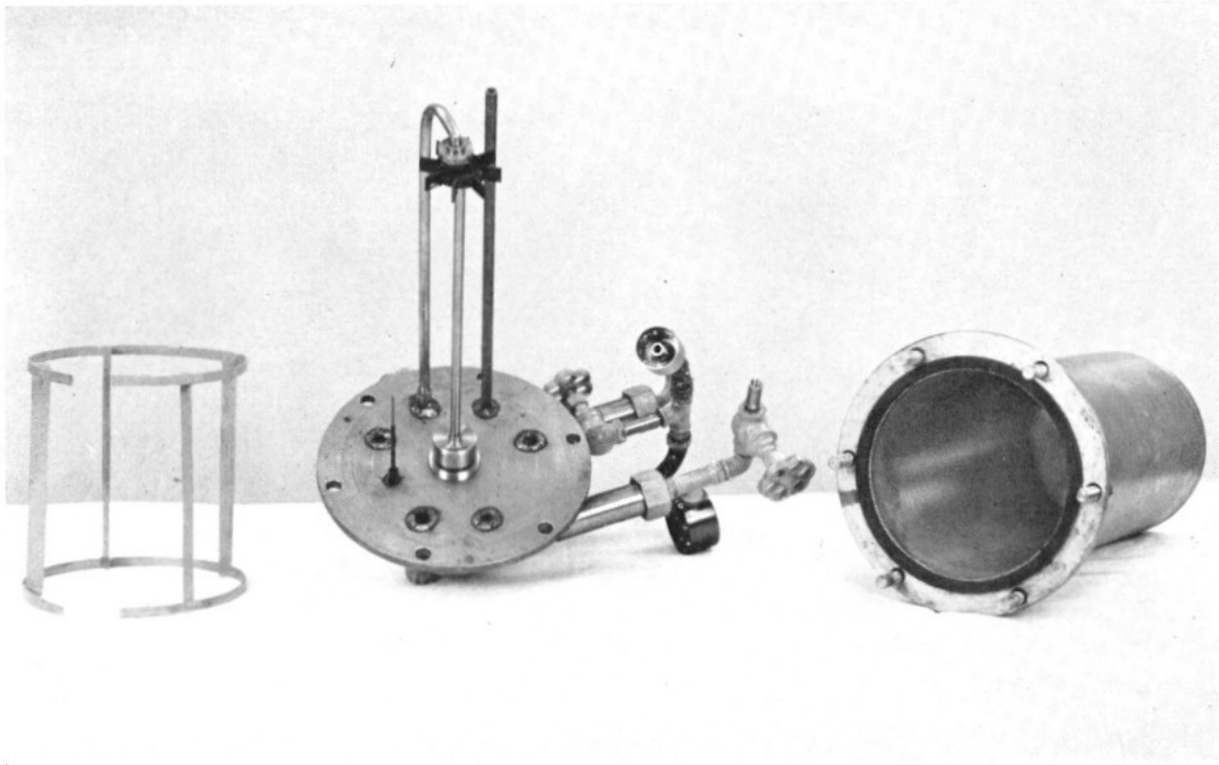


Fig. 4. - Corpo di fermentatore, antivortici e testata del fermentatore con il distributore dell'aria.

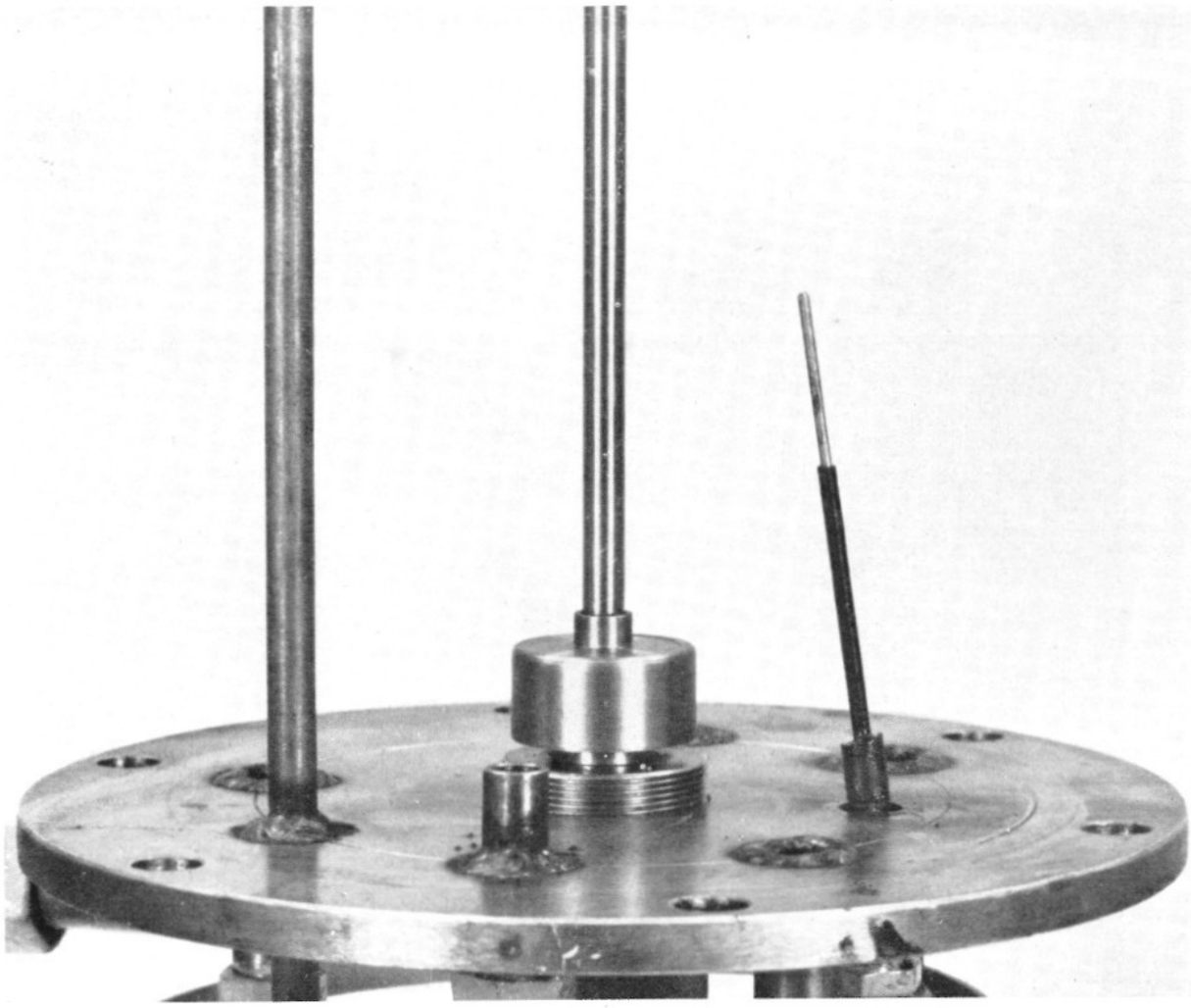


Fig. 5. - Particolare della testata del fermentatore con l'elettrodo, la coppa del grasso ed il tubo del distributore dell'aria.

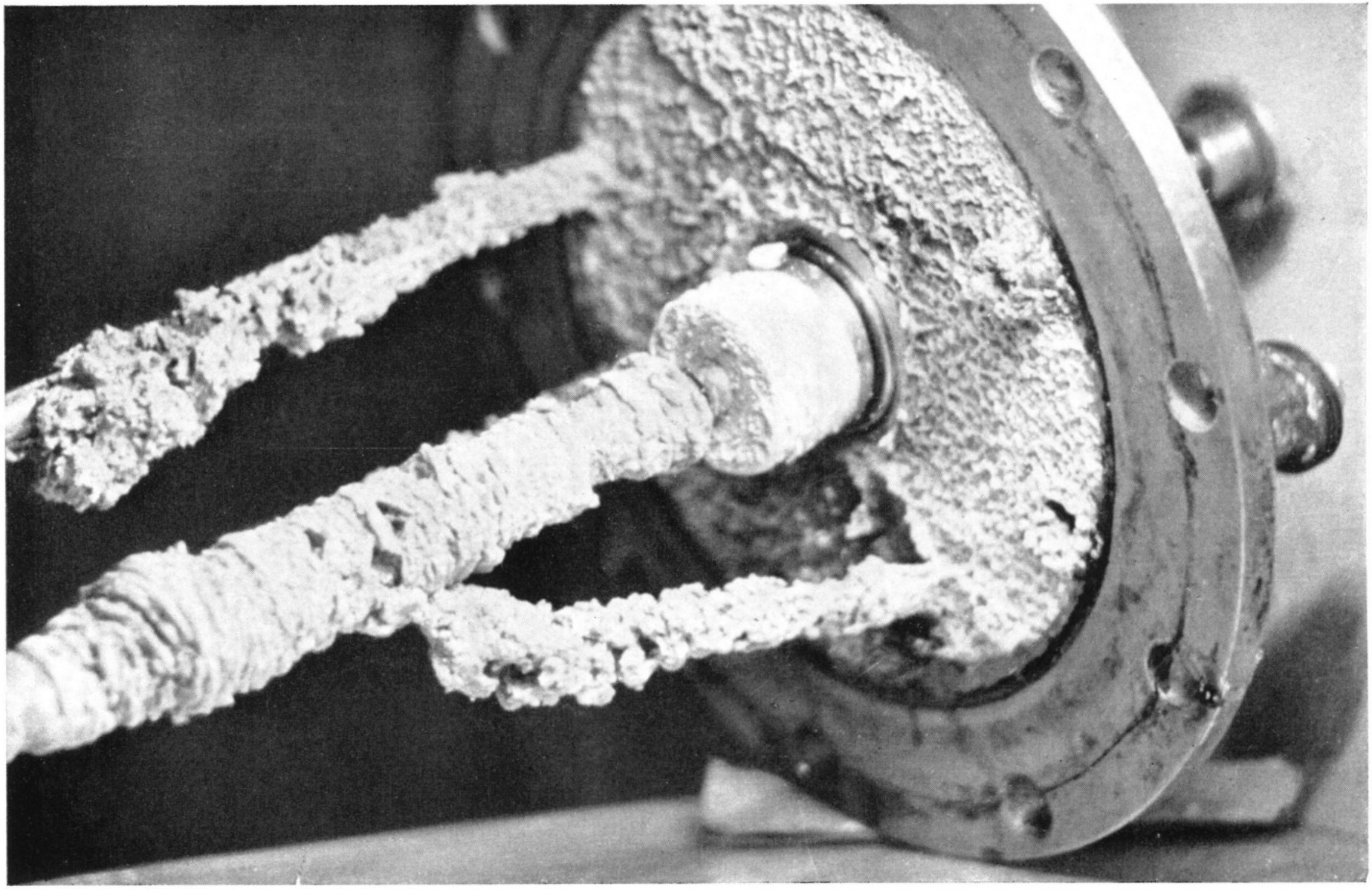


Fig. 6. - Testata del fermentatore dopo una fermentazione nella quale si è avuta una formazione eccessiva di schiuma.

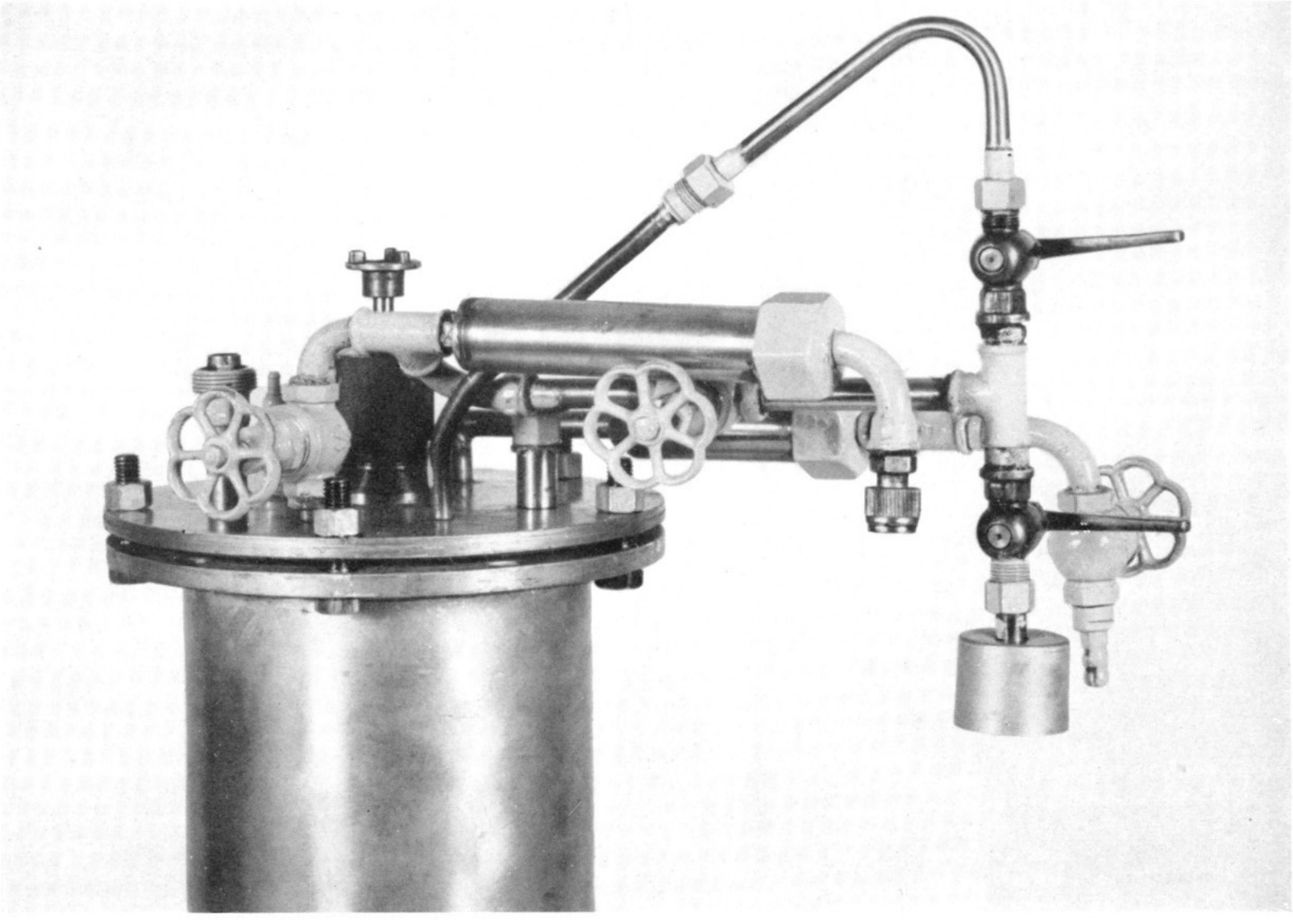


Fig. 7. - Testata del fermentatore completo di dispositivo per la presa di campioni in ferro.

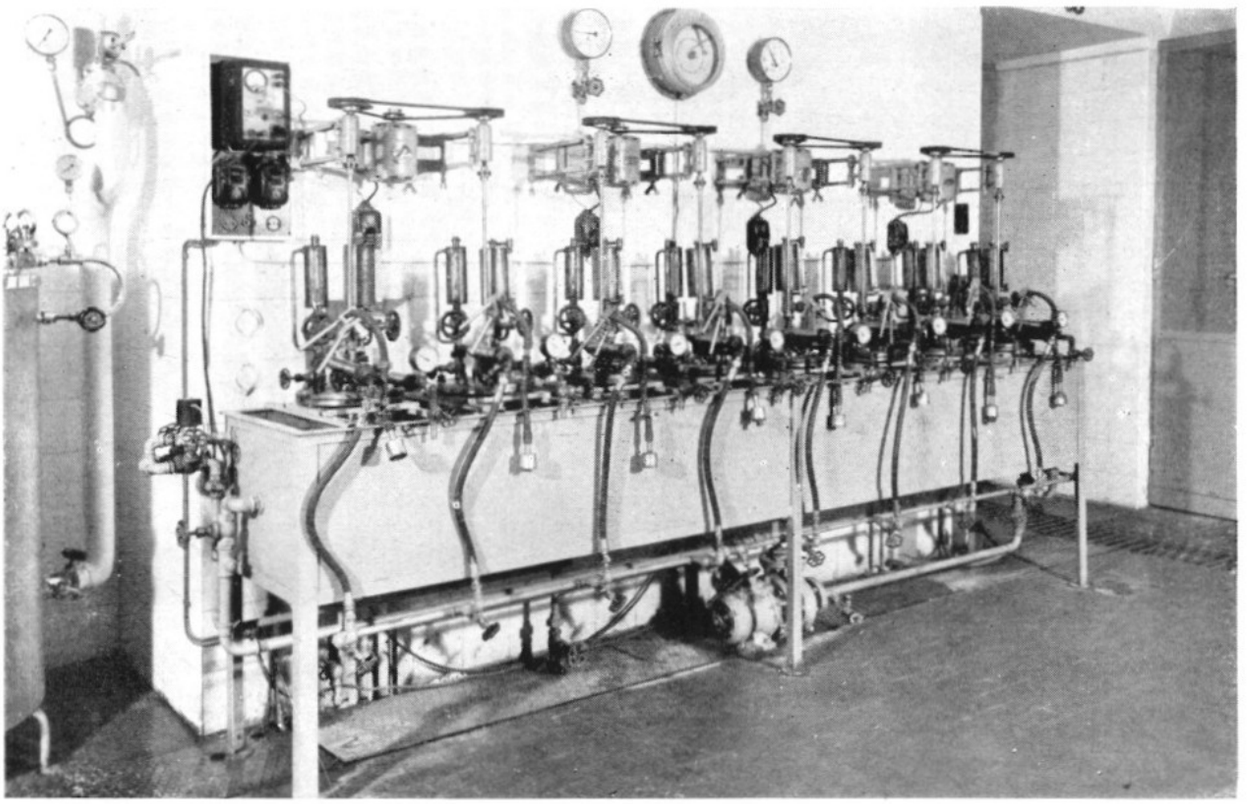


Fig. 8. - Gruppo di fermentatori durante la fermentazione.

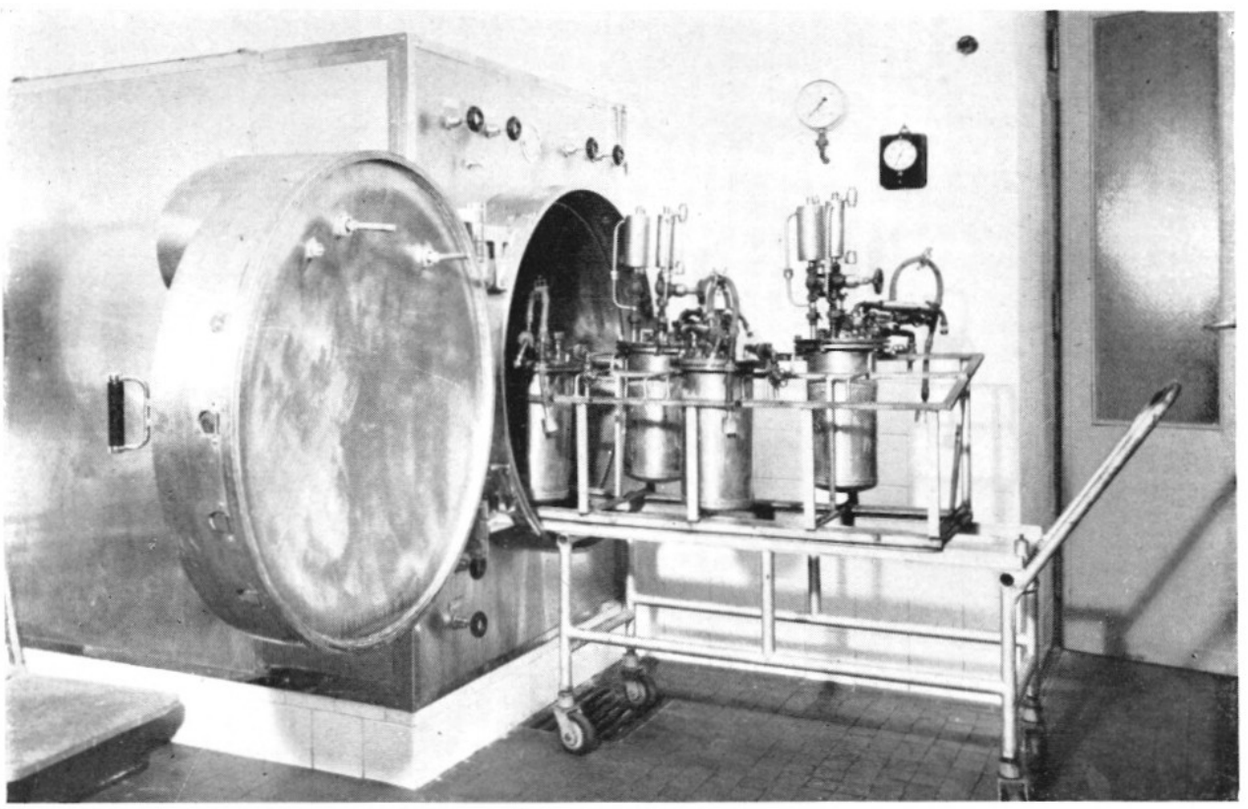
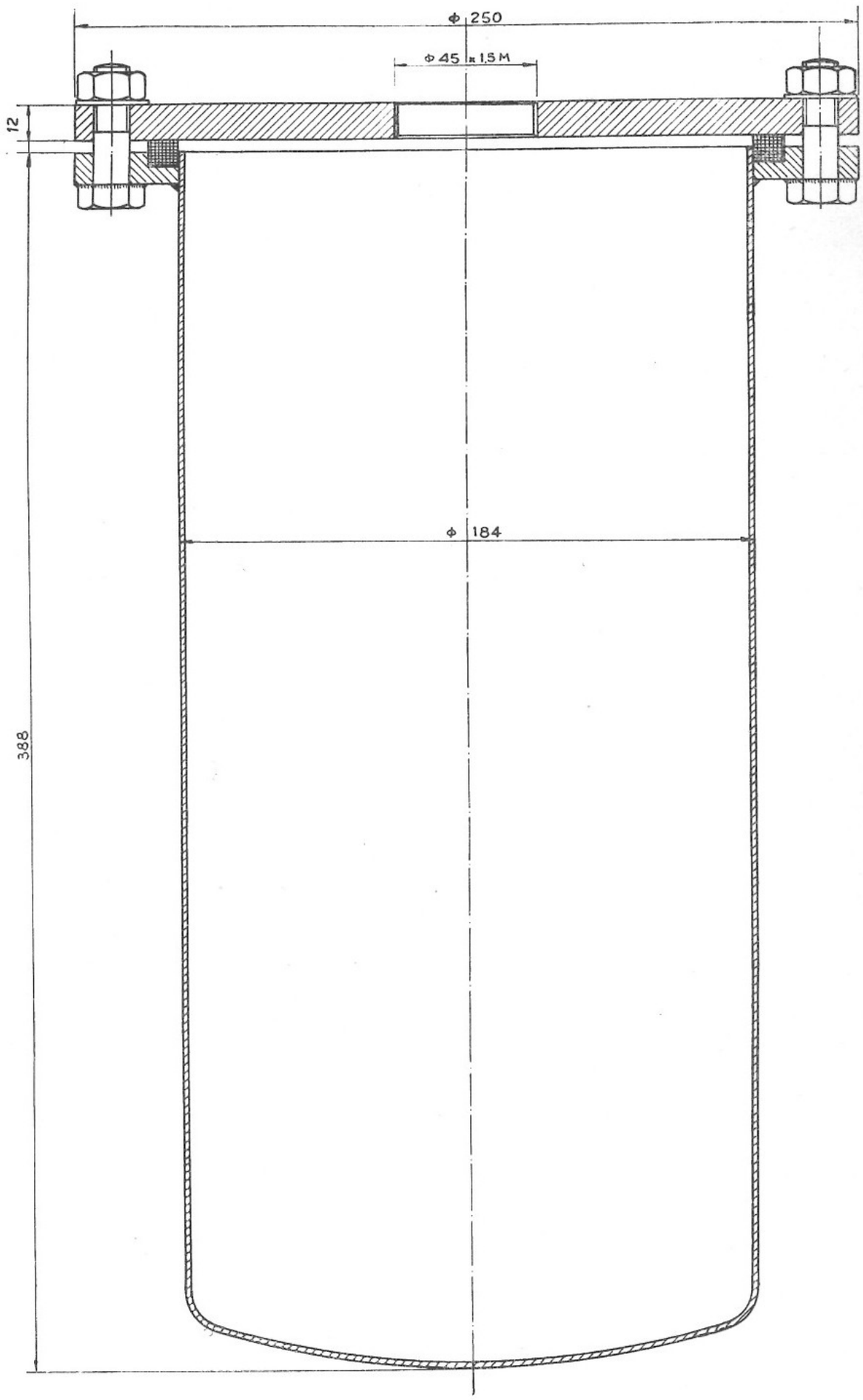
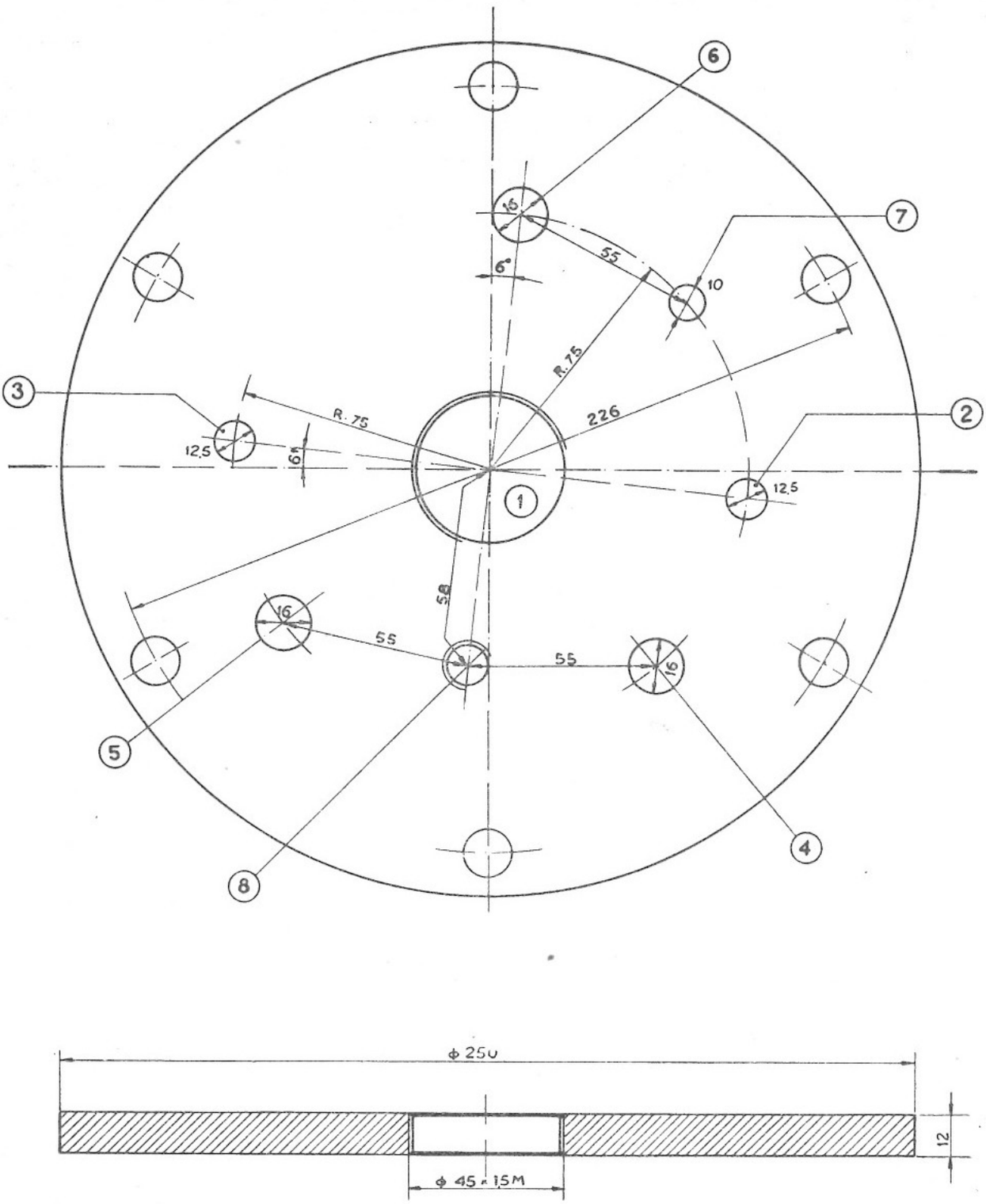


Fig. 9. - Gruppo di fermentatori pronto per la sterilizzazione.

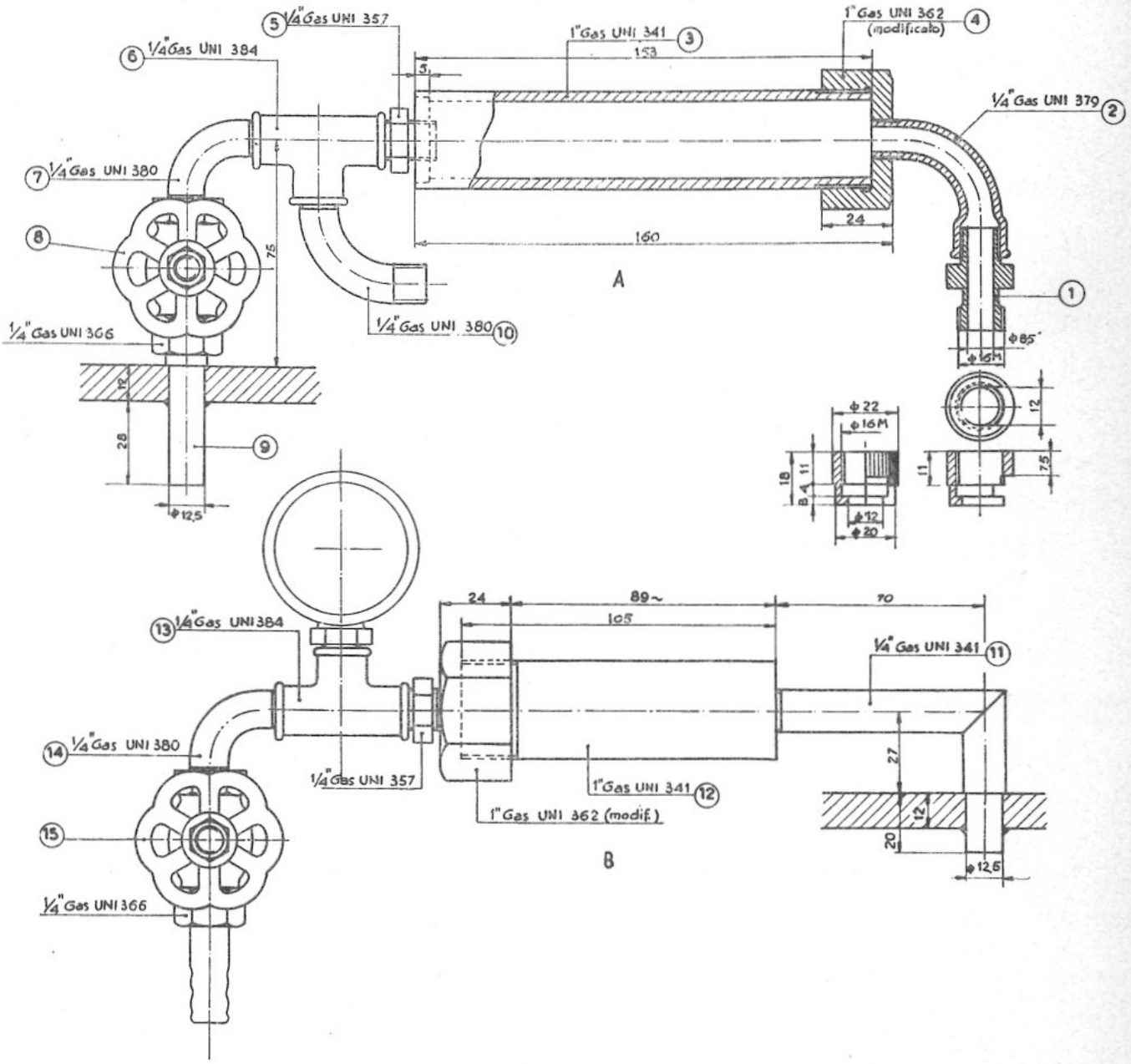


Tav. I - Sezione della testata e del corpo del fermentatore senza accessori.



Tav. II - Testata del fermentatore; piano di foratura.

1) Complesso di guida e di tenuta.
2) Ingresso dell'aria.
3) Uscita dell'aria.
4)-5) Ingresso dei liquidi durante la fermentazione.
6) Ingresso dell'inoculo.
7) Pesa dei campioni.
8) Elettrodo di controllo dello schiuma.



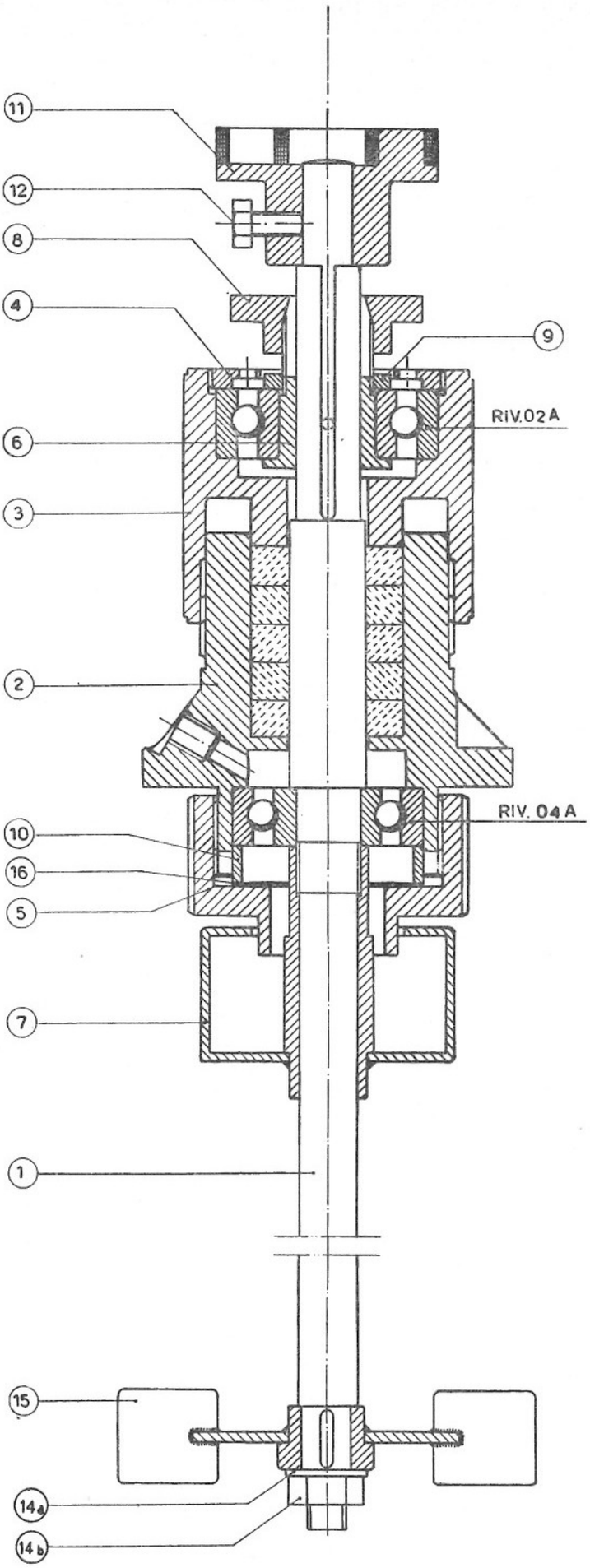
Tav. III - Particolari dell'entrata (A) e dell'uscita dell'aria (B).

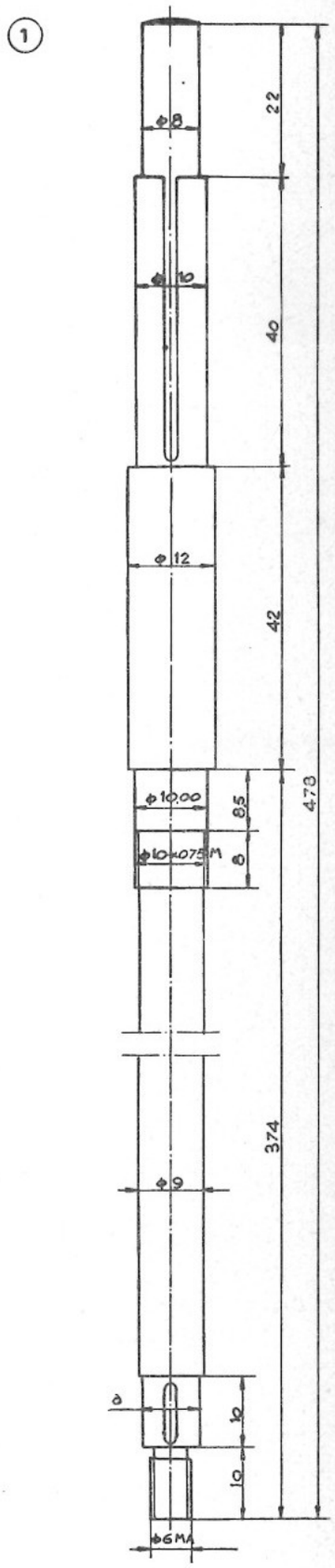
1) Attacco rapido.
2) Curva.
3) Filtro dell'aria.
4) Coperchio del filtro.
5) Vite doppia.
6) T
7) Curva.
8) Valvola.
9) Tubo di attacco del distributore dell'aria.
10) By-pass.
11) Tubo di uscita dell'aria.
12) Filtro dell'aria di uscita.
13) T per il manometro.
14) Curva.
15) Valvola.

Tav. IV. - Complesso di guida e tenuta dell'agitatore.

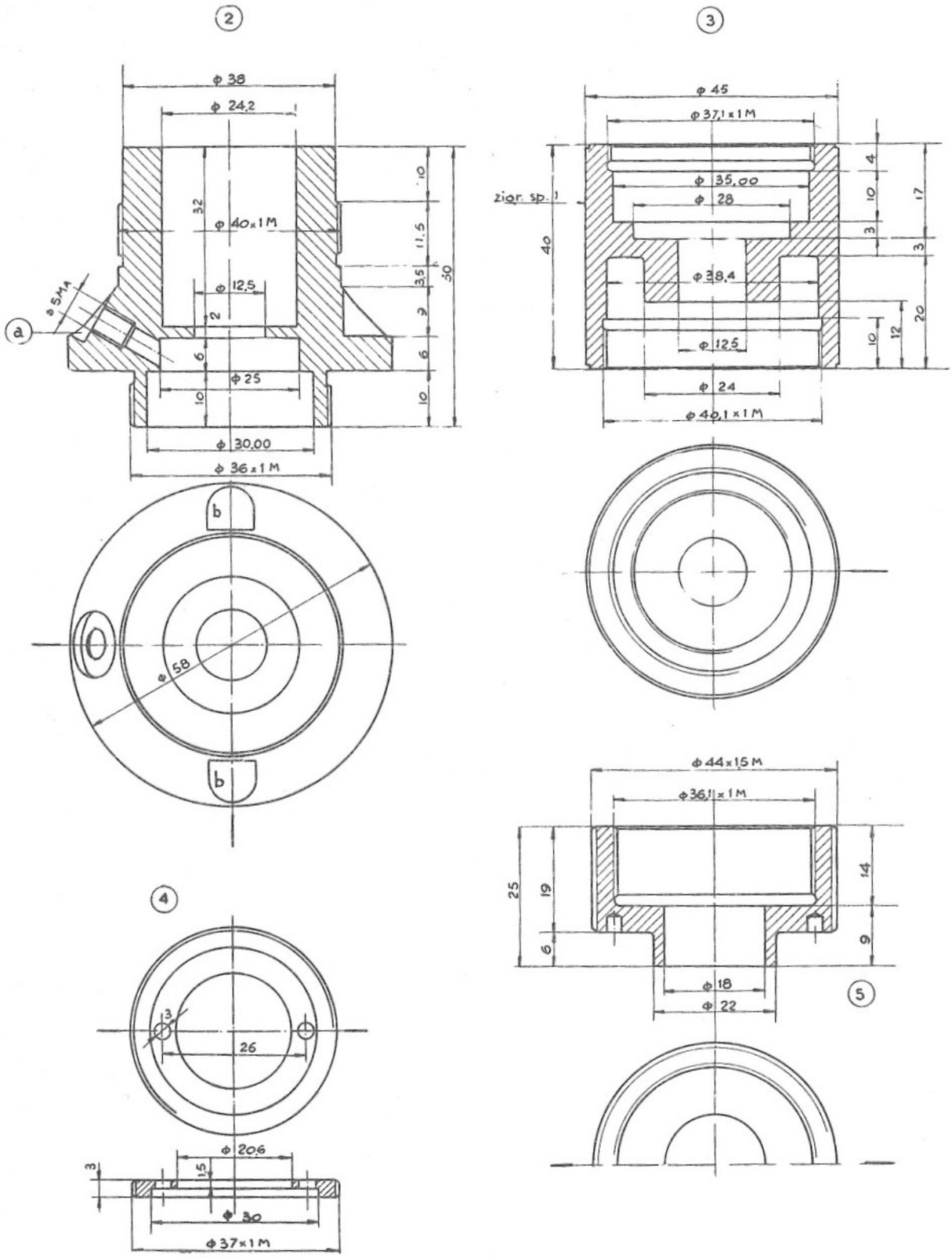
Componenti	*Materiali*
1) Albero.	Acciaio inox.
2) Corpo.	Ottone.
3) Cappellotto premistoppa.	Ottone.
4) Anello di bloccaggio.	Ottone.
5) Cappellotto inferiore.	Acciaio inox.
6) Manicotto a pinza.	Ottone.
7) Coppa raccoglitrice del grasso di supero.	Acciaio inox.
8) Anello di bloccaggio.	Ottone.
9) Dado di bloccaggio.	Ottone.
10) Anello distanziatore.	Acciaio inox.
11) Semi-giunto di accoppiamento.	
12) Semi-giunto di accoppiamento.	
14-*a*) Rondella di fermo.	Acciaio inox.
14-*b*) Dado di bloccaggio.	Acciaio inox.
15) Elica.	Acciaio inox.
16) Paraolio.	

Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.

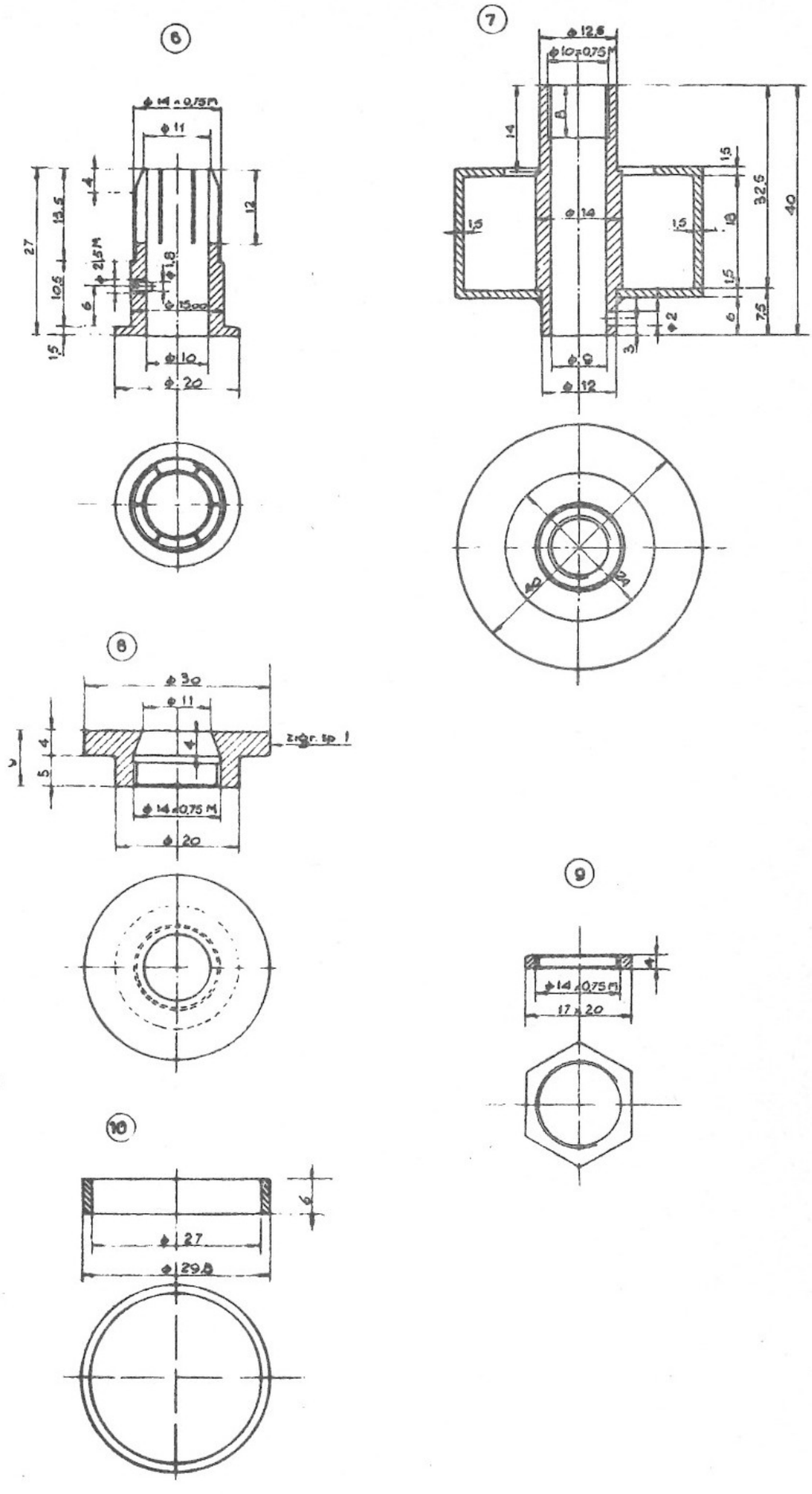




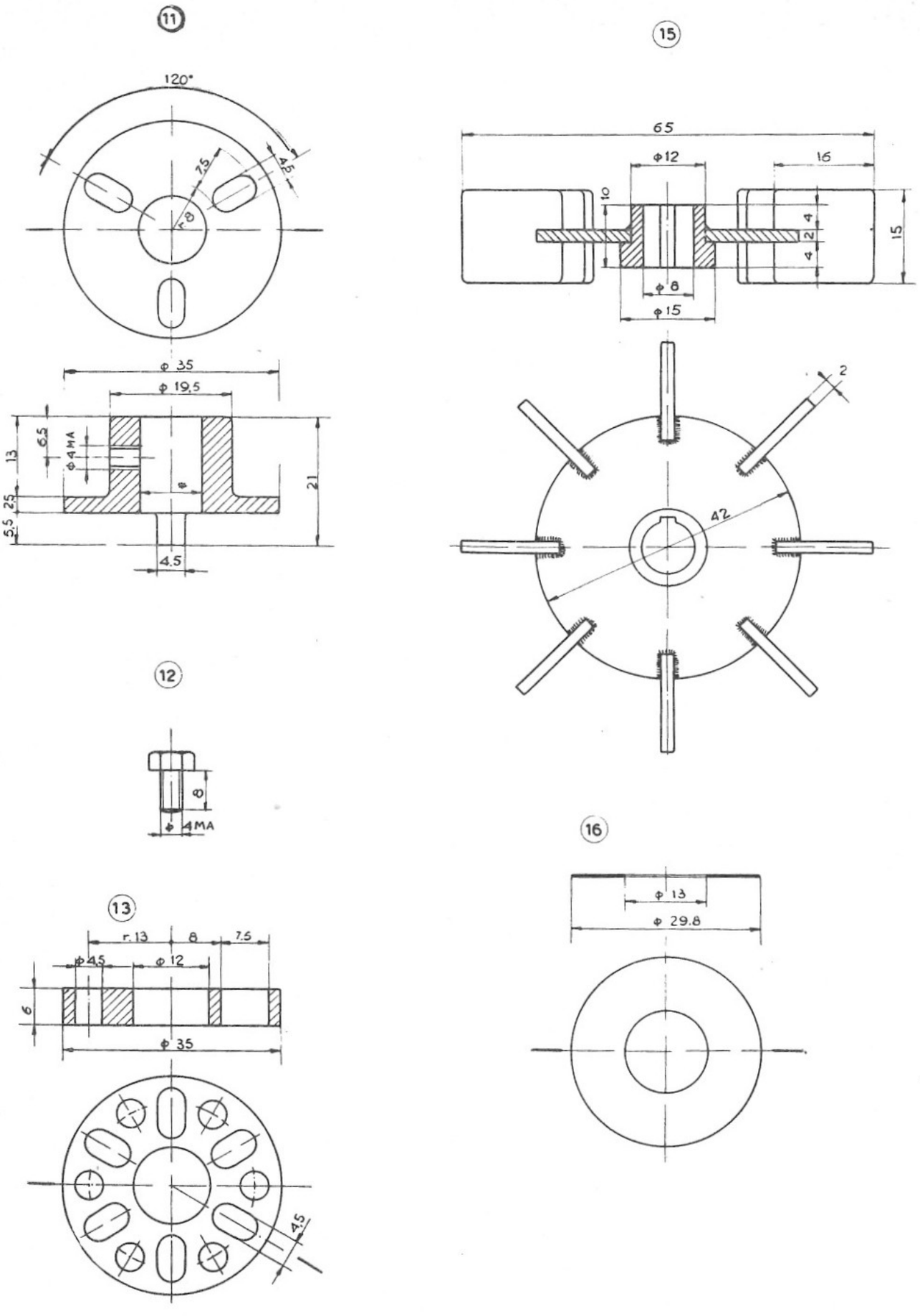
Tav. IV



Tav. IV-a - Dettagli di 2, 3, 4 e 5 della Tav. IV.

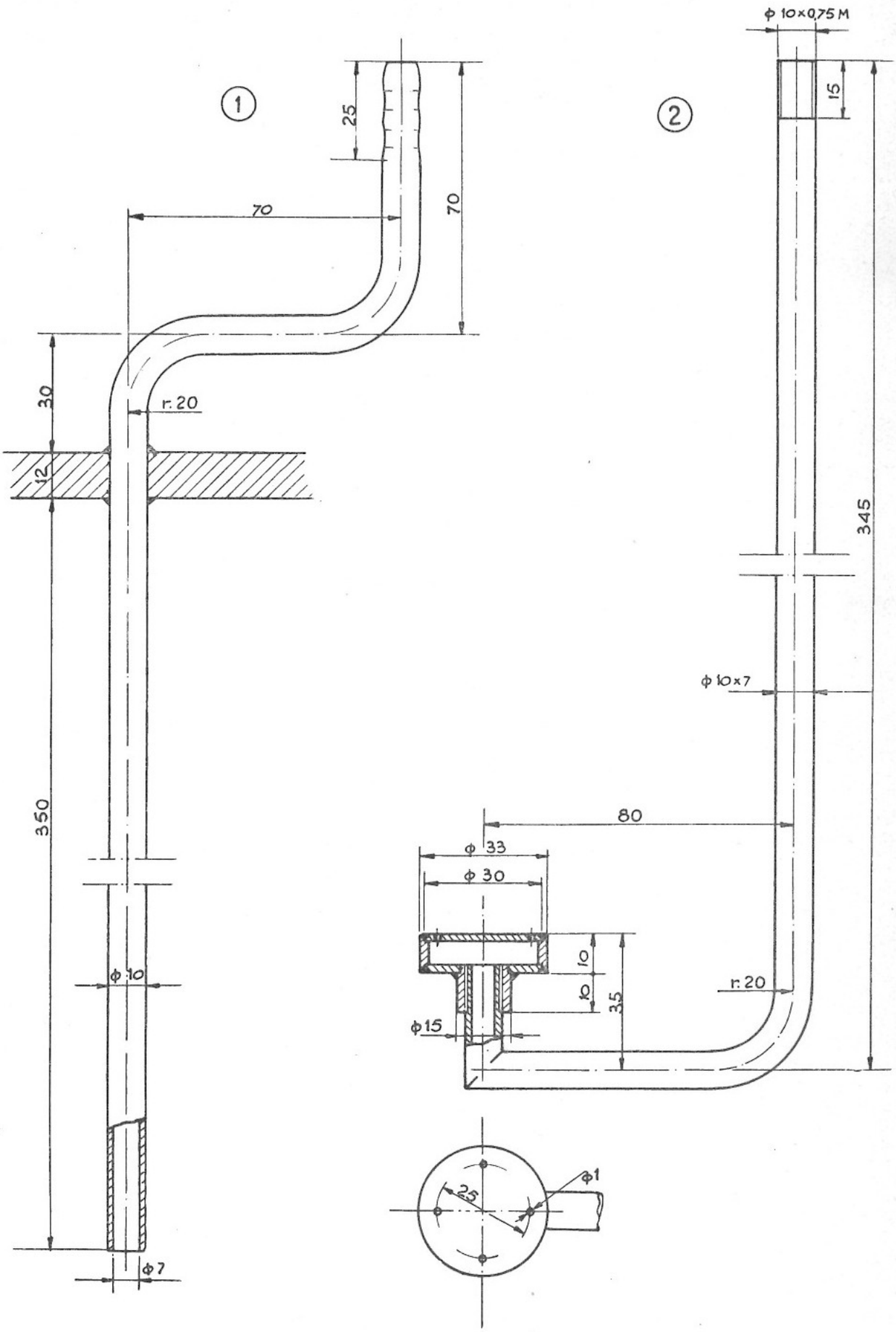


Tav. IV-b - Dettagli di 6, 7, 8, 9 e 10 della Tav. IV.



Tav. IV-c - Dettagli di 11, 12, 13, 15 e 16 della Tav. IV.

Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.



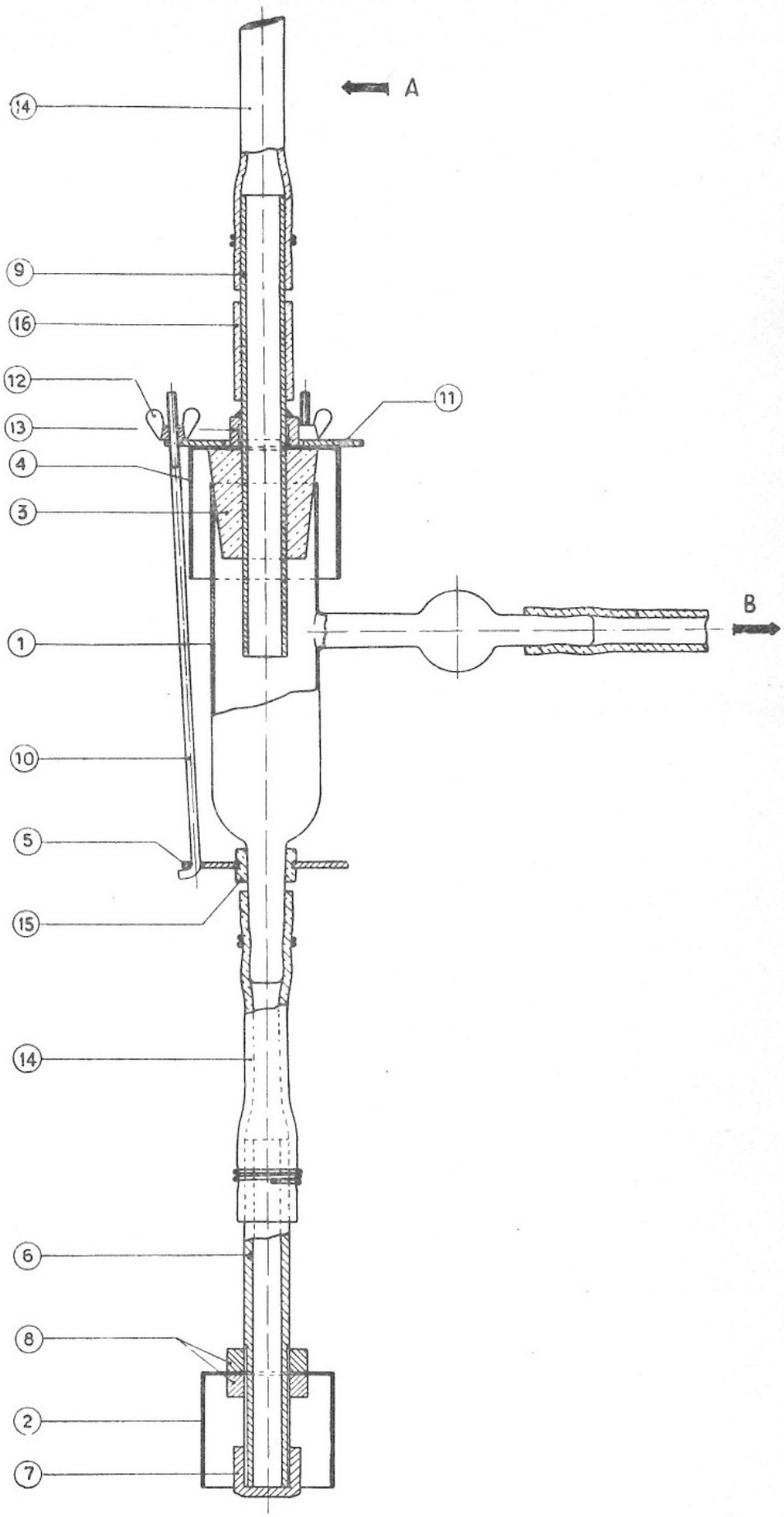
Tav. V - 1) Tubo presa di campione; 2) Distributore di aria.

Tav. VI - Presa di campione.

Componenti	*Materiali*
1) Raccoglitore.	Vetro (pyrex).
2) Coppa.	Alluminio.
3) Tappo forato.	Gomma.
4) Campana.	Alluminio.
5) Disco.	Alluminio.
6) Tubo di uscita.	Acciaio inox.
7) Cappellotto.	Ferro.
8) Dadi fissaggio coppa.	Ferro.
9) Tubo d'ingresso.	Acciaio inox.
10) Tiranti.	Ottone.
11) Disco.	Alluminio.
12) Dadi a farfalla.	Ferro.
13) Anello di bloccaggio.	Acciaio inox.
14) Tubo di allacciamento.	Gomma.
15) Cuscinetto ammortizzatore.	Gomma.
16) Guarnizione tubo ingresso.	Gomma.

A) Al tubo per la presa di campioni (1 Tav. V).
B) Al by-pass del filtro di entrata dell'aria (10 Tav. III).

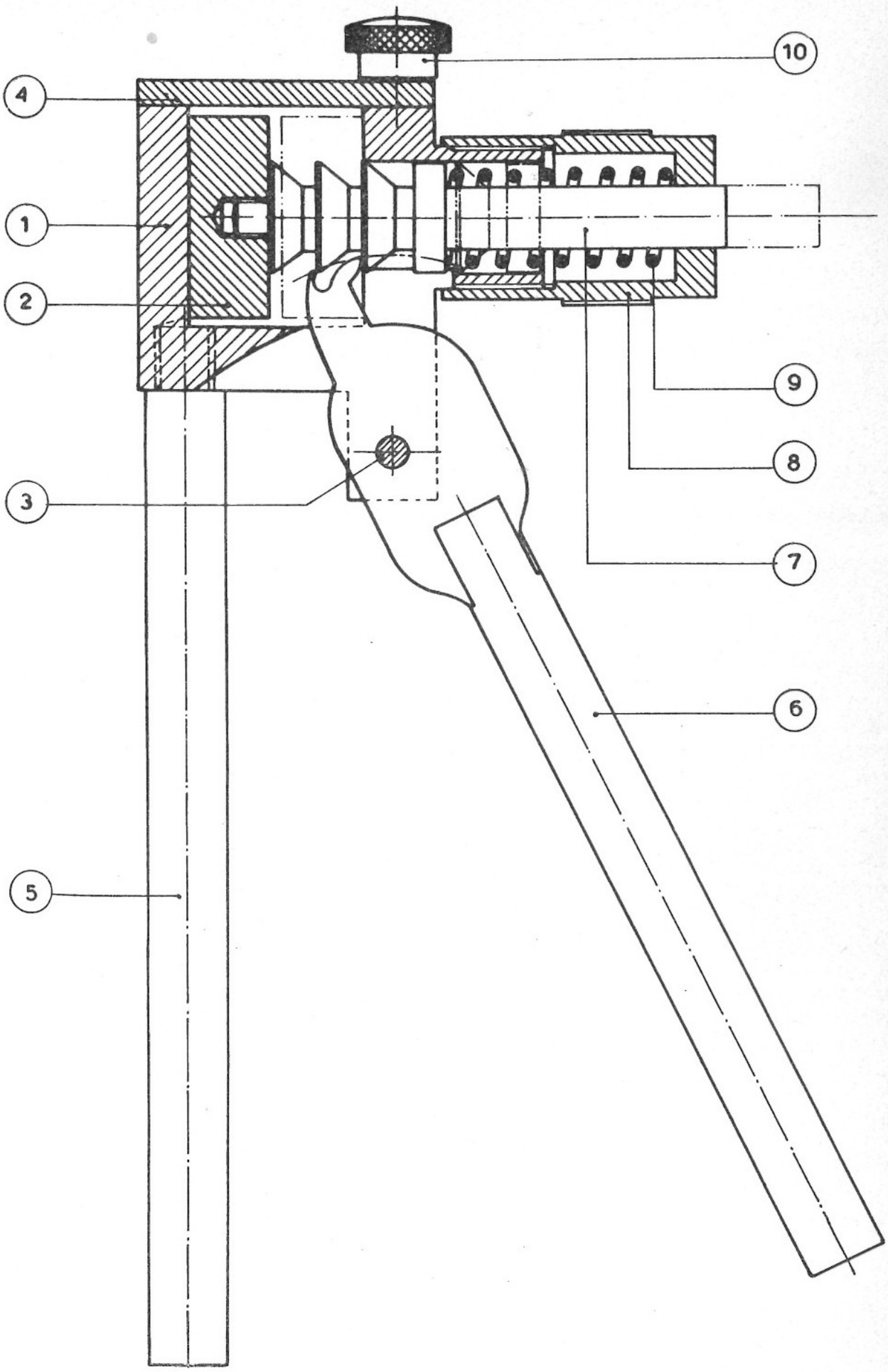
Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.



Tav. VI

Tav. VII - Pinza speciale a molla per la presa dei campioni.

Componenti	*Materiali*
1) Corpo.	Alluminio.
2) Piastra stringitubo.	Ottone.
3) Perno dell'articolazione.	Acciaio.
4) Piastra.	Alluminio.
5) Impugnatura fissa.	Tubo di acciaio.
6) Impugnatura mobile.	Tubo di acciaio.
7) Pistone comandante la piastra stringitubo.	Acciaio.
8) Cappellotto di regolazione della molla di pressione.	Alluminio.
9) Molla.	Acciaio.
10) Nottolino di bloccaggio della piastra stringitubo.	Acciaio.



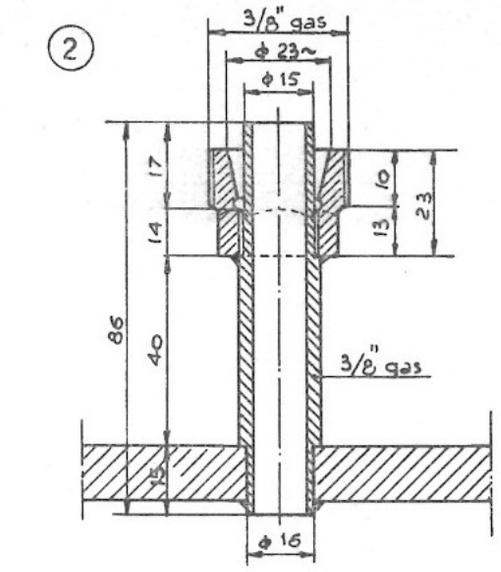
Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.

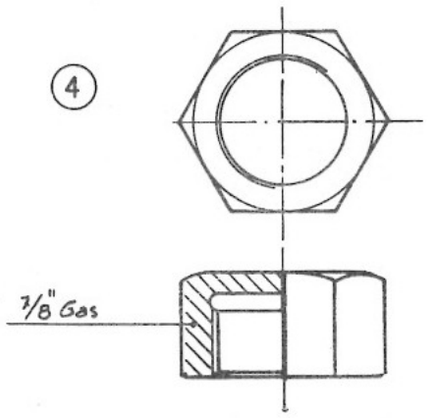
Tav. VII

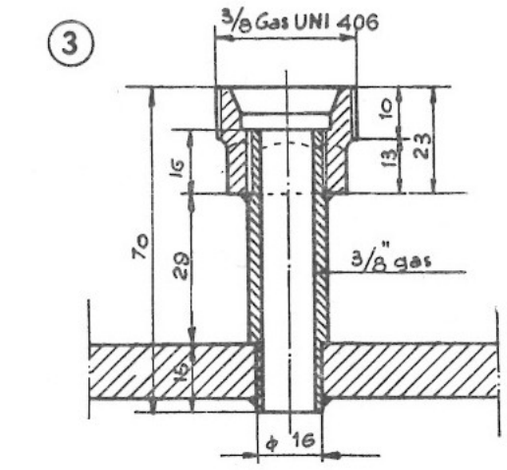
Tav. VIII - Dettagli:

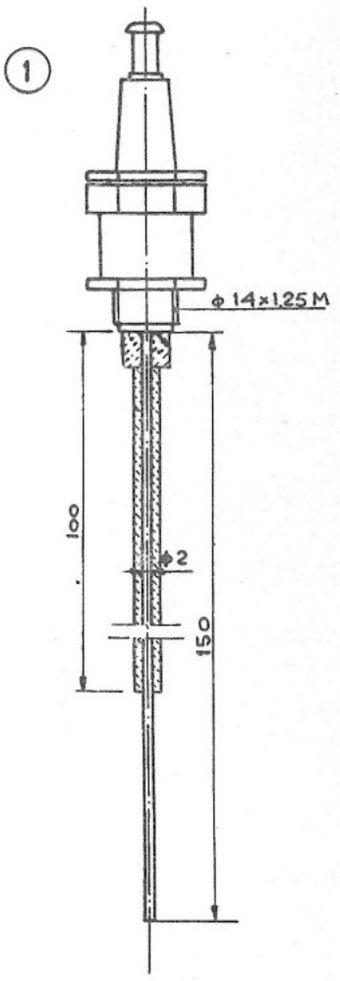
1) Elettrodo rivelatore della schiuma.
2) Imbocco per l'attacco dei recipienti per la introduzione di liquidi (2).
3) Imbocco per l'inoculo;
4) Cappellotto di chiusura degl'imbocchi.

Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.







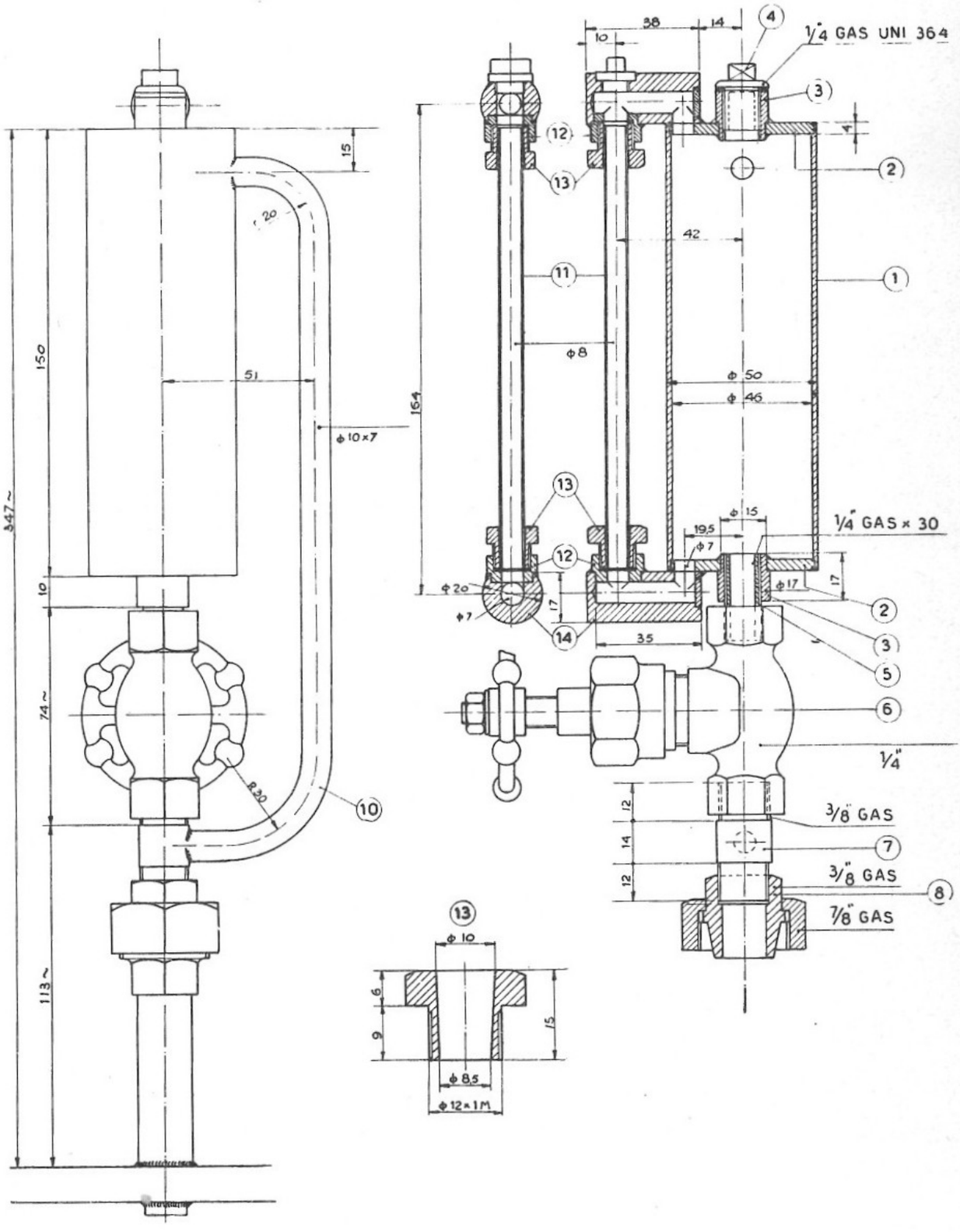


Tav. VIII

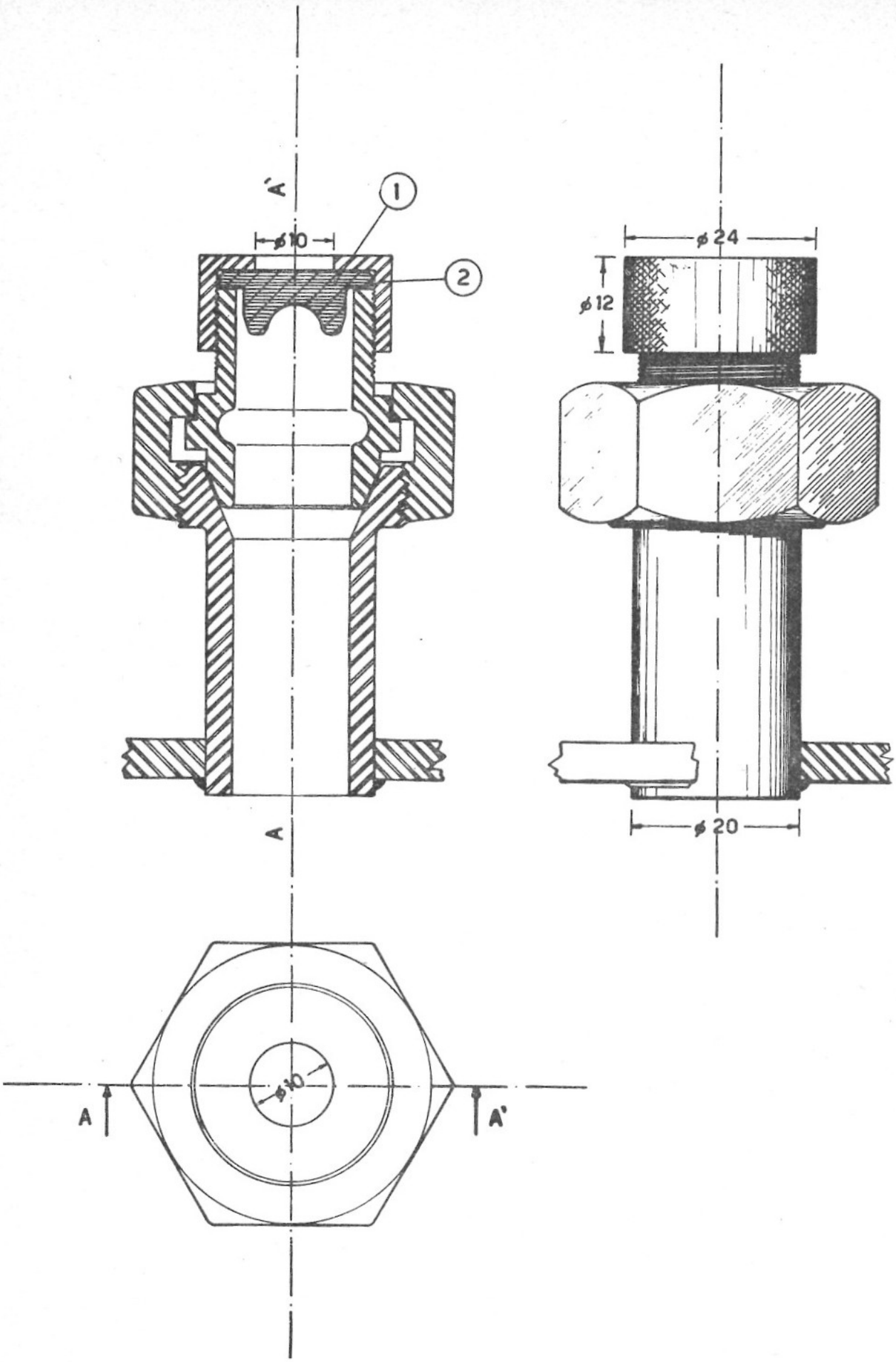
Tav. IX - Particolari di costruzione dei recipienti per l'aggiunta di soluzioni durante la fermentazione.

Componenti	*Materiali*
1) Recipiente cilindrico.	Acciaio inox.
2) Fondo.	Acciaio inox.
3) Bocca per il riempimento.	Acciaio inox.
4) Tappo di chiusura.	Acciaio inox.
5) Vite liscia.	Acciaio inox.
6) Valvola a pistone.	Acciaio inossidabile per il pistone e la sua sede, il resto in bronzo.
7) Tubo con innesto a 90°.	Acciaio inox.
8) Bocchettone d'innesto.	Ferro.
9) Tubo d'ingresso nel fermentatore.	Acciaio inox.
10) Tubo equilibratore.	Acciaio inox.
11) Tubo di livello.	Vetro pyrex.
12) Sede del livello.	Acciaio inox.
13) Premistoppa tubo di livello.	Ottone.
14) Tubo di connessione con il livello.	Acciaio inox.

Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.

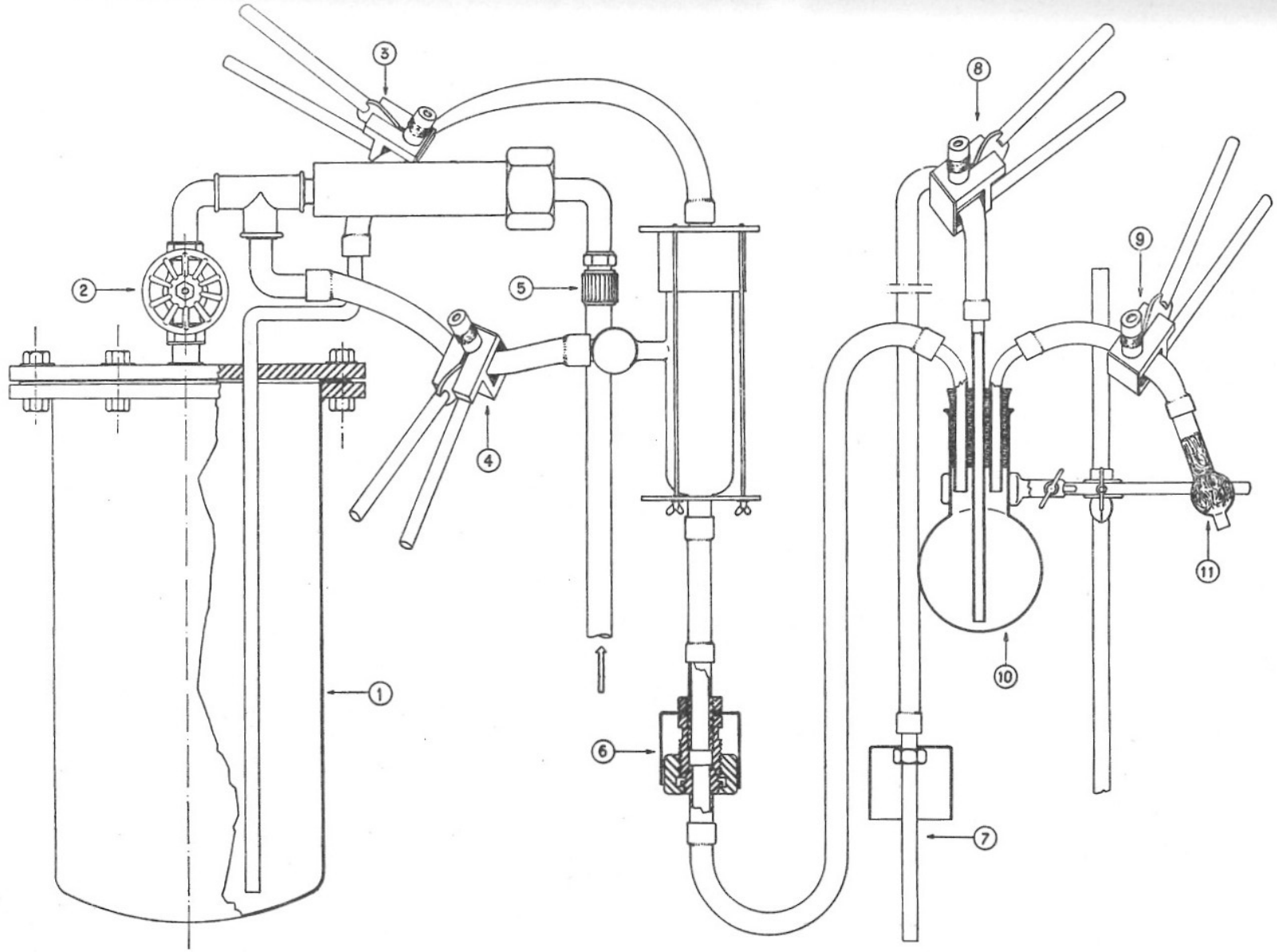


Tav. IX



Tav. X - Tappo speciale per l'aggiunta di soluzioni mediante siringa ipodermica.

1) Diaframma di gomma.
2) Cappellotto di bloccaggio.



Tav. XI - Schema del complesso per il trasferimento dell'inoculo.

1) Fermentatore di semina.
2) Valvola d'ingresso dell'aria nel fermentatore di semina.
3) Pinza per la chiusura del tubo in gomma della presa dei campioni.
4) Pinza sul by-pass.
5) Ingresso dell'aria compressa dalla distributrice.
6) Attacco.
7) Campana del tubo d'inoculo.
8) Pinza sul tubo d'inoculo.
9) Pinza sul tubo per lo scarico dell'aria.
10) Recipiente per la misura dell'inoculo.
11) Filtro sterilizzatore sullo scarico dell'aria.

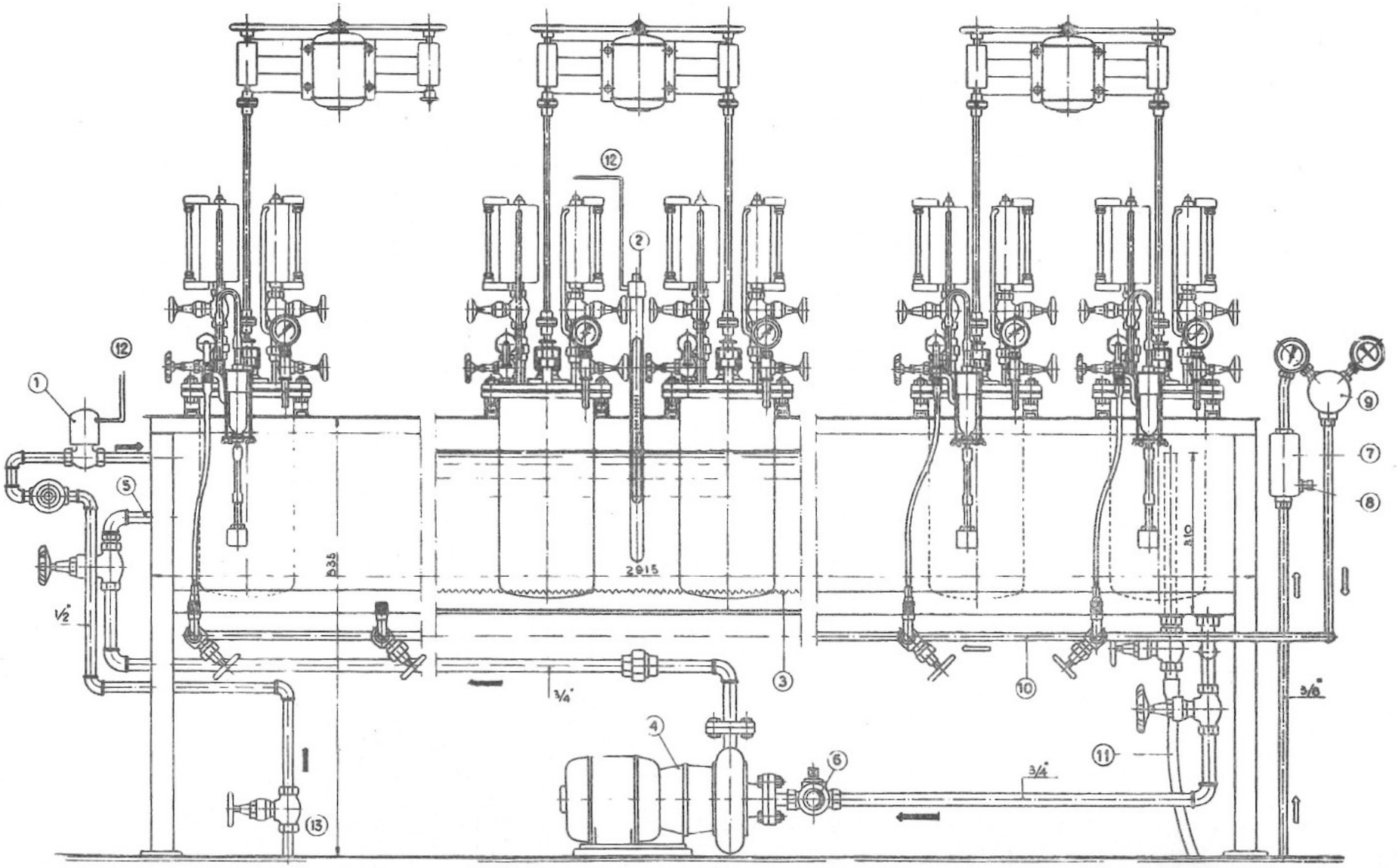
Tav. XII - Disposizione generale di un gruppo di fermentatori in una vasca termostatica.

1) Valvola elettromagnetica sull'ingresso dell'acqua per la termoregolazione.
2) Elemento termosensibile, con contatti elettrici, a mercurio o bimetallico.
3) Riscaldatori elettrici ad immersione.
4) Elettropompa per il riciclo dell'acqua per la termoregolazione.
5) Ingresso dell'acqua di riciclo.
6) Rubinetto a maschio per lo scarico.
7) Trappola per l'olio sull'arrivo dell'aria compressa.
8) Valvola di scarico.
9) Valvola di riduzione della pressione dell'aria compressa.
10) Distributrice dell'aria compressa.
11) Tubazione di scarico del troppo pieno.
12) Al relais elettronico.
13) Alimentatrice acqua fredda.

⇨ Aria.

➡ Acqua.

Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.

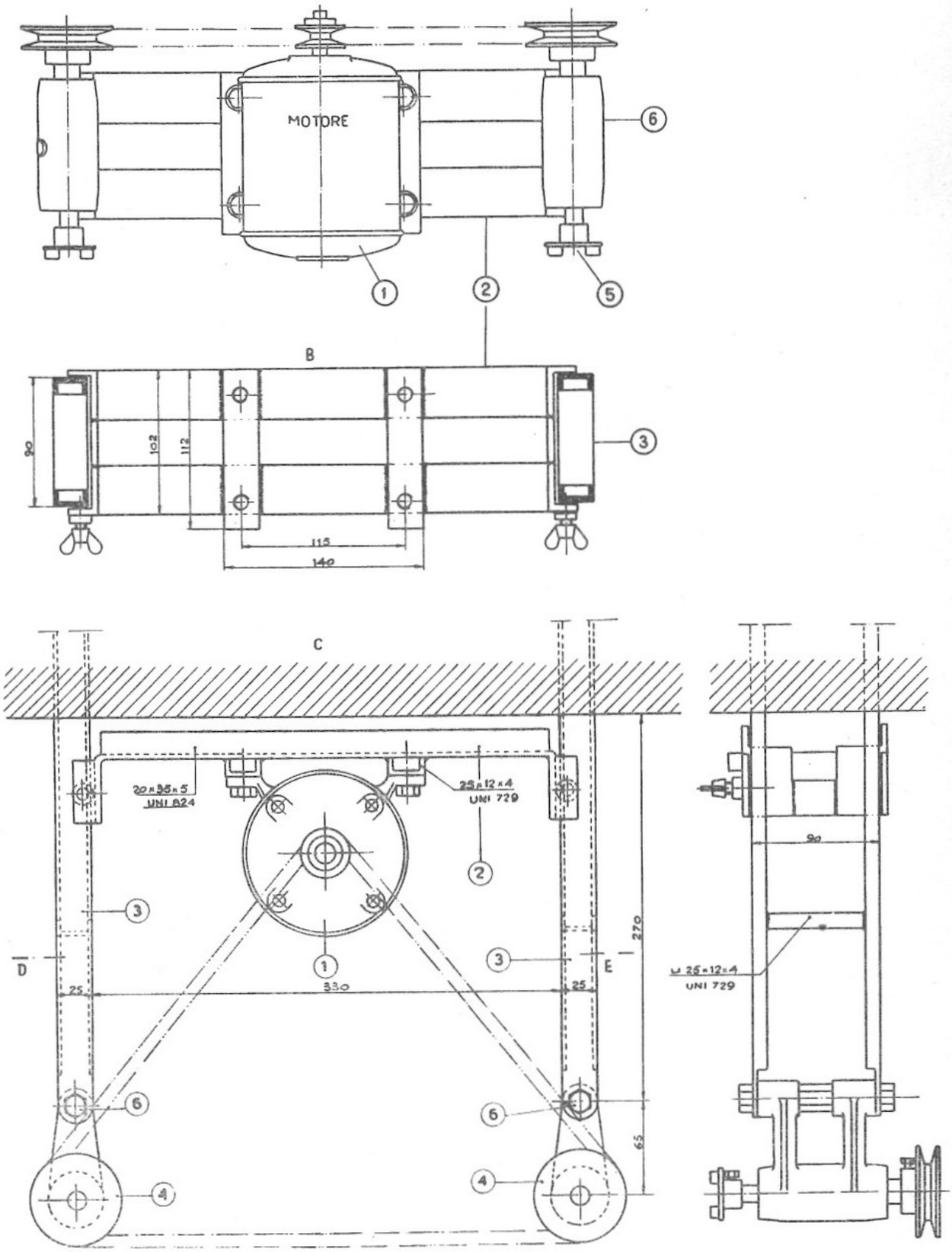


Tav. XII

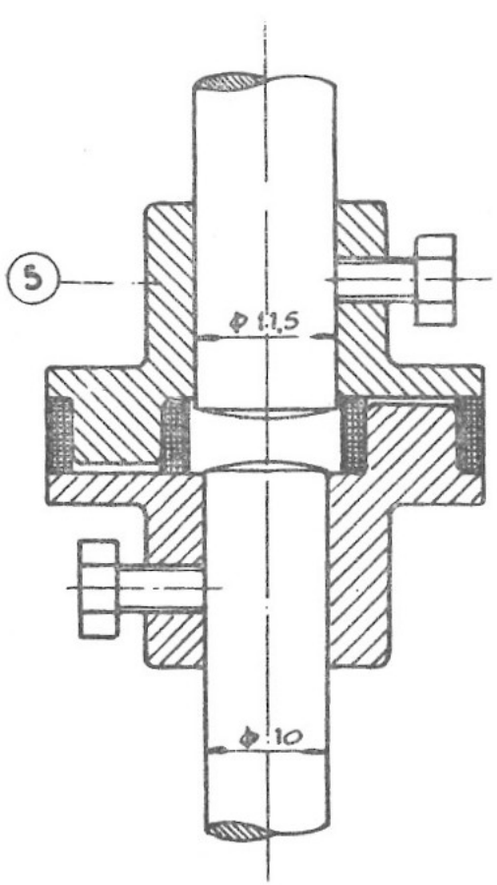
Tav. XIII - Trasmissione del moto agli agitatori.

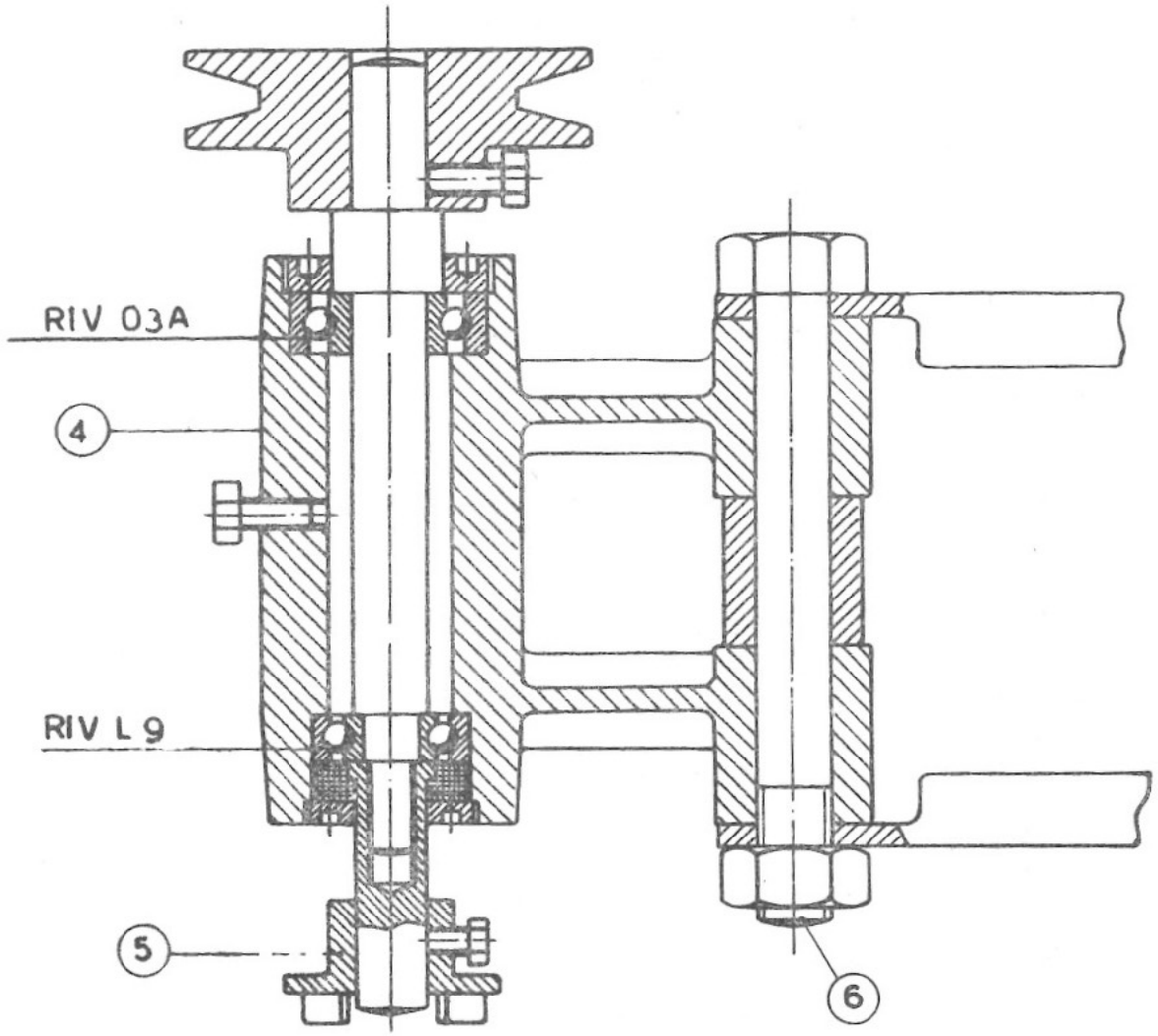
1) Motore elettrico.
2) Sopporto scorrevole.
3) Mensole.
4) Puleggie.
5) Semigiunto elastico (vedi anche 11, 12, 13 della Tav. IV-c).

Fermentatore da laboratorio adatto a sistemi di aerazione con vortice o con distributore d'aria.



Tav. XIII





Tav. XIII-a - Dettagli di 4, 5 e 6 della Tav. XIII.

braccio laterale dello T è raccordato al « by-pass » (10 tav. III) con un tubo di acciaio inossidabile da 1/4'' con interposizione di una valvola anch'essa da 1/4''.

Questa modifica, oltre a dare maggiori garanzie di funzionamento, porta ad una semplificazione non indifferente e ad una maggiore stabilità di tutto il complesso descritto per la presa di campione; per cui avendo ottenuto, anche agli effetti del lavoro, degli ottimi risultati si è ritenuto opportuno adottarla anche per le fermentazioni ordinarie condotte ad una pressione di 0,5 atmosfere.

Tutti i raccordi in gomma e tutti gli innesti dei tubi di gomma sono bloccati ai relativi tubi mediante fili metallici.

Per aprire e chiudere il tubo di gomma, interposto tra il tubo (2 tav. V) ed il complesso ora descritto, onde prelevare il campione, è stata impiegata una speciale pinza a molla i cui particolari costruttivi sono riportati nella tav. VII. Lo scopo raggiunto con detta pinza è quello di permettere una rapida apertura e chiusura del lume del tubo di gomma e di graduare facilmente tale manovra al fine di poter dosare, a seconda del bisogno, il volume del campione prelevato dal fermentatore. E' molto difficile raggiungere tale scopo con l'uso di una valvola normale o di una delle varie pinze attualmente in commercio.

La pinza speciale tiene chiuso il lume del tubo di gomma, allo stato di riposo, per mezzo di una molla di contrasto, che può regolarsi a seconda della durezza della gomma; l'operazione di apertura del tubo si effettua per mezzo di due leve che ben si adattano alla mano che dovrà comandarle.

Elettrodo rivelatore di schiuma

L'aerazione dei mezzi di cultura è quasi sempre accompagnata dalla formazione più o meno intensa della schiuma. Effettuando l'aerazione in un fermentatore per mezzo del sistema « vortice » di solito non si hanno molti inconvenienti derivanti dalla formazione di schiuma e dalla conseguente fuoriuscita del mezzo di cultura, sebbene l'efficacia dell'aerazione risulti fortemente diminuita per la formazione di microschiuma anche se questa è in quantità modesta e rimane contenuta nel fermentatore. (Chain e collaboratori 1952) (1), (Chain e Gualandi 1954) (5).

Effettuando invece l'aerazione del fermentatore per mezzo di un distributore in presenza o meno degli antivortici, la formazione di schiuma rappresenta sempre una difficoltà importante, non solo per l'abbassa-

(5) Chain E. B. e Gualandi G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, *17*, 1109 (1954).

mento dell'efficacia dell'aerazione, ma anche per il pericolo della fuoriuscita della schiuma all'esterno del fermentatore.

E' della massima importanza quindi poter controllare la formazione, spesso istantanea, della schiuma, molto prima che essa possa arrivare alla testata del fermentatore e si può affermare che da un controllo efficace di essa dipenda, spesso e volentieri, la possibilità o meno di portare a termine una fermentazione.

Da diversi Autori sono stati descritti varii elettrodi di controllo che chiudono un circuito elettrico allorquando vengono a contatto con la schiuma ([6, 7]); gli Autori del presente lavoro hanno adoperato come elettrodo rivelatore di schiuma una comune candela (1 tav. VIII), del tipo usato nei motori a scoppio per l'accensione, avvitata nel foro (8) della testata del fermentatore (tav. II).

All'elettrodo centrale della candela, privata in precedenza dell'elettrodo a massa, è stato saldato un filo di acciaio inossidabile della lunghezza di mm. 150 e dello spessore di mm. 2.

Quando la schiuma raggiunge l'elettrodo, essa viene a chiudere un circuito costituito dall'elettrodo, dal liquido di cultura, dal fermentatore, che è a massa, e dal primario di comando di un relais elettronico che provvederà a dare la segnalazione d'allarme. La formazione di condensa fra l'elettrodo allungato dalla candela e il suo corpo metallico, che è a massa col fermentatore, può generare dispersioni di corrente che alterano i valori del circuito descritto, generando delle instabilità di funzionamento del relais.

Ad evitare ciò si è ricoperto l'elettrodo di acciaio per circa 2/3 della sua lunghezza con un tubicino di gomma di diametro leggermente inferiore a quello dell'elettrodo stesso e si è abolito lo spazio tra l'inizio dell'elettrodo metallico, subito dopo la porcellana di isolamento e l'interno metallico del corpo della candela, mediante un altro pezzettino di gomma che è stato forzato sulla porcellana di isolamento (1 tav. VIII e fig. 5). Allo scopo di agevolare lo scivolamento della condensa si è provveduto a spalmare con grasso al silicone la superficie dell'elettrodo rivestita di gomma, la parte filettata della candela e un'area circolare, della parte inferiore della testata del fermentatore, concentrica al foro di fissaggio della candela porta elettrodo.

Date le caratteristiche elettriche del circuito di comando e le basse tensioni usabili per ragioni di sicurezza il relais deve possedere le seguenti caratteristiche: a) deve essere sensibile e funzionare con sicu-

---

([6]) Anderson R. F., Whitmore L. M., Brown W. E., Peterson W. H., Churchill B. W. Roegner F. R., Campbell T. H., Backus M. P. e Stauffer J. F. - Ind. Eng. Chem. *45*, 768 (1953).

([7]) Brown W. E., e Peterson W. H. - Ind. Eng. Chem. *42*, escr (1950a).

rezza a basse intensità di corrente, dell'ordine approssimativo di 20-50 μ A, poichè la resistenza elettrica della schiuma, costituita in massima parte di aria è variabilissima e molto alta; b) non deve essere adoperata una tensione superiore a 40 V. per l'alimentazione del circuito.

Per tali ragioni è stato adottato un relais a valvola elettronica con caratteristiche di lavoro V. 24, μA 15.

Adoperando un esploratore automatico a valvole termoioniche, il quale periodicamente a turno si inserisce nel descritto circuito per il controllo della schiuma, è stato possibile usare un solo relais per una batteria di parecchi fermentatori. Allorquando la schiuma raggiunge l'elettrodo, il relais aziona un campanello d'allarme ed un indicatore rivela il fermentatore che ha comandato il relais.

Avuto l'allarme ed individuato il fermentatore, l'antischiuma viene immessa in esso manualmente dagli appositi recipienti, che saranno appresso descritti, già pronti per l'uso.

Questo sistema rivelatore e di controllo della schiuma è stato collaudato dagli Autori solamente nelle fermentazioni per la produzione di penicillina ed esso funziona in modo soddisfacente se l'antischiumogeno adoperato è veramente efficace, cioè se è tale da impedire un'istantanea produzione di schiuma in modo che essa non possa raggiungere la testata del fermentatore. Qualora ciò avvenga, dopo che è stato introdotto l'antischiumogeno, è difficile, se non addirittura impossibile, controllare la successiva formazione di schiuma, inquantochè il micelio, depositato dalla schiuma sulla faccia interna della testata del fermentatore, sulle pareti interne di esso non bagnate dal liquido di cultura e sull'elettrodo, si sviluppa rapidamente ed in modo non uniforme dando luogo ad un passaggio continuo di corrente che blocca il relais nella posizione di lavoro (fig. 6).

Normalmente una certa quantità di micelio si sviluppa sempre sulla parte metallica dell'elettrodo dopo alcuni contatti con la schiuma, ma tale crescita, data la sensibilità del relais, non altera nè annulla il funzionamento dell'elettrodo rivelatore.

Recipienti per l'aggiunta di soluzioni

La tav. IX riporta i particolari costruttivi relativi alla costruzione di speciali recipienti in acciaio inossidabile che servono a contenere le soluzioni da aggiungere, in perfette condizioni di sterilità, durante la fermentazione. Per essi si sono usati due volumi; uno corrispondente alla capacità di cm^3 250 (tav. IX) e l'altro alla capacità di cm^3 500; quest'ultima,

ricavata, usando la stessa altezza del primo recipiente e portando il diametro interno a mm. 70.

I recipienti sono cilindrici (1 tav. IX) e chiusi all'estremità con piastre circolari (2 tav. IX), saldate elettricamente e forate nel centro per potervi saldare rispettivamente un manicotto filettato, di acciaio inossidabile, da 1/4'' (3 tav. IX).

Il manicotto superiore serve per il riempimento del recipiente ed è chiuso con un tappo a vite (4 tav. IX), in acciaio inossidabile, da 1/4''; quello inferiore, attraverso il quale la soluzione passa nel fermentatore, è collegato tramite una vite liscia da 1/4'' (5 tav. IX) ad una valvola a pistone (6 tav. IX) anch'essa da 1/4'' con pistone e cilindro in acciaio inossidabile e il corpo in bronzo. All'uscita di questa valvola è avvitato un corto tubo (7 tav. IX) di acciaio inossidabile, alla cui estremità è avvitato il maschio di un bocchettone da 3/8'', (8 tav. IX), la cui femmina è avvitata ad un tubo corto, (2 tav. VIII), di acciaio inossidabile, saldato elettricamente alla testata del fermentatore, dopo avere attraversato il foro (4) della tav. II. Al foro (5) della tav. II è saldata la stessa apparecchiatura descritta per il foro (4).

Nella mezzeria del tubo (7 tav. IX) è stato praticato un foro al quale si è saldata elettricamente una estremità del tubo (10 tav. IX) di acciaio inossidabile, di piccolo diametro, mentre l'altra estremità è stata saldata al foro, praticato nel corpo del recipiente, all'altezza del coperchio.

Questo tubo, allorquando il recipiente è montato per l'uso sul fermentatore, ha lo scopo di eguagliare la pressione di quest'ultimo e nel recipiente, in modo che il liquido contenuto in esso entra nel fermentatore, in condizione di sterilità, con la semplice manovra di apertura della valvola (6 Tav. IX), senza dovere effettuare alcuna variazione alla pressione di lavoro del fermentatore.

Per il dosaggio della quantità di liquido da aggiungere durante la fermentazione il recipiente è munito di un livello di spesso vetro « pyrex » (tav. IX) le cui estremità sono alloggiate in due sedi cilindriche, di acciaio inossidabile filettate internamente (12 tav. IX), saldate elettricamente alle due piastre, costituenti il fondo ed il coperchio del recipiente, attraverso due pezzi di tubo (14 tav. IX) comunicanti coll'interno del recipiente stesso.

La sede cilindrica saldata al coperchio superiore del recipiente è passante e filettata per tutta la sua altezza per permettere l'introduzione del tubo di livello; la parte superiore di detta sede è chiusa con un tappo filettato

La tenuta fra il tubo di vetro e le sedi cilindriche è ottenuta mediante fili di amianto, che vengono compressi alle pareti del tubo di

vetro da due dadi di ottone (13 tav. IX) filettati, che impanando nelle sedi cilindriche, funzionano da premistoppa.

Spesso si verifica una leggera perdita di liquido all'altezza del premistoppa, ma ciò non ha dato luogo ad inconvenienti agli effetti della sterilità; recentemente sono stati sostituiti i fili di amianto con un anello di gomma e non si è più osservata alcuna perdita.

Introduzione di soluzioni nei fermentatori in piccole quantità

Quando nei fermentatori si devono introdurre piccoli volumi di liquido (fino a 10 cc.) è preferibile fare l'operazione mediante una comune siringa ipodermica, attraverso uno speciale tappo di gomma, invece di adoperare i recipienti prima descritti.

Le introduzioni in questo caso vengono fatte facendo attraversare all'ago della siringa ipodermica un diaframma di gomma fissato in un coperchio filettato, parzialmente forato al centro, (tav. X) portato da un mezzo bocchettone che s'innesta al mezzo bocchettone per la introduzione dell'inoculo (3 tav. VIII), dopo che questo è stato effettuato. Il diaframma di gomma (1 tav. X) è costituito da un tappo di quelli comunemente usati per la chiusura dei flaconcini contenenti antibiotici e deve essere cambiato all'inizio di ogni fermentazione.

Prima di introdurre l'ago della siringa è bene sterilizzare, con alcool al 70% o con formalina diluita, la parte del diaframma esposta all'aria e di ridurre a 0,1 atmosfere la pressione interna del fermentatore.

Dispositivo per la distribuzione dell'inoculo

Dovendo inoculare una serie di fermentatori con un dato microorganismo, conviene usare un fermentatore per la semina di esso e trasferirlo poi nei varii fermentatori costituenti la serie in esperimento, in modo da essere sicuri di avere un inoculo uniforme per tutti (per la tecnica dell'inoculo vedere appresso).

Per il trasferimento dell'inoculo dal fermentatore di semina agli altri destinati alla fermentazione e per la misura del volume da trasferire è stato usato un dispositivo di distribuzione costituito da un robusto pallone di pyrex a collo largo, di volume equivalente alla massima quantità di inoculo da trasferire. Il pallone è chiuso da un tappo di gomma, attraversato da tre fori, nei quali passano tre pezzi di tubo di acciaio inossidabile, del diametro di mm. 10. Uno di questi tubi pesca sul fondo del pallone, allorquando il tappo di gomma è ben fissato e bloccato

al collo del pallone; ad esso è innestato un tubo di gomma, resistente a pressione, di lunghezza tale da arrivare a collegare il fermentatore di semina con tutti i fermentatori da inoculare terminante con un pezzo di tubo di acciaio inossidabile di mm. 10 di diametro, lungo mm. 150, munito alla sua estremità di una campana di protezione. Gli altri due tubi attraversano solamente il tappo e sporgono all'esterno quanto basta per innestarvi dei tubi di gomma resistenti a pressione; uno lungo circa cm. 50, termina con un pezzo di tubo di acciaio inossidabile, che porta il maschio di un bocchettone da 1/4'', la femmina del quale è avvitata all'uscita del complesso per la presa del campione del fermentatore di semina (vedi tav. XI); l'altro corto, termina con un piccolo filtro d'aria, costituito da un tubo di vetro per cloruro di calcio riempito, con « fine Coorning fiber glass » mediamente compressa (tav. XIII).

Controllo della temperatura

La termoregolazione dei fermentatori viene effettuata durante la fermentazione tenendoli immersi per circa 2/3 della loro altezza nella vasca riportata nella tavola XII e nella fig. 7; quest'ultima contiene acqua termostatata ad una temperatura corrispondente a quella stabilita per la fermentazione. Le vasche di sezione rettangolare sono realizzate con lamiera di ferro, rinforzata da un telaio di ferro sagomato a L.

Ognuna di esse è stata dimensionata per contenere un gruppo di fermentatori, il cui numero dipende dallo spazio disponibile; l'unità « standard » composta da otto fermentatori misura m. 3 in lunghezza per m. 0,45 in larghezza e m. 0,37 in altezza e contiene un volume utile di acqua pari a litri 400.

Nelle vasche i fermentatori sono sostenuti da telai di ferro, di forma rettangolare, che sono poggiati sul bordo della vasca e bloccati ad essa da una spina passante.

Se la temperatura dell'ambiente, nel quale è ubicata la vasca con i fermentatori, supera quella voluta per la fermentazione, la termoregolazione è ottenuta inviando dall'impianto centrale, attraverso una valvola elettromagnetica (1 tav. XII), comandata da un termometro a contatto o bimetallico e da un relais (2 tav. XII), acqua corrente che, nell'impianto di alimentazione usato, ha una temperatura oscillante fra 12° e 13°C.

Se la temperatura dell'ambiente è inferiore a quella voluta per la fermentazione, s'innesta il riscaldatore elettrico sommerso (3 tav. XII); gli aumenti di temperatura da esso generati, vengono livellati dalla immissione automatica di acqua fredda.

L'acqua nella vasca è tenuta in moto mediante circolazione continua, effettuata per mezzo della pompa (4 tav. XII) che ha una portata di circa 100 litri al minuto ed è mantenuta a livello costante per mezzo di uno sfioratore di troppo pieno.

Il foro d'ingresso (5 tav. XII) dell'acqua riciclata dalla pompa, è stato portato ad 1/4'' in modo di avere nella vasca una buona velocità dell'acqua con conseguente maggiore linearità della termostaticità di essa. Le vasche possono essere vuotate dell'acqua attraverso il tappo di fondo (6 tavola XII).

Impianto dell'aria compressa

L'aria necessaria ai fermentatori viene fornita dall'impianto generale dell'aria compressa il quale ha una pressione di esercizio di 3-4 atmosfere; esso è alimentato da un gruppo compressore a stantuffo.

Da una derivazione l'aria passa nel raccoglitore di condensa (7 tav. XII), la quale può essere rimossa aprendo la valvola a spillo (8 tav. XII) e da questo, attraverso la valvola di riduzione (9 tav. XII), va al distributore (10 tav. XII); da quest'ultimo attraverso le valvole di regolazione da 3/8'', l'aria passa ai fermentatori per mezzo di tubi di gomma resistenti alla pressione.

Trasmissione del moto agli agitatori

Le vasche termostatiche contenenti i fermentatori sono state ubicate vicino ad una parete, in modo da poter ancorare ad essa il complesso motore per la rotazione degli alberi degli agitatori.

Il complesso motore è sostenuto da due bracci, (3 tav. XIII) murati nella parete; esso è costituito da un motore trifase (1 tav. XIII), della potenza di 1/5 di cavallo, portato da un telaio, che può scorrere nei due bracci sopraccennati e può essere bloccato ad essi alla posizione voluta. Ogni complesso motore, alimenta il moto di due agitatori per mezzo di un accoppiamento a puleggie (4 tav. XIII) e cinghia trapezoidale, i cui particolari costruttivi sono riportati nella (4 tav. XIII). La tensione della cinghia trapezoidale di accoppiamento è regolata facendo scorrere il telaio (2 tav. XIII) lungo i bracci (3 tav. XIII).

Il complesso (tavv. XIII e XIIIa) trasmette il moto all'asse dell'agitatore per mezzo di un albero di acciaio che ha un diametro di mm. 10 ed una lunghezza di mm. 405 e termina alle due estremità con gli innesti di due giunti flessibili di gomma (5 tav. XIIIa).

La correzione dell'allineamento della trasmissione si ottiene spostando opportunamente il supporto sui perni (6 tavv. XIII e XIIIa).

Il numero di giri degli agitatori viene regolato mediante opportune combinazioni delle tre puleggie.

« Tecnica per l'uso dei fermentatori »

a) *Controllo e montaggio dei fermentatori*

Prima di effettuare il montaggio dei fermentatori devono essere effettuati i seguenti controlli:

1) Pulizia generale dei fermentatori, con particolare riguardo per tutti i tubi che attraversano la testata e per i bocchettoni di fissaggio dei recipienti per l'aggiunta di soluzioni (per la tecnica della pulizia vedi appresso).

2) Lubrificazione dei cuscinetti di guida dell'agitatore (per la tecnica della lubrificazione vedi appresso).

3) Centratura dell'asse dell'agitatore (bisogna fare attenzione durante le operazioni inerenti la testata a non causare eccentricità all'asse).

4) Isolamento dell'elettrodo rivelatore della schiuma e applicazione del grasso al silicone con le modalità precedentemente descritte, nell'apposito capitolo.

5) Pulizia e controllo dell'umidità dei filtri di entrata e di uscita dell'aria: se bagnati, asciugare.

6) Perfetto stato dei tubi di gomma di collegamento e delle guarnizioni di tenuta.

Effettuati con esito favorevole i varii controlli si monta l'elica desiderata all'asse dell'agitatore.

Se si vuole usare il sistema di aerazione con distributore di aria si monta quest'ultimo al tubo di ingresso dell'aria, dopo aver inserito, se si ritiene necessario, il complesso degli antivortici nel corpo del fermentatore.

Assicuratisi, per mezzo dei numeri di riferimento, che la testata appartiene al corpo del fermentatore, essa viene fissata al corpo stesso mediante sei dadi. I fori corrispondenti alla via d'entrata dell'inoculo e delle soluzioni vengono chiusi con tappi di metallo, filettati e muniti di guarnizione di testa (4 tav. VIII).

Controllo della tenuta del fermentatore alla pressione

Montato un manometro sul filtro di uscita dell'aria, si chiudono i tubi di gomma del complesso per la presa del campione e del « by pass » del filtro d'entrata dell'aria con due pinze tipo « Hoffman ».

Collegato il fermentatore con l'alimentatrice di aria compressa, regolata alla pressione di 1 atmosfera, ed aperte le saracinesche di entrata e di uscita dell'aria del fermentatore, per mezzo dell'apposita saracinesca del distributore, si manda l'aria e si controlla che questa passi senza eccessiva resistenza attraverso i filtri.

Effettuato tale controllo, si chiude la saracinesca di uscita dell'aria e si effettua una grossolana prova di tenuta, cercando d'individuare ad orecchio gli eventuali sibili causati da perdite d'aria di una certa entità. Chiusa infine anche la saracinesca dell'ingresso dell'aria nel fermentatore si misura la rapidità con la quale il manometro passa da 1 atmosfera a zero; normalmente ciò può avvenire in un tempo non minore di 5 minuti primi.

Per esigenze particolari si può ulteriormente migliorare la tenuta del fermentatore agendo sul premistoppa e stringendo maggiormente le parti che possano dar luogo a perdite di aria.

Terminato il controllo della tenuta, si disinnesta il tubo di gomma dell'alimentazione dell'aria, dopo aver chiusa la saracinesca del distributore.

Preparazione del fermentatore per la sterilizzazione

Introdotto il mezzo di cultura nel fermentatore attraverso il foro dell'inoculo e chiuso questo con il suo tappo si eseguono le seguenti operazioni:

1) Si allentano i tappi avvitati sugli ingressi delle soluzioni e dell'inoculo e sull'uscita del tubo per la presa di campione, in modo da permettere il libero passaggio del vapore durante la sterilizzazione ed evitare pericolosi ristagni d'aria.

2) Si chiude la valvola dell'entrata dell'aria; questa operazione deve essere fatta con cura se, per l'aerazione del mezzo di cultura, si usa un distributore d'aria, perchè, in tali condizioni, il mezzo di cultura, per improvvisi e possibili squilibri di pressione nell'interno del fermentatore, durante e dopo la sterilizzazione, può fuoriuscire attraverso il filtro d'aria d'alimentazione, rovinandolo.

3) Si smonta il manometro posto sull'uscita dell'aria e si apre la valvola per il regolaggio di essa.

4) Si tolgono le due pinze « Hoffman » che chiudono i tubi di gomma del complesso per il prelevamento del campione e del « by pass » del filtro d'ingresso dell'aria in modo da permettere la loro sterilizzazione.

5) Si chiude il tubo di gomma del complesso per la presa di campione con due pinze « Hoffman » al posto della pinza speciale, avanti descritta, allo scopo di non rovinare la molla di contrasto di quest'ultima con ripetute sterilizzazioni.

Non è necessario che il tubo per il prelevamento sia pieno, fino alla pinza, del liquido di cultura allo scopo di evitare ristagni d'aria di difficile sterilizzazione. In un primo tempo venne usata tale tecnica, poi abbandonata, senza per altro avere inconvenienti agli effetti della sterilizzazione.

Preparazione degli accessori del fermentatore per la sterilizzazione

a) *Recipienti per l'aggiunta di soluzioni*

Questi recipienti possono essere sterilizzati già montati sui fermentatori, se si dispone di un autoclave sufficientemente alto; in caso contrario si sterilizzano a parte.

Riempiti i recipienti con le soluzioni volute, attraverso l'apposito foro, si esegue il seguente controllo:

1) La valvola che comanda l'uscita del liquido deve essere perfetta e allorquando è aperta, deve poter fare scorrere liberamente la soluzione contenuta nel recipiente.

2) La soluzione deve scorrere liberamente lungo il tubo di livello.

3) Le rondelle di guarnizione dei varii tappi debbono essere in perfetta efficienza e i tappi ben stretti.

Effettuati questi controlli, i recipienti si possono montare sui fermentatori, avendo l'accortezza di non stringere completamente la chiavarda del bocchettone per permettere la fuoriuscita dell'aria; essi verranno stretti subito dopo la sterilizzazione.

Nel caso di sterilizzazione separata dal fermentatore, bisogna avvol-

gere i mezzi bocchettoni d'innesto con cotone e garza e proteggerli con carta impermeabile o con coperchi di alluminio.

Per sostenere i recipienti ai telai durante il loro riempimento e durante la sterilizzazione sono stati adoperati dei robusti ganci, sagomati ad S.

Dispositivo per la distribuzione dell'inoculo

Fissato, mediante legatura, il tappo portante le tubazioni di gomma al collo del pallone prescelto come misura dell'inoculo da effettuare, si avvolgono il mezzo bocchettone e la campana con cotone e garza e si proteggono con carta impermeabile. La lunga tubazione in gomma, necessaria per il travaso deve essere accuratamente arrotolata in modo da evitare pieghe.

Se si usano terreni di cultura molto schiumogeni bisogna, prima di sterilizzare il pallone di vetro, introdurre in esso una piccola quantità di antischiuma.

Sterilizzazione

In un primo tempo, avendosi a disposizione soltanto una piccola autoclave, i fermentatori sono stati sterilizzati, due alla volta e privi dei loro accessori.

In seguito, definite le caratteristiche dei fermentatori, fu progettata e costruita, una piccola autoclave orizzontale, capace di contenere otto fermentatori, completi degli accessori. I fermentatori sono sostenuti da un telaio di ferro che scorre su guide fissate, alla medesima altezza, nell'interno dell'autoclave e su un carrello per il loro trasporto (figg. 8 e 9).

La tecnica usata per la sterilizzazione è stata sempre la stessa in entrambi i casi.

I fermentatori, contenenti il mezzo di cultura, vengono sterilizzati per 15' a vapore fluente a 100°C e subito dopo, a seconda della natura del mezzo di cultura, a 120°C per un periodo di tempo che oscilla da 20 a 40 minuti primi.

Il tempo minimo perchè nei fermentatori si raggiunga la temperatura di 100°C è quello di 15 minuti primi, come da controllo effettuato mediante un termometro a massima immerso nel liquido.

La sterilizzazione dei recipienti per la introduzione dei liquidi viene fatta seguendo la medesima tecnica usata per i fermentatori sebbene per la loro sterilizzazione è già sufficiente un periodo di tempo di

20 minuti; i recipienti che contengono gli antischiumogeni invece vanno sterilizzati a parte per 15' a vapore fluente a 100°C e successivamente a 120°C per 90'.

Trascorso il tempo stabilito per la sterilizzazione si degrada lentamente, fino a zero, la pressione interna dell'autoclave; questa operazione deve essere fatta con cura per impedire la fuoriuscita del liquido di cultura causata da violenta ebollizione del liquido stesso.

Portata a zero la pressione, dopo essersi assicurati che dal tubo di scarico non esce più vapore, si apre lo sportello dell'autoclave e si accosta il carrello trasportatore, facendo coincidere le sue guide di scorrimento con quelle dell'autoclave, in modo che il telaio contenente il fermentatore, possa essere trasferito sul carrello. Effettuato il trasferimento sul carrello, si stringono i tappi precedentemente allentati per la sterilizzazione dei fermentatori e per mezzo del carrello si portano questi ultimi vicino alla vasca termostatica dove vengono sistemati per il raffreddamento; fatto ciò si incomincia ad apparecchiarli per la fermentazione.

Collegamento dei fermentatori con l'alimentatrice dell'aria

A tale scopo si procede alle seguenti operazioni nell'ordine indicato:

1) S'inserisce la pinza speciale sul tubo di gomma del complesso per il prelevamento del campione.

2) Si tolgono le due pinze « Hoffman » dal sopradetto tubo e con esse si stringono il tubo di gomma del « by pass » del filtro d'entrata d'aria e quello inferiore al raccoglitore della presa campione.

3) Si monta un manometro, sul braccio superiore del T dell'uscita dell'aria, per la misura della pressione nell'interno del fermentatore.

4) Si regola la pressione del distributore d'aria al valore di 0,7-0,8 atmosfere mediante la valvola riduttrice di pressione.

5) S'innesta al filtro d'entrata il tubo di gomma che parte dal distributore d'aria.

6) Si apre la valvola del distributore d'aria.

7) Si apre la valvola sul filtro di entrata dell'aria nel fermentatore.

8) Si chiude la valvola d'uscita dell'aria del fermentatore.

Dette operazioni vengono eseguite nell'ordine descritto, a turno, su ciascun fermentatore, assicurandosi sempre, prima di passare al successivo fermentatore, che il precedente si trovi sotto pressione di aria.

Durante queste operazioni la valvola d'uscita dell'aria deve rimanere aperta, perchè durante questo tempo, a causa del raffreddamento del liquido contenuto nel fermentatore, si generano in esso delle depressioni con conseguenti richiami d'aria dall'esterno; in tal modo si permette all'aria di entrare nel fermentatore attraverso il filtro sterilizzatore di uscita, che offrendo una resistenza trascurabile, evita che l'aria non sterile possa entrare, eventualmente, attraverso l'organo di guida e tenuta o da altri posti che offrono invece una maggiore resistenza.

Montaggio degli accessori

a) *Recipienti per l'aggiunta di soluzioni*

Se i recipienti vengono sterilizzati a parte, conviene montarli sui fermentatori prima del montaggio della trasmissione per il moto degli agitatori. E' bene che tale montaggio sia effettuato da due persone che dovranno operare come appresso specificato, sebbene in caso di emergenza anche una sola persona, sufficientemente pratica, basti allo scopo.

Agganciati i recipienti sul bordo della vasca termostatica, per essere convenientemente a portata di mano, un operatore allenta il tappo di chiusura del mezzo bocchettone, fissato al recipiente avvicinandolo alla testata. Fatto ciò, il primo operatore toglie il tappo di chiusura ed il secondo, asportato l'involucro di protezione dal mezzo bocchettone, lo innesta rapidamente nella sua sede, avvitando a mano la chiavarda di bloccaggio che successivamente, sarà stretta, mediante apposita chiave.

Durante queste operazioni non si deve interrompere l'afflusso di aria nel fermentatore in modo da ridurre al minimo le probabilità di contaminazione

Normalmente non si usa sterilizzare con la fiamma i varii attacchi, ma è bene tenere a portata di mano un Bunsen acceso, in previsione di qualche difficoltà che eventualmente possa sorgere nelle varie manovre.

b) *Puleggie ed alberi di trasmissione*

Fissato il numero di giri al minuto desiderato per gli alberi degli agitatori dei fermentatori si montano le puleggie e le cinghie relative. Apparecchiati i fermentatori, si montano infine, come detto avanti, gli alberi di

trasmissione e se ne controlla l'allineamento, facendoli girare a mano e aggiustandoli se ne è il caso. Fatto ciò si mettono in moto i motori e si controlla il numero di giri degli agitatori, per essere sicuri che non ci sia slittamento in qualche cinghia di trasmissione; durante la fermentazione è bene ripetere di quando in quando tale controllo.

Controllo di sterilità

Prima dell'inizio della fermentazione, si lasciano i fermentatori per 48 ore nelle condizioni di funzionamento desiderato per l'esperimento da effettuare.

Trascorse 24 ore, da ogni fermentatore si preleva un campione per il primo controllo di sterilità (per la tecnica del prelievo vedere in seguito).

Per ciascun campione saranno fatti due strisci su agar e due semine di circa cm^3 0,1 in brodo nutritivo sterile, incubando a 37°C uno striscio e una semina e a 24°C le altre due provette. Dopo non meno di 24 ore, l'esame delle provette darà il risultato della sterilità.

Se la sterilizzazione dei fermentatori e dei loro accessori è stata efficace è quanto mai difficile che avvengano inquinamenti durante la fermentazione. In una serie recente di 28 fermentazioni su un totale di 300 fermentatori soltanto due si sono inquinati a causa di manovre sbagliate.

Dopo circa 15 minuti dal travaso dell'inoculo si prendono altri campioni per il controllo della sterilità, ripetendo ogni 24 ore tale operazione per tutto il periodo della fermentazione.

Tecnica dell'inoculo

Se si devono seminare o inoculare uno o due fermentatori, l'operazione può essere eseguita introducendo, con una pipetta sterile, la semina o l'inoculo, attraverso l'apposito foro della testata del fermentatore mantenendo in esso l'alimentazione dell'aria sterile.

Quando invece si deve inoculare una serie di fermentatori con l'inoculo proveniente da un fermentatore di semina, è necessario adoperare il distributore d'inoculo, già descritto, la cui tecnica d'uso è la seguente:

1) Si porta il distributore, precedentemente sterilizzato, vicino al fermentatore contenente l'inoculo da travasare e si fissa il pallone di misura su un sostegno da laboratorio.

2) Si toglie il tappo di protezione all'estremità del complesso per la presa di campione e si sterilizza alla fiamma il semibocchettone scoperto.

3) Si toglie l'involucro di protezione del semibocchettone fissato al corto tubo di gomma, che parte dal tappo di gomma del pallone; lo si innesta sotto fiamma al semibocchettone della presa campione; si avvita poi a mano la chiavarda, bloccandola successivamente con apposita chiave.

4) Si fissano le pinze speciali già descritte, sui seguenti tubi di gomma: a) sul « by pass » del complesso per il prelievo campione (tav. VII); b) sul distributore d'inoculo in un punto più vicino possibile al pallone di misura; c) fra quest'ultimo e il piccolo filtro d'aria in vetro.

5) Si tolgono le pinze « Hoffman » dal tubo che parte dal raccoglitore della presa campione.

Compiute tali manovre per effettuare il travaso sono necessarie due persone, e precisamente: la prima (A) manovrerà le pinze che controllano l'afflusso dell'inoculo dal fermentatore di semina al fermentatore da inoculare e la seconda (B) collegherà con i varii fermentatori da inoculare il tubo di acciaio che è protetto dalla campana di protezione e che è portato dal tubo di gomma che parte dal pallone di vetro.

I particolari delle varie operazioni da eseguire sono le seguenti: L'operatore (A) tenendo in una mano la pinza per il prelievo del campione e nell'altra la pinza montata fra il pallone di vetro e il piccolo filtro d'aria le apre contemporaneamente provocando, sotto la pressione esistente nell'interno del fermentatore di semina, il travaso dell'inoculo da quest'ultimo al pallone di misura; l'afflusso dell'inoculo viene regolato aprendo in modo conveniente la pinza e viene bloccato allorquando si è raggiunto il volume desiderato. L'aria contenuta nelle tubazioni e nel pallone uscirà attraverso il piccolo filtro di vetro.

L'operatore (B) nel frattempo toglie l'involucro di protezione al tubo di acciaio, innestato all'altra estremità del tubo di gomma, e lo introduce in una beuta vuota, sterile, tenendolo fermo con una mano. L'operatore (A), avuto il benestare da (B), apre contemporaneamente la pinza del « by pass » dell'aria e quella fissata sul tubo di gomma provocando, sotto la pressione dell'aria sterile, proveniente dal filtro del fermentatore di semina, attraverso il complesso della presa campione, il travaso dell'inoculo del pallone di misura alla beuta sterile. Questa operazione è necessaria per inumidire, sia le pareti interne del tubo di gomma, che può essere lungo anche 10 metri, sia quello del

pallone di misura; senza questa operazione, il primo fermentatore inoculato, non riceverebbe il volume predisposto per l'inoculo.

Effettuato questo travaso, l'operatore (A) chiude le pinze e ripete le operazioni avanti descritte per riempire nuovamente il pallone di vetro con nuovo inoculo proveniente dal fermentatore di semina. Contemporaneamente l'operatore (B) porta la beuta contenente il tubo di acciaio per l'inoculo vicino al fermentatore da inoculare e tolto a questo il tappo che protegge il foro per l'inoculo vi introduce il tubo d'acciaio portante la campana di protezione, togliendolo dalla beuta sterile. L'operatore (A), riempito nuovamente con l'inoculo il pallone di misura attende che (B) gli dia il segnale di aver eseguito le proprie manovre; avuto il segnale ripete le operazioni descritte per trasferire l'inoculo dal pallone alla beuta, effettuando così il trasferimento nel fermentatore. L'operatore (A), per questa operazione terrà aperte le due pinze, finchè non osserverà attraverso il lungo tubo di gomma, una vibrazione ondulatoria la quale indicherà il passaggio di aria in esso e cioè che tutto il liquido è stato trasferito.

Fatto ciò l'operatore (A) ripete le manovre per il riempimento del pallone di misura e (B) trasferisce il tubo di acciaio, con la campana, dal primo al secondo fermentatore da inoculare.

Per fare questa operazione l'operatore (B), con la mano destra, allenta il tappo che protegge il foro per l'inoculo del secondo fermentatore e, con la sinistra, mantiene al suo posto il tubo di acciaio innestato ancora al fermentatore, già inoculato. Svitato il tappo di protezione, incrociando le braccia, passa simultaneamente il tubo d'acciaio, con la campana, nel foro d'inoculo del secondo fermentatore e il tappo di protezione di questo sul foro dell'inoculo del primo, avvitandolo a mano.

Ripetendo le manovre descritte s'inoculano tutti i fermentatori della serie.

Inoculato l'ultimo fermentatore, il suo foro per l'inoculo viene chiuso con il tappo di protezione tolto al foro del primo fermentatore, perchè ad esso era stato avvitato il tappo del secondo e così via per gli altri.

Il tappo del primo fermentatore, essendo rimasto esposto all'atmosfera dell'ambiente, per tutto il tempo necessario all'inoculo della serie di fermentatori, deve essere sterilizzato con la fiamma, prima di venir avvitato al foro dell'ultimo fermentatore.

Da quanto esposto risulta che, ad eccezione di questa ultima operazione e di quella iniziale per il collegamento del distributore d'inoculo con il fermentatore di semina, si lavora sempre senza usare la fiamma del Bunsen; ciò da modo di procedere speditamente all'inoculo dei fer-

mentatori, senza alcun pericolo d'inquinamento sempre se in essi è mantenuta l'alimentazione di aria anche durante tutto il tempo necessario all'operazione dell'inoculo, che, in tali condizioni, per una serie composta di otto fermentatori, si compie in 15 minuti primi.

Terminata l'operazione d'inoculo della serie, dal fermentatore di semina si disinnesta il distributore e lo si lava con soluzione detergente ed acqua.

Per la pulizia del fermentatore di semina si seguiranno le norme che saranno più avanti consigliate.

Prelevamento dei campioni

La tecnica per il prelevamento sterile dei campioni, durante la fermentazione è la seguente:

1) Si chiude la valvola dell'entrata d'aria nel fermentatore;

2) Si apre la valvola d'uscita dell'aria, richiudendola appena la pressione nell'interno del fermentatore si è degradata quasi a zero;

3) Si apre la pinza che stringe il tubo di gomma in comunicazione col raccoglitore della presa campione;

4) Si apre la pinza che stringe il tubo di gomma congiungente il complesso per la presa del campione con il tubo di acciaio di prelevamento, fissato sulla testata del fermentatore; con questa operazione l'aria sterile, proveniente dal « by pass », attraversa il complesso della presa di campione ed entra nel fermentatore, operando contemporaneamente lo svuotamento del tubo per il prelevamento del campione dal liquido di cultura stagnante e l'aumento della pressione interna del fermentatore.

5) Appena la pressione è stabilizzata nell'interno del fermentatore si stringe la pinza nel « by pass » dell'aria e si apre la valvola d'entrata d'aria nel fermentatore.

6) Si svita il tappo da 1/4'', posto nell'estremità del complesso di presa e la si flamba.

7) Si apre la pinza « Hoffman » posta sotto il raccoglitore della presa; prima d'iniziare tale operazione è bene tenere un recipiente sotto il tubo di uscita del campione, per impedire che sul pavimento cadano eventuali gocce di liquido, contenute nel raccoglitore.

8) Innestata la beuta sterile, previo flambamento del suo collo, al tubo di uscita portante la campana di protezione, si apre la pinza, che regola l'afflusso del campione, in modo da avere nella beuta il volume di liquido desiderato.

9) Si allontana la beuta e la si chiude con il suo toppaccio previo flambamento.

10) Si sterilizza con la fiamma il tubo di uscita del campione e la sua campana di protezione.

11) Con un paio di pinze si prende il tappo di chiusura da 1/4'' e lo si innesta, previa sterilizzazione con la fiamma, al tubo di uscita del campione.

12) Si stringe la pinza « Hoffman » posta sotto il raccoglitore della presa campione.

Per la presa campione del tipo semplificato vale anche la tecnica ora esposta

Smontaggio e pulizia dei fermentatori

Terminata la fermentazione, per lo smontaggio dei fermentatori e degli accessori si eseguono, presso a poco, nell'ordine inverso, le operazioni fatte per il montaggio.

Staccati gli accessori, si smontano le testate dei fermentatori e si poggiano sul pavimento con molta attenzione.

Si tolgono gli antivortici, se sono stati adoperati, e si lavano i fermentatori con getti di acqua calda, pulendoli poi, con una spazzola e una soluzione detergente; si lavano ancora con acqua corrente e, capovolti, si mettono ad asciugare.

Prima d'iniziare la pulizia delle testate dei fermentatori si smontano i distributori di aria, pulendoli poi con cura mediante acqua calda e spazzola e si chiudono i fori dell'entrata e dell'uscita d'aria con tappi di sughero ad evitare che si bagnino i filtri sterilizzatori.

Ciò fatto si puliscono le testate, seguendo quanto già detto per i corpi dei fermentatori. Per la pulizia dei varii fori è molto pratico l'uso di una spazzola cilindrica, mentre per la filettatura dei semibocchettoni è necessario l'uso di una spazzola piana a fili metallici.

Il complesso della presa campione deve essere accuratamente pulito e lavato e, se necessario, è bene smontare la parte in vetro in modo da eseguire efficacemente tale operazione, ricorrendo anche all'uso di spazzole adatte e di detersivi.

I recipienti per l'aggiunta di soluzioni acquose nei fermentatori vengono, di solito, lavati con sola acqua ed agganciati poi al loro telaio di sostegno con la valvola aperta affinchè la residua acqua di lavaggio contenuta in essi, possa scolare.

Quelli adoperati per l'introduzione degli antischiumogeni di solito non vengono puliti, essendo solo destinati a tale bisogna; se il livello è sporco, lo si pulisce, svitando il tappo dalla sede cilindrica di alloggiamento superiore ed introducendo nel tubo di vetro una spazzola adatta bagnata con solvente.

Lubrificazione e manutenzione ordinaria

1) *Cuscinetti a sfere*

Vengono ingrassati alla fine di ogni fermentazione, subito dopo aver eseguito la pulizia della testata; a tale scopo si usa un piccolo ingrassatore a siringa che contiene un grasso ad alto punto di gocciolamento, e porta un tubo flessibile avente al suo estremo l'innesto filettato, in modo da poter essere avvitato al foro di lubrificazione.

I cuscinetti delle pulegge e del motore si ingrassano occasionalmente.

2) *Organi di tenuta*

Vanno controllati agli effetti della loro usura e, se necessario, regolati avvitando il premistoppa.

3) *Filtri d'aria*

Non hanno bisogno di alcuna manutenzione fino a quando non vengono a contatto con il liquido di cultura e con il micelio.

Il contatto può avvenire: nel filtro d'ingresso dell'aria, quando per l'aerazione si usano i distributori di aria, a causa della caduta di pressione nell'impianto di alimentazione dell'aria compressa; questo inconveniente è eliminato, quando per l'aerazione si usa il sistema vortice; e nel filtro d'uscita, a causa della formazione di schiuma non controllata. In questi casi si può tentare di salvare la fermentazione riscaldando i tubi metallici dei filtri, in modo da asciugare i relativi paccaggi, che, prima di iniziare una nuova fermentazione, debbono essere assolutamente sostituiti.

Conclusione

Per molti problemi di chimica microbiologica è utile, se non essenziale, disporre di alcuni fermentatori da laboratorio, muniti di agitatori meccanici, capaci di dare alti valori di aerazione. Spesso è impossibile sostituire i fermentatori con palloni agitati, specie se sono necessari, come si è detto, alti valori di aerazione.

Nel progettare un fermentatore da laboratorio si deve cercare di raggiungere un compromesso tra semplicità di concezione, facilità di uso e sicurezza di lavoro. Il fermentatore deve essere capace di un funzionamento meccanico sicuro, deve essere adattabile a diversi tipi di fermentazione, con varie domande di ossigeno e soprattutto si deve ridurre al minimo il rischio degli inquinamenti, dovuti al complesso di guida e di tenuta dell'albero dell'agitazione, al prelevamento dei campioni e all'aggiunta delle soluzioni nel corso della fermentazione. Poichè ogni fermentazione va eseguita almeno in doppio, la più piccola batteria di fermentatori dovrebbe contenere almeno otto unità.

Non è possibile improvvisare con semplice vetreria da laboratorio un complesso di fermentatori che soddisfi a tutte le condizioni descritte. E' stato tentato in varii laboratori, compresi quelli in cui lavorano gli Autori, ma non si sono mai avuti dei risultati veramente soddisfacenti.

Quanto più le attrezzature ed i fermentatori sono improvvisati, tanto minore è la loro adattabilità e tanto maggiore è il pericolo di inquinamento.

Il fermentatore, descritto nel presente lavoro, è stato sviluppato specialmente per il sistema di aerazione con vortice, ma esso può essere impiegato altrettanto bene con il sistema di aerazione con distributori d'aria. Per quanto riguarda l'adattabilità, la semplicità di funzionamento e la sicurezza di servizio, regge bene il confronto con altri tipi descritti nella letteratura. [Brown, Peterson - 1950 b ([8]); Calam, Driver, Bowers - 1951 ([9]); Humfeld - 1947 ([10]); Kelly, Miller, Hale - 1952 ([11]); Lumb, Fawcett - 1951 ([12]); Nelson, Traufler, Kelley, Lockwood - 1952 ([13]); Paladino, Ugolini - 1954 ([14]); Rivett, Johnson, Peterso - 1950 ([14])]. Il fermentatore è completamente metallico e per tutte quelle parti che pos-

---

([8]) Brown W. E. e Peterson W. H. - Ind. Eng. Chem. *42*, 1823 (1950b).
([9]) Calam C. T., Driver N. e Bowers R. H. - J. Appl. Chem. *1*, 209 (1951).
([10]) Humfeld H. - J. Bact. *54*, 689 (1947).
([11]) Kelly B. K., Miller G. A. e Hale C. W. - J. gen. Microbiol. *6*, 41 (1952).
([12]) Lumb M. e Fawcett R. - J. Appl. Chem. I Suppl. *2*, 94 (1951).
([13]) Nelson G. E. N., Traufler D. H., Kelley S. F. e Lockwood L. B. - Ind. Eng. Chem. *44*, 1166 (1952).
([14]) Rivett R. W., Johnson M. J. e Peterson W. H. - Ind. Eng. Chem. *42*, 188 (1950).

sono trovarsi a contatto con il liquido di cultura si è impiegato acciaio inossidabile. Nella letteratura sono stati descritti alcuni tipi di fermentatori con testata metallica e corpo in vetro pyrex, ma gli Autori hanno preferito fermentatori, completamente metallici, allo scopo di diminuire i rischi di rottura, specialmente durante la sterilizzazione.

La capacità del fermentatore è stata scelta di 10 litri con un volume utile di lavorazione di 5-7 litri, poichè si è considerato che, con volumi maggiori, i fermentatori sarebbero stati troppo pesanti per poter essere maneggiati con facilità. L'attuale tipo di fermentatore, riempito con l. 5 di terreno di cultura e con i recipienti per l'aggiunta delle soluzioni, ha un peso di 12 Kg. Gli organi di guida e di tenuta, permettono la rotazione dell'albero dell'agitatore a forti velocità e per periodi lunghi. Scegliendo opportunamente il diametro dell'elica e la sua velocità di rotazione, alla normale pressione di lavoro di 0,5 atmosfere, si può facilmente ottenere qualsiasi valore per l'aerazione fino a 350 cc di O_2 per cento di soluzione per ora.

La costruzione del fermentatore permette di lavorare facilmente con una pressione interna di 1,5 atmosfere, per cui il valore dell'aerazione può praticamente essere duplicato.

L'aggiunta delle soluzioni viene effettuata, durante il corso della fermentazione, in modo particolarmente semplice, aprendo la valvola degli appositi recipienti, senza la necessità di usare aria compressa o di diminuire la pressione di lavorazione del fermentatore.

Con l'aiuto della pinza speciale descritta sopra, anche il prelevamento dei campioni dal fermentatore è una operazione semplice e facilmente regolabile.

La riproducibilità dei risultati delle fermentazioni è soddisfacente, se si tiene sotto controllo la formazione di schiuma; i risultati ottenuti da fermentazioni con produzioni di penicillina saranno riportati in altro lavoro, [Chain, Paladino, Callow, Sekulic - 1954 ([15])].

Al momento della stesura di questo lavoro gli Autori hanno eseguito con il loro ultimo tipo di fermentatore descritto una serie di 22 fermentazioni, ciascuna effettuata con 8-10 fermentatori. In queste esperienze, che hanno comportato l'uso di circa 200 fermentatori, il sistema di agitazione non ha mai presentato il minimo inconveniente.

L'organo di tenuta e di guida non ha richiesto alcuna riparazione ed è stato solo periodicamente lubrificato. La percentuale di fermentatori inquinati, nel corso delle fermentazioni, è stata bassa. Ad eccezione di un'esperienza, in cui andarono perduti 9 fermentazioni a causa di

---

([15]) Chain E. B., Paladino S., Callow D. S. e Sekulic A. - Rend. Ist. Sup. Sanità, in pubblicazione.

una insufficiente sterilizzazione del terreno di cultura contenuto nei fermentatori; solo in due si ebbe inquinamento, dovuto a cattivo uso.

Il tipo di fermentatore descritto è stato impiegato con successo nelle fermentazioni con penicillina, attinomiceti, lieviti e batteri; esso però non è adatto per lavorazioni con germi patogeni.

Materiale di costruzione

Nella costruzione dei fermentatori e degli accessori descritti si è fatto uso dei seguenti materiali:

1) Acciaio inossidabile 18/8

2) Ottone

3) Pezzi speciali di normale raccorderia

4) Alluminio

5) Vetro Pyrex a pareti spesse

6) Tubi a pressione e tappi di pura gomma (para). Resistono bene alle sterilizzazioni ripetute con vapore d'acqua.

7) Tubo di gomma a pressione con copertura di tela rinforzata per uso fino a 10 atm.

Dove non si riporta alcuna descrizione del materiale usato, la qualità specifica non ha importanza.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica.