

IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni



• REGOLE GENERALI PER LA SICUREZZA

- ✓ Non portare mai nulla alla bocca (matite, pennarelli), non mangiare, bere e fumare in laboratorio.
- ✓ Non sedersi sopra i banconi e non appoggiarsi agli strumenti.
- ✓ Indossare il camice, i guanti e gli occhiali protettivi quando si eseguono operazioni pericolose.
- ✓ E' compito di ciascuno mantenere i camici puliti e in buone condizioni.
- ✓ I capelli devono essere raccolti in modo da evitare contatti con superfici sporche o con la fiamma del bunsen.
- ✓ Non lasciare mai senza controllo reazioni in corso o apparecchi in funzione.
- ✓ Non appoggiare recipienti o apparecchi sul bordo del bancone.
- ✓ Non portare in tasca forbici, tubi di vetro o oggetti taglienti e appuntiti.
- ✓ Il lavaggio delle mani deve essere effettuato durante e, in particolare, alla fine dell'attività lavorativa dopo la manipolazione di materiale biologico.
- ✓ Le apparecchiature di laboratorio devono essere sistemate e ripulite in modo corretto dopo l'uso.

Sull'etichetta dei reagenti sono riportati:

- ✓ nome del prodotto
- ✓ composizione chimica
- ✓ simboli di pericolosità
- ✓ frasi di rischio e sicurezza



SIMBOLI DI PERICOLO



Tossico: sostanza chimica che può causare danni acuti o cronici all'organismo



Infiammabile: qualsiasi sostanza liquida, solida, vapore o gas che si infiammi facilmente e bruci rapidamente.



Materiale ossidante: sostanza in grado di rilasciare ossigeno che può incrementare o accelerare la combustione.



Esplosivo: materiale che produce un istantaneo e improvviso rilascio di pressione, gas o calore quando sottoposto ad un brusco shock, pressione o temperatura.



Corrosivo: sostanza chimica che provoca distruzione visibile o alterazione irreversibile dei tessuti organici nel punto di contatto.



Irritante: materiale non corrosivo che causa effetti infiammatori reversibili sui tessuti viventi attraverso l'azione chimica nel punto di contatto in funzione della concentrazione e del tempo di esposizione.

• TECNICHE DI ASETTICITA'

Le finalità di queste tecniche sono:

- a) ottenere e mantenere pure le colture di microrganismi
- b) svolgere il lavoro in laboratorio di microbiologia con sicurezza

Una “coltura pura” è costituita solo da una specie di microrganismo.

La contaminazione delle colture è a rischio in quanto i microbi si trovano ovunque, sulla pelle, nell'aria, sulle superfici dei piani di lavoro.

Le regole fondamentali delle tecniche di asetticità sono:

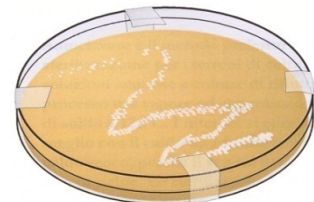
- usare terreni e attrezzature sterili
- lavorare vicini alla fiamma del bunsen
- sollevare i coperchi delle piastre Petri solo parzialmente
- tenere i tappi delle provette tra le dita e non appoggiati sul bancone
- flambare il collo della superficie esterna delle provette prima e dopo il prelievo
- arroventare le anse e gli aghi da inoculo alla fiamma per l'intera lunghezza dell'astina metallica, sia prima che dopo i prelievi
- la fiamma del bunsen in uso deve essere ossidante, blu e alta circa 5 cm
- quando il bunsen non si usa si deve lasciare la fiamma gialla, in modo da poterla vedere facilmente
- sterilizzare la vetreria e il materiale monouso usati, dopo l'uso dentro apposite buste autoclavabili
- disinfettare il bancone di lavoro accuratamente
- sistemare tutto il materiale utilizzato in modo corretto



INCUBAZIONE DELLE COLTURE

Scrivere sulla base della piastra Petri prima dell'inoculo indicando il nome dell'operatore, la data, il nome del microrganismo, in modo da riconoscere la piastra e sapere ciò che contiene.

Le colture pure in piastra devono essere sigillate con nastro adesivo.



• TECNICHE DI STERILIZZAZIONE

Sterilizzazione: trattamento termico, chimico e gassoso per eliminare ogni forma di vita.

Può essere realizzata con:

- a- calore secco
- b- calore umido
- c- filtrazione

CALORE SECCO

a) aria calda

La stufa a secco, utilizza temperature molto alte e serve a sterilizzare la vetreria messa in contenitori metallici o ricoperta con carta di alluminio.

I parametri d'uso della stufa sono:

- 160° per 60'
- 150° per 120'
- 140° per 180'

b) flambatura

Alla fiamma del bunsen, si può sterilizzare la superficie esterna delle provette, o delle beute.

La fiamma del bunsen esercita un'azione germicida nell'aria intorno alla fiamma per un raggio di circa 10 cm, creando una zona sterile.

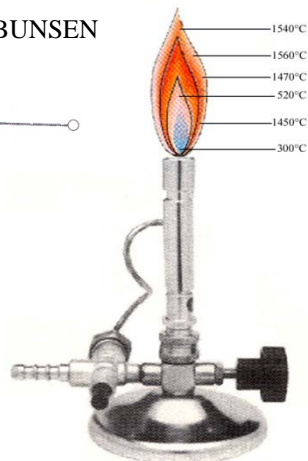
c) arroventamento

Alla fiamma del bunsen, è anche possibile sterilizzare l'ansa o l'ago prima e dopo i prelievi.

Pinze o spatole si sterilizzano dopo averle immerse in alcool e poi passate alla fiamma.



TEMPERATURE DELLA FIAMMA DEL BUNSEN



CALORE UMIDO

a) tindallizzazione

La soluzione da sterilizzare viene esposta a vapore fluente ad una temperatura di 100° C con un trattamento ripetuto per 3 giorni. Il trattamento è indicato per terreni nei quali possono crescere spore, le quali sfuggite al primo riscaldamento, vengono eliminate con il secondo e il terzo.

b) vapore sotto pressione

Per questa tecnica si usa l'autoclave che unisce l'azione del calore alla pressione.

Il potere di penetrazione del vapore acqueo nel substrato viene aumentato.

La sterilizzazione viene effettuata di solito a 121° per 15'.

Tabella di sterilizzazione in autoclave:

Temperatura	Pressione (atm)	tempo (minuti)
110	0,5	150
115	0,75	50
120	1	15
125	1,35	6,5

FILTRAZIONE

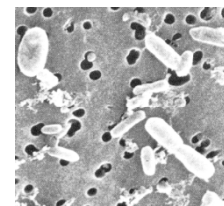
a) filtri millipore

Si utilizza per le sostanze che non possono essere sterilizzate a caldo (zuccheri, latte, vitamine), si usano filtri porosi di acetato di cellulosa, capaci di trattenere i batteri di grandezza superiore ai loro pori.



b) membrane filtranti

Per filtrare campioni liquidi, al fine di trattenere i batteri in esso presenti, si utilizzano opportune membrane con l'apposito apparato di filtrazione.



c) cappa a flusso laminare

Serve per eseguire al suo interno manipolazioni microbiologiche per eliminare la contaminazione dei prodotti ma anche dell'operatore e dell'ambiente.

