

# Norme di biosicurezza per le esperienze di microbiologia nella scuola media



## Indice

<u>Introduzione</u>	pag. 5
1. <u>Sicurezza nel laboratorio di microbiologia</u>	pag. 6
2. <u>Regole di sicurezza e comportamento</u>	pag. 7-9
3. <u>Classificazione dei microorganismi</u>	pag. 10-11
4. <u>Manipolazione di microorganismi</u>	pag. 12
5. <u>Cosa fare in caso di incidente</u>	pag. 13
6. <u>Disinfezione e sterilizzazione</u>	pag. 14-15
7. <u>Smaltimento di materiale biologico</u>	pag. 16
<u>Allegato 1 – riassunto per gli studenti</u>	pag. 17-18
<u>Allegato 2 – elenco del materiale indispensabile</u>	pag. 19
<u>Allegato 3 – lista degli organismi permessi</u>	pag. 20
<u>Glossario</u>	pag. 21-22
<u>Bibliografia</u>	pag. 23



## Introduzione

Le informazioni che si trovano in questo documento sono rivolte al docente di scienze naturali di scuola media e hanno lo scopo di creare i presupposti per delle attività laboratoriali che hanno per oggetto la manipolazione sicura di microorganismi a scuola.

La microbiologia intesa come lo studio dei microorganismi e delle loro interazioni con il mondo naturale rappresenta un valido strumento per avvicinare l'allievo ad un mondo invisibile che però ha importanti ricadute nella vita di tutti i giorni. Attraverso una serie di attività sperimentali si avrà l'opportunità di sviluppare una visione globale del ruolo che i microorganismi svolgono nell'ecosistema. L'approccio proposto si baserà su una solida teoria integrata da esperienze laboratoriali esemplificative del ruolo che questi viventi ricoprono nell'ambiente e di quali loro caratteristiche sono oggi sfruttate dall'uomo in campo alimentare, industriale e medico. Alcune delle tecniche che verranno sviluppate comportano la coltura di microorganismi con lo scopo di amplificare singoli cloni di cellule fino a raggiungere densità di milioni di individui. Queste tecniche permettono di osservare le popolazioni di cellule ad occhio nudo sotto forma di colonie: per una questione di prudenza e per la necessità di minimizzare il rischio microbiologico, nell'intraprendere questo genere di attività si rende obbligatoria una formazione apposita che ha lo scopo di trasmettere determinate conoscenze procedurali che permettano lo svolgersi delle attività con gli allievi in sicurezza. Questo approccio permetterà di tematizzare aspetti legati ai rischi e ai pericoli connessi con i microorganismi e la loro manipolazione che andranno a costituire elementi importanti nella cultura generale dell'allievo e potranno tornare utili nella vita quotidiana.

### Le norme di biosicurezza in sintesi

Nella prima parte del documento sono presentate le norme di biosicurezza applicabili alle attività pratiche che possono essere condotte nel laboratorio di scienze naturali della scuola media e i cui titoli sono esplicitati qui di seguito:

- **Sicurezza nel laboratorio di microbiologia**  
Descrizione dei pericoli legati all'uso dei microorganismi.
- **Regole di sicurezza e comportamento**  
Esemplificazione di semplici regole di comportamento per ridurre il rischio biologico nelle attività di microbiologia a scuola.
- **Classificazione dei microorganismi**  
Organizzazione e classificazione dei microorganismi per gruppo di rischio. Modalità comuni di contaminazione. Microorganismi il cui utilizzo è consentito a scuola.
- **Manipolazione di microorganismi**  
Buone pratiche di laboratorio e precauzioni da adottare nelle manipolazioni e nelle culture di microorganismi.
- **Cosa fare in caso di incidente**  
Misure da adottare in caso di contaminazione o fuoriuscita di materiale contaminato.
- **Disinfezione e sterilizzazione**  
Disinfettanti per mani, superfici e strumenti facilmente reperibili in commercio. Procedure di disinfezione e sterilizzazione.
- **Smaltimento di materiale biologico**  
Procedure di eliminazione dei rifiuti biologici e di materiale contaminato.

La seconda parte contiene tre allegati che si riferiscono rispettivamente ad un riassunto essenziale della biosicurezza destinato allo studente (**Allegato 1**), all'elenco del materiale indispensabile (**Allegato 2**) e alla lista degli organismi permessi (**Allegato 3**). La terza ed ultima parte comprende un glossario e una bibliografia essenziale destinata al docente.

## 1. Sicurezza nel laboratorio di microbiologia

Le norme di sicurezza e le buone pratiche presentate in seguito sono state sviluppate sulla base di una bibliografia essenziale per dare indicazioni utili all'uso sicuro di microorganismi nelle scuole medie ticinesi.

Partiamo dal presupposto che la maggior parte dei microorganismi sono benefici e generalmente non patogeni per l'uomo. Alcuni di questi possono però causare infezioni anche in soggetti immunocompetenti, mentre altri, conosciuti generalmente come commensali umani o batteri patogeni opportunisti, possono portare allo sviluppo di patologie in persone con problemi immunitari e/o quando hanno "l'opportunità" di esprimere la loro patogenicità, per esempio se immessi nel circolo sanguigno attraverso un taglio o una ferita. Durante le attività di laboratorio che includono la crescita e la manipolazione di microorganismi, ci si trova spesso confrontati con la presenza, nelle colture ottenute, di microorganismi non identificati che potrebbero essere patogeni. In questi casi non si deve applicare il principio "*in dubio pro reo*"<sup>1</sup>, bensì occorre considerare la possibilità che il microorganismo isolato sia in effetti patogeno ("*in dubio contra reum*") e questo allo scopo di minimizzare un possibile rischio. Il docente responsabile deve perciò attenersi in modo rigido alle regole di sicurezza nella manipolazione di microorganismi.

I pericoli presenti in un laboratorio microbiologico, sono di varia natura:

1. agenti fisici, chimici e biologici
2. apparecchi ad elevato voltaggio
3. alte e basse temperature
4. sistemi a pressione
5. affollamento delle classi
6. carenza d'informazione e formazione

Con questo vademecum si vogliono fornire direttive che permettano di minimizzare il rischio che determinati pericoli possano avere delle conseguenze spiacevoli nelle attività pratiche di microbiologia a scuola.

---

<sup>1</sup> La massima tradizionale - *in dubio pro reo* <*in dúbio pro rèo*> (lat. «nel dubbio, a favore dell'imputato») - esprime il principio giuridico per cui l'interesse alla tutela dell'innocente prevale sull'interesse alla condanna del reo.

## 2. Regole di sicurezza e comportamento

### Vestiario

Calzature aperte e indumenti corti non sono ammessi. Gioielli (anelli, braccialetti) devono essere tolti se si manipolano microorganismi. Capelli lunghi devono essere legati dietro la nuca (pericolo di incendio se si usasse il bruciatore a gas).

### Materiale di lavoro

Utilizzare preferibilmente materiale monouso. Tutto il materiale deve essere periodicamente controllato e disinfettato. Il materiale contaminato deve essere decontaminato immediatamente.

### La postazione di lavoro

Lo spazio interno del laboratorio deve garantire lo spostamento degli allievi in sicurezza, evitando la possibilità di scontri accidentali. I passaggi nel laboratorio devono essere liberi da effetti personali come cartelle, vestiti, o altro. Prima di ogni esperimento gli allievi devono prendere solo il materiale personale indispensabile (fogli e matita) e portarlo alla loro postazione. Astucci, quaderni e zaini non devono essere presenti nella postazione di lavoro. La superficie del piano di lavoro deve essere protetta con la piastra di protezione grigia impermeabile e resistente a disinfettanti o altre sostanze chimiche potenzialmente corrosive. I tavoli da laboratorio e le superfici di lavoro devono essere puliti prima e dopo ogni uso con alcool (soluzione di etanolo 70%) o altri disinfettanti (ad es. soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1%). Il tempo di disinfezione non dovrebbe essere inferiore a 2 min. Vicino ad ogni posto di lavoro vanno posizionati contenitori per la raccolta di rifiuti biologici (ad esempio bidoni gialli o contenitori con sacco di plastica autoclavabile). Non appoggiare nessun materiale vicino al bordo del banco di lavoro. Non lasciare incustodita la postazione di lavoro se si hanno delle reazioni in corso, apparecchi in funzione o bruciatori a gas accesi.

### Contaminazione delle superfici di lavoro

Tutte le attività pratiche devono essere condotte in modo da evitare la contaminazione degli strumenti, dell'ambiente e delle persone. La stessa attenzione deve essere tenuta per evitare la contaminazione delle colture, dei terreni liquidi e delle piastre di coltura da parte di microorganismi presenti nell'aria o portati dalle persone. Nessuno strumento di lavoro che è stato a contatto con i microorganismi (anse, pipette, provette, spatole) deve essere appoggiato direttamente sulla superficie di lavoro. Dopo l'uso gli strumenti, se non sono monouso, devono essere disinfettati in soluzioni disinfettanti apposite (soluzione di etanolo 70% oppure soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1.0%). Le colture batteriche devono essere chiuse in modo adeguato e non vanno mai lasciate aperte.

### Produzione di polvere e aerosol

Gli aerosol sono "goccioline" con diametro di alcuni micron e rappresentano una delle maggiori cause di contaminazione. La formazione di aerosol<sup>2</sup> può avvenire nel corso di semplici operazioni quali il pipettaggio, l'uso dell'autoclave, l'apertura di flaconi, provette, la preparazione di terreni di coltura. Tutte le operazioni soggette a formazione di aerosol richiedono quindi particolari precauzioni: aprire con cautela piastre, beute e provette, non agitare beute e provette aperte, non riempire beute e provette fino all'orlo, evitare gorgogliamento di aria nei liquidi, non espellere con forza i liquidi dalle pipette. Rispetto all'ambiente di lavoro si consiglia di cambiare l'aria del laboratorio prima dell'inizio della lezione e mantenere porte e finestre chiuse durante il lavoro pratico, ridurre al minimo gli spostamenti degli studenti durante la manipolazione di materiale biologico. Proteggere gli occhi con gli occhiali di protezione durante tutte le operazioni che possono in qualche modo provocare schizzi o produzione di aerosol.

<sup>2</sup> La formazione di aerosol può anche avvenire nel caso di particolari operazioni come l'omogeneizzazione, la sonicazione, l'agitazione, la centrifuga di preparati o la sterilizzazione alla fiamma di contenitori.

## Alimenti

Alimenti e bevande non sono assolutamente permessi in laboratorio, è inoltre assolutamente vietato tenerli in frigoriferi destinati alla conservazione di materiali microbiologici.

## Dispositivi di protezione individuale (DPI)

I guanti monouso devono essere tolti ed eliminati insieme al materiale biologico. Non toccare le maniglie di porte o finestre oppure altri oggetti in laboratorio con guanti usati per maneggiare materiale biologico. Durante le attività indossare gli occhiali protettivi.

## Etichettatura

In generale, prima di ogni esperienza, etichettare in modo chiaro le piastre di coltura, le provette e altri contenitori per coltura con nome, data e identificazione. L'etichettatura deve avvenire tramite marcatore resistente all'acqua o etichetta adesiva. Evitare l'uso di etichette che hanno bisogno di essere bagnate prima di farle aderire per evitare che vengono inumidite con la saliva.

## Trasporto di materiale biologico

Il trasporto di materiale biologico all'interno (ad es. tra laboratori) e al di fuori della scuola (trasporto al Laboratorio di preparazione didattica - LPD) deve avvenire in contenitori di materiale infrangibile, con coperchio a tenuta e correttamente etichettati per facilitarne l'identificazione. I contenitori devono essere di materiale resistente a disinfettanti chimici ed essere regolarmente puliti e decontaminati.

## Pronto soccorso

Una cassetta con materiale di pronto soccorso deve sempre essere presente in laboratorio.

## Obbligo di istruzione

Gli studenti devono essere istruiti sulle necessarie regole da seguire durante la manipolazione di microorganismi ed essere consapevoli:

- dei rischi potenziali legati alla manipolazione di microorganismi;
- del comportamento da assumere in laboratorio per evitare situazioni di rischio e svolgere l'attività pratica in sicurezza;
- del comportamento da assumere in caso d'incidente.

## Comportamento

La disciplina della classe è fondamentale per permettere un buon svolgimento degli esperimenti microbiologici (conversazioni limitate al minimo durante gli esperimenti, esecuzione corretta delle procedure seguendo i protocolli, nessun gioco, ecc.). Gli studenti devono attenersi in modo rigoroso ai metodi per la manipolazione dei microorganismi, degli utensili e degli apparecchi e non lavorare mai da soli in laboratorio. Nessun contatto mani-bocca è permesso (per esempio: mordere la matita, masticare la gomma, mangiarsi le unghie, ecc.). Mangiare, bere o applicare cosmetici non è consentito in laboratorio. È proibito pipettare con la bocca, per questo genere di operazione usare i mezzi appositi per pipettare in sicurezza (pro-pipetta). Durante lo svolgimento del lavoro pratico è proibito stropicciarsi gli occhi con le mani e portare lenti a contatto se privi degli appositi occhiali protettivi, diversamente è possibile causare l'accumulo di sostanze nocive in caso d'incidente. Non toccare i microorganismi con le mani e non annusare le colture. Le pratiche di laboratorio devono permettere di lavorare in modo da ridurre al minimo la formazione di aerosol e goccioline (es. non agitare provette aperte).

**Pulizia delle mani:** Il lavaggio accurato delle mani usando sapone liquido e asciugando con carta assorbente prima e dopo ogni laboratorio di microbiologia deve diventare la regola per i docenti e per gli allievi.

**Ferite:** Le ferite come tagli o graffi sulla pelle devono essere coperte con un cerotto resistente all'acqua prima di poter iniziare qualsiasi esperimento. In questi casi indossare guanti per tutta la durata dello svolgimento pratico dell'esperimento.

### 3. Classificazione dei microorganismi

Infettività, patogenicità, trasmissibilità e neutralizzabilità sono parametri usati per stabilire la pericolosità di un agente biologico.

- **L'infettività** è un parametro che descrive la capacità di un microorganismo di penetrare e moltiplicarsi all'interno di un ospite.
- **La patogenicità** è un parametro che descrive la capacità di un microorganismo di causare una malattia.
- **La trasmissibilità** è un parametro che descrive la capacità di un microorganismo di trasferirsi da un ospite infetto ad un ospite sano.
- **La neutralizzabilità** è un parametro che descrive la possibilità e la disponibilità di misure profilattiche e terapeutiche efficaci volte ad eliminare un microorganismo.

Basandosi su questi parametri i microorganismi possono essere classificati in 4 gruppi di rischio d'infezione crescente che sono di seguito descritti.

#### Agente biologico di gruppo 1 (nessun o basso rischio individuale e collettivo)

È classificato come agente biologico del gruppo 1 un microorganismo che ha poca probabilità di causare malattie in soggetti umani o animali sani, rispettivamente per esso sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche.

#### Agente biologico di gruppo 2 (moderato rischio individuale e limitato rischio collettivo)

È classificato come agente biologico del gruppo 2 un microorganismo che può causare malattia nell'uomo o negli animali. L'esposizione può causare infezioni, ma è poco probabile che questa si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche.

#### Agente biologico di gruppo 3 (elevato rischio individuale, basso rischio collettivo)

È classificato come agente biologico del gruppo 3 un microorganismo che può causare malattia nell'uomo o negli animali. L'esposizione può causare infezioni gravi; l'agente biologico può propagarsi nella comunità ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

#### Agente biologico di gruppo 4 (elevato rischio individuale e collettivo)

È classificato come agente biologico del gruppo 4 un microorganismo che causa malattie gravi nell'uomo o negli animali e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità. Non sono disponibili efficaci misure preventive o terapeutiche.

La classificazione degli organismi in base alla loro patogenicità e grado di pericolosità è consultabile alla pagina web:

<http://www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=it>

#### Possibili modalità di contaminazione

Le modalità di contaminazione più frequenti in un laboratorio biologico sono:

- **Attraverso la cute** in seguito a puntura accidentale o tramite lesioni preesistenti.
- **Attraverso la mucosa boccale o gli occhi** tramite contatto con mani contaminate oppure in seguito a spruzzi con liquidi contenenti materiale infetto.
- **Per via respiratoria** tramite l'inalazione di aerosol proveniente dall'apertura di piastre di coltura, o altri contenitori di coltura.

Con gli accorgimenti di sicurezza descritti in questo documento molte situazioni pericolose possono essere debitamente controllate.

### Microorganismi permessi e relative misure di sicurezza

Qualsiasi microorganismo sconosciuto dovrebbe essere trattato come potenzialmente patogeno. **Nell'ambito delle esperienze condotte alla scuola media è consentito utilizzare unicamente microrganismi non patogeni - gruppo 1<sup>3</sup>**. Una lista degli organismi permessi viene messa a disposizione tramite l'**allegato 3** annesso al presente documento. È inoltre messa a disposizione la descrizione di una serie di attività pratiche che è possibile svolgere con agenti biologici del gruppo 1 con relative misure di sicurezza applicabili (documento a parte).

---

<sup>3</sup> Per deroghe consultare gli esperti di materia.

## 4. Manipolazione di microorganismi

### Manipolazione dei contenitori per colture

I contenitori per le colture (p. es. beute, provette con sospensioni microbiche, colture su piastra di agar) devono restare aperte unicamente per il tempo strettamente necessario per permettere le manipolazioni.

### Osservazione di microorganismi vivi

Le piastre e le provette con crescita batterica non vanno assolutamente aperte in presenza degli studenti.

### Chiusura delle piastre di agar e degli altri contenitori per coltura

Chiudere qualsiasi piastra di agar o provetta inocolata con nastro isolante (Parafilm® o scotch adesivo).

### Temperatura di incubazione

L'incubazione a 37°C seleziona microorganismi che si sono adattati alla temperatura corporea degli animali a sangue caldo e hanno più probabilità di essere forme patogene, per questo motivo incubare le colture a 30°C o a temperatura ambiente.

### Esame e valutazione delle colture su piastra di agar

L'osservazione delle colonie su piastra di agar verrà effettuata sempre con il coperchio chiuso. Se l'osservazione fosse impedita ad esempio da acqua condensata sotto il coperchio, il docente può rimuoverla picchiando leggermente il coperchio e raccogliendo l'acqua condensata asciugandola con un pezzo di carta assorbente imbevuto di disinfettante (soluzione di etanolo 70%). La rimozione dell'acqua condensata va eseguita prima della lezione in assenza degli allievi, la piastra va poi nuovamente sigillata.

### Utilizzo di terreni selettivi e piastre agar-sangue

L'utilizzo di terreni selettivi e piastre agar-sangue è proibito nell'ambito di esperienze pratiche di microbiologia, in quanto esiste il rischio di isolamento di batteri patogeni.

### Colture di muffe

È necessario prestare particolare attenzione durante il lavoro con colture di muffe: movimenti d'aria, scuotimenti e movimenti bruschi sono da evitare in modo da non favorire la diffusione di spore (pericolo di infezione delle vie respiratorie e di reazioni allergiche).

## 5. Cosa fare in caso di incidente

Gli allievi sono tenuti a comunicare immediatamente al docente qualsiasi incidente, il docente dal canto suo è tenuto ad intraprendere le misure di contenimento adeguate. In ogni caso la direzione dell'istituto dovrà essere informata dell'accaduto. All'interno del laboratorio devono essere presenti e ben visibili i numeri di emergenza per contattare polizia, pompieri, istituto tossicologico e ambulanze.

Di seguito sono descritte le tipologie più comuni di incidenti che potrebbero aver luogo nell'ambito delle attività di laboratorio di microbiologia.

- **Contaminazione delle mani o di altre parti del corpo:** rimuovere indumenti di laboratorio e personali se visibilmente contaminati. Lavare accuratamente le mani e le parti del corpo contaminate con abbondante acqua e sapone, poi disinfettare (Sterillium®). Se necessario rivolgersi ad un medico per un controllo supplementare.
- **Ferite durante il lavoro:** la ferita deve essere lavata accuratamente sotto acqua corrente e disinfettata con tintura di iodio (Betadine®). Se necessario rivolgersi ad un medico per un controllo supplementare.
- **Schizzi negli occhi:** sciacquare abbondantemente gli occhi con acqua utilizzando la doccia oculare di emergenza per almeno 10 minuti. Se necessario recarsi al pronto soccorso.
- **Fuoriuscita di materiale biologico** (spargimento di materiale infetto, rotture di provette o altri contenitori con materiale biologico o microrganismi): indossare i guanti e il camice monouso presenti nel kit di fuoriuscita di materiale biologico; coprire il materiale fuoriuscito con carta assorbente imbevuta di disinfettante (soluzione di etanolo 70% o soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1%) e lasciare agire per 15 min. Raccogliere tutto senza fare movimenti a rotazione perché aumentano la superficie contaminata (raccogliere dall'esterno all'interno). Eliminare nell'apposito contenitore per rifiuti biologici tutto il materiale contaminato. Fare molta attenzione se sono presenti frammenti di vetro. Rimuovere i pezzi di vetro con l'ausilio di una pinza o con una spazzola e paletta, che dovranno poi essere decontaminati. Pulire nuovamente l'area contaminata con disinfettante (disinfettare oltre l'area contaminata). Nel caso di caduta di grandi volumi di materiale contaminato (più di 50 ml) con possibile dispersione di aerosol, uscire dal laboratorio e aspettare 30 minuti prima di rientrare (indossando camice, guanti e occhiali di protezione) per disinfettare e pulire l'area contaminata. Questo per permettere la deposizione di aerosol ed evitare una possibile contaminazione attraverso le vie aeree o gli occhi.

## 6. Disinfezione e sterilizzazione

### Disinfettanti per strumenti, mani e superfici

Etanolo 70% e Sterillium® sono disinfettanti comunemente usati in laboratorio. Altri disinfettanti sono disponibili in commercio: nel caso di utilizzo di altri disinfettanti attenersi alle istruzioni del produttore.

Applicazione	Sterillium®	Etanolo 70%	Ipoclorito di sodio 0.5-1.0%
Disinfettante per mani	✓	✗	✗
Disinfettante per superfici	✗	✓	✓
Disinfettante per strumenti	✗	✓	✓

#### - Sterillium®

Si tratta di una soluzione disponibile in commercio per la disinfezione delle mani a base di alcool.

#### - Etanolo 70%

Una soluzione di acqua ed etanolo al 70% è un buon disinfettante. Per l'effetto dell'acqua, l'alcool riesce ad entrare all'interno dei batteri attraverso la parete cellulare dove provoca una denaturazione delle proteine fino alla uccisione dei batteri. L'alcool puro (100 %) invece non è efficace poiché denatura le proteine esterne e come risultato non penetra più all'interno della cellula.

#### - Ipoclorito di sodio

Candeggina è la denominazione comune dell'ipoclorito di sodio<sup>4</sup> in soluzione acquosa. L'ipoclorito di sodio causa l'ossidazione delle molecole biologiche come le proteine, i lipidi o il DNA. Il contenitore di questa sostanza deve essere correttamente etichettato con l'indicazione della concentrazione di cloro attivo (ad una concentrazione superiore al 10% la soluzione di ipoclorito di sodio ha un effetto altamente irritante). Nell'utilizzo della soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1.0% è necessario indossare guanti e occhiali di protezione in modo da evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Da notare che la percentuale di cloro attivo diminuisce con il passare del tempo, la soluzione da usare per la disinfezione va quindi preparata fresca. L'ipoclorito di sodio in soluzione acquosa è un forte ossidante e può danneggiare abiti o superfici delicate. Essendo particolarmente corrosivo per i metalli, si raccomanda di sciacquare con acqua le superfici e gli strumenti dopo la disinfezione con ipoclorito di sodio 0.5-1.0%.

14

### Disinfezione di superfici di lavoro e indumenti

Il banco di lavoro va sempre protetto con l'apposita vaschetta grigia, mentre per gli strumenti come ad esempio le anse si consiglia di usare preferenzialmente materiale monouso. Di seguito sono esemplificate semplici procedure di disinfezione applicabili a superfici di lavoro, strumenti e vestiti.

- **Superfici di lavoro:** cospargere con una soluzione di etanolo al 70%; lasciare agire per almeno 2 minuti. In seguito asciugare con carta assorbente ed eliminare la carta come rifiuto convenzionale. In caso venga utilizzata per la disinfezione la soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1.0% proteggere gli occhi con gli occhiali protettivi e le mani con i guanti monouso.
- **Pipette:** le pipette entrate in contatto con microrganismi devono essere riposte immediatamente in una bacinella contenente ipoclorito di sodio 0.5-1.0% senza appoggiarle sul tavolo e vanno lasciate immerse per almeno 30 minuti<sup>5</sup>.
- **Vestiti:** trattarli con disinfettanti per superfici<sup>6</sup> (p.es. Sagrotan® spray).

<sup>4</sup> Informazioni di sicurezza – NaClO: l'ipoclorito di sodio in soluzione è irritante e se concentrato diviene caustico, è incompatibile con determinate sostanze, può sprigionare cloro gassoso a contatto con determinati acidi, può esplodere se mescolato puro con l'ammoniaca.

<sup>5</sup> Le pipette di vetro immerse nella soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1.0% andranno risciacquate con acqua e poste a sgocciolare entro sera, successivamente è possibile procedere alla sterilizzazione a secco.

<sup>6</sup> Non utilizzare a questo scopo la soluzione di ipoclorito di sodio 0.5-1.0%.

## Sterilizzazione di utensili e vetreria per l'uso negli esperimenti

La sterilizzazione ha lo scopo di eliminare tutti i microrganismi e le loro spore da utensili e vetreria, può essere attuata con mezzi diversi a seconda dei casi. I principali mezzi fisici di sterilizzazione utilizzano l'azione del calore sia umido che secco. Nel caso della sterilizzazione eseguita per azione del calore, la temperatura da raggiungere e la durata del riscaldamento per ottenere una completa sterilizzazione variano in funzione di numerosi fattori (tipo di microrganismo da distruggere, materiale da sterilizzare, metodo, ecc.).

È utile premettere che per la preparazione della vetreria da utilizzare negli esperimenti di microbiologia si predilige la sterilizzazione con calore secco, mentre la sterilizzazione con calore umido viene utilizzata principalmente per la preparazione di terreni di coltura. In ogni caso la sterilizzazione della vetreria pulita con calore umido non va confusa con la sterilizzazione della vetreria contaminata con calore umido, nel qual caso si procede come indicato al punto 7 "Smaltimento di materiale biologico".

**Sterilizzazione con calore umido:** il processo è realizzato utilizzando un'autoclave tramite la successione delle seguenti operazioni:

- preparazione del materiale da sterilizzare<sup>7</sup>;
- marcatura dei materiali con nastro adesivo indicatore di sterilizzazione per autoclave;
- trattamento termico dei contenitori e degli utensili (20 min. a 121°C).

**Sterilizzazione con calore secco:** il processo è realizzato utilizzando un forno tramite la successione delle seguenti operazioni:

- preparazione del materiale da sterilizzare<sup>8</sup>;
- chiusura ermetica dei contenitori;
- marcatura dei materiali con nastro adesivo indicatore di sterilizzazione a secco;
- trattamento termico dei contenitori sigillati (120 min. a 160°C);
- raffreddamento rapido dei contenitori.

---

<sup>7</sup> Per materiale da sterilizzare si intende materiale non contaminato o precedentemente disinfettato e pulito, non si intendono invece i recipienti contenenti colture di microrganismi i quali vanno trattati secondo quanto indicato al punto 7 "Smaltimento di materiale biologico".

<sup>8</sup> Vedi nota 7.

## 7. Smaltimento di materiale biologico

La completa eliminazione di tutti i microrganismi presenti su un dato oggetto è chiamata sterilizzazione. La sterilizzazione implica la totale e assoluta distruzione di tutti i microorganismi compresi i batteri resistenti, le spore batteriche, i protozoi, i prioni e i virus. La sterilizzazione con l'utilizzo dell'autoclave sfrutta l'azione del vapore ad alta temperatura per eliminare i microrganismi tramite la denaturazione delle molecole biologiche. L'autoclave funziona come la pentola a pressione, permettendo di bollire l'acqua in tempi più brevi rispetto a quelli in condizione normale di pressione e temperatura e ottenendo all'interno dell'apparecchio un'atmosfera satura di vapore ad una temperatura di 121°C.

### Eliminazione di colture liquide e su piastra di agar

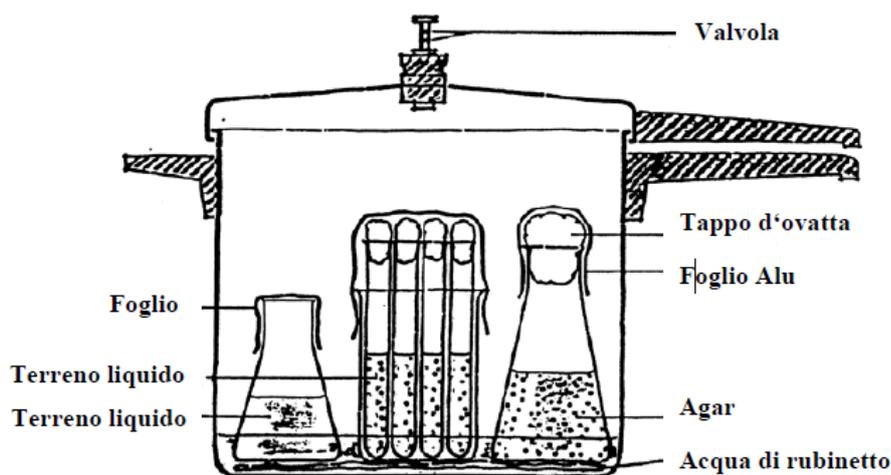
Colture liquide e piastre agar contenenti colture batteriche o di muffe non devono essere eliminate versando il liquido nello scarico o gettando le piastre nel contenitore dei rifiuti, è necessario attenersi a specifiche procedure di smaltimento.

### Eliminazione previo ciclo di autoclave

L'utilizzo dell'autoclave (o pentola a pressione) (vedi Figura 1); permette di sterilizzare le colture e i contenitori che le contengono in modo che sia possibile eliminare le colture ed eventualmente i loro contenitori direttamente con i rifiuti convenzionali. Prima di mettere il materiale in autoclave è necessario marcarlo con nastro adesivo indicatore di sterilizzazione per autoclave. Di seguito sono esplicitate due procedure adatte rispettivamente alle colture liquide e a quelle su piastra di agar.

- Le colture liquide vanno messe in autoclave per 20 min. a 121°C; una volta che la pressione è ritornata a livello ambiente e che la temperatura è scesa sotto quella di ebollizione il brodo ancora liquido può essere versato nel lavandino.
- Le colture su piastra di agar, materiali usa e getta (quali ad esempio, anse, batuffoli, ecc.) possono essere messi in un sacco di plastica sterilizzabile e sterilizzate per 20 min. a 121°C; dopo la sterilizzazione, una volta che la pressione è ritornata a livello ambiente, riporre il sacco ben chiuso in un sacco dei rifiuti normale ed eliminarlo come rifiuto convenzionale.

16



**Figura 1.** Preparazione di un autoclave/pentola a pressione per sterilizzare materiale di laboratorio. Il materiale nell'autoclave deve essere sistemato ad una certa distanza l'uno dall'altro in modo da facilitare la penetrazione del vapore e la rimozione dell'aria. I contenitori non devono essere chiusi ermeticamente poiché il vapore deve poter entrare in contatto con il contenuto.

## Allegato 1 - Riassunto per gli studenti

### Norme basilari per le manipolazioni di microrganismi a scuola

La maggior parte dei microrganismi non causano malattie nell'uomo, tuttavia alcuni possono agire come agenti patogeni in grado di provocare malattie. Per questo motivo, trattare tutti i microrganismi, soprattutto se sconosciuti, come microrganismi potenzialmente patogeni, quindi fonte di rischio biologico.

### Regole di comportamento

Gli allievi devono comportarsi in modo responsabile e il comportamento della classe deve permettere l'esecuzione corretta dei protocolli e delle manipolazioni in modo da minimizzare i rischi legati ai pericoli degli esperimenti microbiologici. Esperimenti con microrganismi (batteri, lieviti, muffe, ecc.) presuppongono un modo di lavorare serio e pulito: solo allievi preparati eseguono esperienze di microbiologia.

In particolare, in laboratorio si deve evitare di:

- fare scherzi; disturbare i compagni; comportarsi in modo chiassoso; correre; spostarsi inutilmente; sedersi sui tavoli; mangiare e bere; conservare cibo; applicare cosmetici; manipolare lenti a contatto; portare alla bocca qualsiasi oggetto (mani, matite, gomme da masticare, ecc.); strofinarsi gli occhi con le mani.

### Procedura generale

Alcune procedure di ordine generale devono essere conosciute dagli allievi e devono essere state esercitate prima di intraprendere degli esperimenti di microbiologia.

Occorre sapere in particolare:

- dove si trovano i numeri d'emergenza della polizia, dei pompieri e dell'ambulanza;
- che qualsiasi incidente deve essere immediatamente comunicato al docente;
- dove si trova la doccia oculare, la coperta antiincendio, il kit di pronto soccorso e il kit di fuoriuscita di materiale biologico;
- che un allievo che ha un sistema immunitario compromesso oppure ha avuto una recente malattia deve informare il docente prima di lavorare nel laboratorio di microbiologia;
- che un'allieva che sta affrontando una gravidanza deve informare il docente prima di lavorare nel laboratorio di microbiologia;
- che cappotti, giacche, borse e altri oggetti personali devono essere depositati nelle aree designate e non nella postazione di lavoro;
- che occorre mantenere il passaggio tra i banchi libero da oggetti;
- che non si lavora mai in laboratorio senza la supervisione di un docente;
- che occorre eseguire sempre gli esperimenti pratici attenendosi scrupolosamente alle istruzioni impartite dal docente;
- che non si deve mai abbandonare esperimenti in corso;
- che non si devono mai lasciare incustoditi i bruciatori accesi;
- che non si possono portare fuori dal laboratorio apparecchiature o colture;
- che occorre prestare attenzione quando si maneggiano oggetti di vetro;
- che non bisogna mai rivolgere l'estremità aperta di una provetta contenente una sostanza verso se stessi o verso gli altri;
- che non è ammesso pipettare con la bocca e che invece è necessario utilizzare una pro-pipetta;
- che occorre assicurarsi che non ci siano solventi infiammabili nella zona circostante una fiamma;
- che tutti gli apparecchi non in uso devono essere spenti.

## Posto di lavoro, organizzazione dell'aula e controllo dei materiali

Di seguito sono descritte alcune buone pratiche da applicare per mantenere il posto di lavoro efficiente e sicuro.

- Mantenere l'area di lavoro pulita e priva di oggetti inutili. Il posto di lavoro deve essere sgombro da effetti personali (giacche, cartelle, astucci, ecc.). È permesso tenere sul banco solo i fogli del protocollo e una matita o penna.
- Utilizzare il disinfettante (soluzione di etanolo 70%)<sup>9</sup> per pulire le postazioni di lavoro sia prima sia dopo aver lavorato con i microrganismi.
- Non bloccare l'accesso all'uscita o alle attrezzature di emergenza.
- Ispezionare tutte le attrezzature prima dell'uso, non utilizzare vetreria con crepe o apparecchiature danneggiate.
- Etichettare correttamente tutto il materiale in modo da poter riconoscere in ogni momento il suo contenuto (es. nome del microrganismo utilizzato, nome dello studente e data).

## Smaltimento di rifiuti biologici

Tutto il materiale, i terreni, le provette, le piastre, le anse, le pipette, i guanti e altri oggetti utilizzati per la coltura di microrganismi o che sono stati a contatto con essi devono essere sterilizzati in autoclave o depositati negli appositi contenitori per rifiuti biologici. Non versare mai rifiuti biologici nel lavandino o nel cestino dei rifiuti.

## Protezione individuale

Di seguito sono descritte alcune buone pratiche da applicare per proteggere se stessi dai pericoli insiti nella manipolazione di microrganismi.

- Utilizzare il sapone liquido per lavarsi le mani prima e dopo aver lavorato con i microrganismi. In caso di contatto diretto della pelle con batteri o liquidi contaminati lavare le mani con abbondante acqua e sapone e disinfettare le mani con un disinfettante.
- Scarpe aperte e vestiti corti non sono ammessi.
- Gioielli (anelli, braccialetti, collane, ciondoli), foulard e cravatte devono essere tolti e i capelli lunghi devono essere tenuti raccolti.
- Unghie sintetiche, che sono fatte di polimeri altamente infiammabili, non sono ammesse in laboratorio.
- Indossare occhiali di protezione se necessario e richiesto dal protocollo sperimentale.
- Indossare guanti monouso se necessario e richiesto dal protocollo sperimentale. I guanti devono essere sostituiti se visibilmente contaminati. I guanti non possono essere riutilizzati e devono essere tolti quando si usano strumenti non di laboratorio (es. telefonino, calcolatrice, strumenti scientifici).
- Coprire eventuali tagli sulle mani con un bendaggio resistente all'acqua. I guanti devono sempre essere indossati come protezione supplementare.
- Tutti i dispositivi di protezione (guanti, occhiali di protezione) devono essere tolti prima di lasciare il laboratorio.

<sup>9</sup> La soluzione di etanolo 70% può essere pericolosa se spruzzata negli occhi è inoltre un liquido infiammabile che deve essere posto lontano da fiamme libere e che non va mai utilizzato in presenza di fiamme libere.

## Allegato 2 – Elenco del materiale indispensabile

Di seguito è presentato l'elenco del materiale che è ritenuto indispensabile per condurre delle esperienze scelte di microbiologia nell'ambito del laboratorio di scienze della scuola media.

- Piastra di protezione grigia impermeabile e resistente a disinfettanti
- Bacinella bianca in plastica per disinfezione di utensili e pipette
- Guanti monouso
- Occhiali protettivi
- Coperta antiincendio
- Doccia oculare
- Disinfettante per superfici, mani e strumenti: Sterillium®, soluzione di etanolo al 70%, ipoclorito di sodio 0.5-1.0%
- Cassetta di pronto soccorso: pinzette, forbici, disinfettante tipo Betadine® o Merfen®, garze sterili (diverse dimensioni), bende, cerotti di diverse misure
- Kit di fuoriuscita materiale biologico (da fare o acquistare): ipoclorito di sodio, guanti, paletta e scopino di plastica senza setole, pinza, carta assorbente, sacco autoclavabile monouso, mascherina FFP3, occhiali protettivi, camici monouso, bidone giallo per rifiuti taglienti
- Bidoni per eliminare rifiuti biologici
- Bidoni per vetro e oggetti taglienti
- Scatola rigida di trasporto
- Sacchi per autoclave
- Autoclave o pentola a pressione
- Nastro adesivo indicatore di sterilizzazione per autoclave
- Nastro adesivo indicatore di sterilizzazione a secco

## Allegato 3 – lista degli organismi permessi

Nella lista che segue sono indicati i ceppi di microrganismi che è possibile utilizzare nell'ambito di esperienze pratiche condotte nell'ambito del laboratorio di scienze naturali nella scuola media.

- **Ceppo alimentare di lievito:** *Saccharomyces cerevisiae*
- **Ceppo di lievito utilizzato nei probiotici:** *Saccharomyces boulardii*
- **Ceppi batterici utilizzati nei probiotici:** *Enterococcus faecium*; *Lactobacillus fermentum*
- **Ceppi utilizzati nella lotta biologica alla zanzara tigre e OGM:** *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*; *Bacillus thuringiensis var. israelensis*
- **Ceppo batterico azotofissatore:** *Rhizobium spp.*
- **Ceppi di muffe alimentari (muffe dei formaggi):** *Penicillium candidum* (“muffe bianche” del brie e camembert); *Penicillium glaucum* e *Penicillium roqueforti* (muffe blue utilizzate nel gorgonzola e roquefort)<sup>10</sup>

---

<sup>10</sup> I ceppi delle muffe alimentari non sono intesi come da coltivare in piastra, ma verranno prelevati direttamente dal formaggio.

## Glossario

### A

**Agar:** sostanza mucillaginosa estratta da alghe marine (rodofite), che si presenta sotto forma di polvere biancastra, di fettucce, di lamelle o blocchi; insolubile in acqua fredda, vi si rigonfia notevolmente, assorbendone fino a 20 volte il proprio peso; trova larga applicazione per la preparazione di appretti, di gelatine, di lassativi, come eccipiente di farmaci, per la preparazione di mezzi di colture microbiologiche, come chiarificante di vini e liquori, ecc.

### C

**Clone:** ciascuno degli organismi o cellule geneticamente eguali tra loro, in quanto derivanti da un unico capostipite. In natura i c. si originano dalla moltiplicazione agamica o vegetativa di un solo individuo iniziale.

**Colonia:** in microbiologia, l'insieme delle cellule di microrganismi (batteri, lieviti, muffe, ecc.) originato da un'unica cellula che si moltiplichi su terreno a base di agar e che formi aree rotondeggianti di caratteristica morfologia (colonie lisce, ruvide, settate, ecc.).

**Coltura:** in biologia: *c. batterica*, metodo artificiale di allevare e far riprodurre batteri in mezzi (liquidi, come brodo, latte, siero, sangue, o solidi, come gelatina o agar) adatti alle esigenze del microrganismo, anche a scopo diagnostico; *c. dei tessuti* o *c. in vitro* (perché si fa in contenitori di vetro), metodo d'indagine biologica destinato ad allevare frammenti o cellule singole di tessuto animale o vegetale in condizioni adatte alla loro sopravvivenza e all'accrescimento.

**Commensalismo:** in ecologia, l'associazione tra due specie che produce benefici per una specie (quella *commensale*) mentre la seconda non viene influenzata né positivamente né negativamente.

**Contaminazione:** introduzione di agenti patogeni in materiali, cibi, ambienti, tale da renderli inadatti allo scopo e nocivi per la salute.

21

### D

**Disinfettante:** denominazione generica di sostanza (cloro, iodio, acqua ossigenata, fenolo, alcole etilico, ecc.) capace di uccidere le forme vegetative dei microrganismi e le loro spore.

**Disinfezione:** operazione o complesso di operazioni per la distruzione dei germi patogeni. Viene eseguita con mezzi fisici, chimici (disinfettanti) e meccanici.

### I

**Immunocompetente:** suscettibile di essere attivato a produrre anticorpi.

**Incubare:** operazione di laboratorio, consistente nel lasciare un materiale biologico (coltura microbica, siero di sangue, omogenato di tessuto, ecc.) per un dato tempo a temperatura controllata (in genere 37 °C) allo scopo di far sviluppare un determinato processo biologico o biochimico.

**Infezione:** propriamente, ogni processo morboso provocato da microrganismi patogeni unicellulari (batteri, protozoi, miceti) o da virus.

**Inoculare:** in microbiologia, l'operazione di introdurre una coltura microbica in un terreno di coltura.

**Isolamento:** *l. batterico*, tecnica che mira all'allestimento di colture pure, formate cioè da un solo tipo di batterio, su terreni elettivi.

## M

**Microbiologia:** ramo delle scienze biologiche che ha per oggetto lo studio dei microrganismi, esseri viventi con dimensioni inferiori al millimetro, la cui osservazione richiede l'uso del microscopio ottico. I microrganismi possono essere eucarioti (protozoi, funghi microscopici e la maggior parte delle alghe), procarioti (alghe blu-verdi e batteri) o virus.

**Microorganismo:** nome comprensivo, e non corrispondente ad alcun gruppo zoologico o botanico ben definito, con cui si indicano tutti gli esseri più minuti che sono visibili soltanto con l'aiuto di forte ingrandimento: quindi protozoi, batteri, virus, alghe unicellulari e talvolta alcuni dei metazoi e metafiti di dimensioni più esigue. È sinonimo di microbio, termine che nel linguaggio comune indica preferibilmente i Batteri e altri m. patogeni.

## P

**Patogeno:** nel linguaggio medico, che determina o ha la capacità di provocare fenomeni morbosi: *agenti, batteri, germi p.; potere p.*, la proprietà di alcuni germi di provocare negli animali recettivi un determinato quadro morboso.

**Pericolo:** circostanza o complesso di circostanze da cui si teme che possa derivare grave danno.

## R

**Rischio:** eventualità di subire un danno connessa a circostanze più o meno prevedibili (ad esempio pericoli).

## S

**Sterilizzazione:** Eliminazione di tutti i microrganismi viventi, patogeni e no, e delle loro spore, attuata con mezzi diversi a seconda dei casi.

## Bibliografia

- *Biosafety Guidelines for Handling Microorganisms in the Teaching Laboratory: Development and Rationale*, E. A. B. Emmert (ASM Task Committee on Laboratory Biosafety), Journal of microbiology and biology education, 2013
- *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 5<sup>th</sup> Ed.*, U.S. Department of Health and Human Services, 2009
- *Classificazione degli organismi*, Ufficio federale dell'ambiente (UFAM) – Ufficio federale della sanità pubblica (UFSP), 2013
- *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), 2008
- *Manuale di biosicurezza nei laboratori – edizione italiana (“Laboratory biosafety Manual”, Organizzazione Mondiale della Sanità, 2004)*, Istituto superiore per la prevenzione e la sicurezza del lavoro – Associazione italiana responsabili servizi di prevenzione e protezione in ambiente sanitario, 2005
- *Science safety manual (Grades K-12)*, New York City Department of education, 2008
- *Il rischio biologico nel laboratorio di microbiologia (cap. 1) in Biochimica e biologia molecolare*, B. Tinti, 2013



---

## Autori

Cristina Corti-Fragoso<sup>1+2</sup>

Valeria Guidi<sup>1</sup>

Paolo Lubini<sup>3</sup>

Matteo Mombelli<sup>3</sup>

Nicolò Osterwalder<sup>3</sup>

<sup>1</sup> SUPSI – Laboratorio di microbiologia applicata

<sup>2</sup> BiOutils

<sup>3</sup> GESN - Gruppo esperti di scienze naturali per la Scuola media

