

6040. Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è necessario attenersi a quanto definito, in relazione all'uso delle attrezzature di laboratorio, dal D.Lgs. 626/94 che così stabilisce: "all'atto della scelta delle attrezzature, il datore di lavoro prende in considerazione: le condizioni e le caratteristiche specifiche del lavoro da svolgere; i rischi presenti nell'ambiente di lavoro; i rischi derivanti dall'impiego delle attrezzature stesse". Ciò implica pertanto che prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura debba essere definito il posizionamento, all'interno del laboratorio, della strumentazione da acquistare. Dovrà essere pertanto valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.

Le apparecchiature di prova, in dotazione ad un laboratorio di microbiologia, devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta, in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano adeguata protezione da deterioramento; questa efficienza sarà garantita da opportune disposizioni per la manutenzione e la taratura.

Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista una apposita Scheda che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

Dovrà essere predisposta inoltre una Scheda di Manutenzione che riporti tutte le operazioni effettuate di verifica, sostituzioni, pulizia e riportare le date di effettuazione e la firma del tecnico che ha effettuato le operazioni.

Dovrà essere prevista inoltre una Scheda di Taratura su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, il programma di taratura, la data di effettuazione della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per l'effettuazione della stessa.

Qualora la taratura venga effettuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.

Qualora un'apparecchiatura, che a seguito di taratura abbia rilevato una non attendibilità al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio apponendo un'etichetta con la data e la dicitura "Fuori servizio". L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a riparazione o a taratura che dimostri il rientro nelle condizioni di normalità. Tutto quanto sopra dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

Di seguito vengono indicate e descritte alcune attrezzature di uso più comune nei laboratori per l'analisi microbiologica delle acque.

1. Apparecchiature per la misura del pH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via colorimetrica con l'uso di appropriati indicatori (quando non vi siano interferenze provocate dal colore del terreno) effettuando la lettura con l'impiego di comparatori muniti degli appositi dischi o con altro dispositivo appropriato. Tuttavia, le determinazioni possono essere effettuate con più precisione e speditamente per via potenziometrica con l'uso di pH metri che devono avere una precisione di misura di $\pm 0,1$ unità di pH a circa 20°C.

2. Apparecchi per sterilizzazione

2.1 Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. La sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ (1,1 atmosfera di pressione relativa) per un tempo di 15 ± 1 minuti.

Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore.

2.2 Stufe a secco

Le stufe devono consentire il raggiungimento della temperatura di $+170\pm 10^{\circ}\text{C}$ per circa 2 ore. È necessario che siano corredate di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra 160° e 180°C e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano fornite di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione.

2.3 Lampade a raggi UV

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica.

L'uso richiede precauzioni per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori.

3. Attrezzature per l'incubazione

3.1 Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari scomparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.

Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili da temperatura ambiente a 80°C . Per temperature intorno ai 20°C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.

È opportuno che queste apparecchiature siano provviste inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di 1°C , o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.

Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.

Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non essere eccessivamente ammassato.

3.2 *Bagni termostatici*

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato mediante l'uso di composti ammoniaci quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

4. **Bilance**

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con risoluzione di 0,1 g. Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di una bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg.

5. **Cappe a flusso laminare**

Per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore devono essere utilizzate cappe di sicurezza. Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi 2 e 3 del D.Lgs. 626/94) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe II A. Sono cappe a flusso verticale, aperte frontalmente e progettate per la protezione dell'operatore, del prodotto al suo interno e dell'ambiente circostante.

Le cappe biologiche devono essere collocate in locali esenti da correnti d'aria e lontane da impianti di condizionamento e finestre.

6. **Centrifughe**

Possono essere utilizzate centrifughe da banco e da terra con rotori ad inclinazione fissa o variabile. Possono essere refrigerate o meno in base alle necessità. È necessario utilizzare centrifughe realizzate secondo le norme di sicurezza internazionali.

7. **Frigoriferi e congelatori**

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.

I frigoriferi devono assicurare una temperatura di circa +4°C ed i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature intorno a -20°C e a -70°C.

8. **Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione**

8.1 *Membrane filtranti*

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono costituite da dischi di esteri di cellulosa con

pori uniformemente distribuiti. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro di $0,45 \mu\text{m}$ ($\pm 0,02 \mu\text{m}$). A causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico delle acque vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.

In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.

Le membrane si differenziano a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica in corrispondenza della linea del reticolo, sciamamento delle colonie, crescita lungo la linea del reticolo, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

8.2 *Apparecchiature per la filtrazione*

Nel caso dell'esame batteriologico delle acque, vengono di norma utilizzate apparecchiature idonee per la filtrazione di piccoli volumi. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47-50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. È essenziale che fra sistema filtrante e sistema aspirante sia interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.

I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti (pressione 1,1 atm); dopo accurato lavaggio ed asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali.

Apparecchiature per il supporto di membrane di diametro più grande (ad esempio, 120 mm), in genere di acciaio inossidabile, sono utilizzate per filtrazioni di volumi maggiori di acqua.

9. **Microscopio ottico**

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100X, vetrini portaoggetto e coprioggetto e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica.

10. **Sistemi per anaerobiosi**

Consistono in giare, cappe o altri sistemi a tenuta, idonei a creare aree a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi.

Per il loro corretto uso attenersi scrupolosamente alle indicazioni della ditta produttrice.

11. **Vetreria e materiale monouso**

È da preferire la vetreria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione (da effettuare in stufa a secco alla temperatura di circa 180°C per 1 ora e mezzo o in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti) la vetreria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici

o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Dopo lavaggio e asciugatura la vetreria, per essere sterilizzata deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti ed avere segni di taratura che corrispondano a precise indicazioni volumetriche.

Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

11.1 *Bottiglie per il prelievo*

Possono essere di vetro neutro, resistenti alla sterilizzazione, da chiudere con tappo smerigliato o con idoneo tappo a vite. Prima della sterilizzazione, le bottiglie con tappo smerigliato debbono essere provviste di un cappuccio di copertura in carta resistente ed impermeabile o in foglio di alluminio. Tale tipo di protezione non è richiesto per le bottiglie munite di tappo a vite. Per il campionamento possono essere anche utilizzate bottiglie monouso in materiale plastico, disponibili in commercio già sterili, in genere in confezioni multiple.

11.2 *Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati*

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.

Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, a scatto, di gomma o a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico, e resistenti alla sterilizzazione in autoclave.

11.3 *Pipette e micropipette*

Per le varie operazioni di analisi occorrono pipette di varia capacità (da 1 mL, da 5 mL e da 10 mL) graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.

Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili. Per piccoli volumi possono essere comunque utilizzate micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale da utilizzarsi con appositi puntali monouso.

Nell'eventualità si utilizzino pipette di vetro riutilizzabili, prima della sterilizzazione, esse dovranno essere munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore. Le pipette vanno sterilizzate in confezione singola o multipla (in apposite custodie in metallo, preferibilmente acciaio inossidabile, o in vetro).

Non pipettare con la bocca, ma utilizzare sempre sistemi di aspirazione tipo pompette aspiranti a bulbo di gomma o pipettatrici automatiche.

11.4 *Tubi per coltura*

I tubi vengono usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di "test" biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono da preferire i tubi in vetro resistente alla corrosione ed alla sterilizzazione.

11.5 *Piastre di Petri*

L'uso delle piastre di Petri è indispensabile per l'isolamento di colture batteriche e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate piastre di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm ed un'altezza di 15 mm. Per la filtrazione dell'acqua, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di mem-

brane di 47 mm di diametro, si possono usare piastre di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Piastre di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le piastre di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.