

INFLUÊNCIA DAS GERAÇÕES DE *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* NA PRODUÇÃO DE SEUS ESPOROS

Roselene Ferreira Oliveira; Heron Oliveira dos Santos Lima; Mirela Vanin dos Santos Lima*

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Campo Mourão, PR.

Resumo: A validação de processos de esterilização nas indústrias alimentícias e farmacêuticas é uma das principais ferramentas de garantia de qualidade, tornando os produtos seguros, eficazes e confiáveis. Para avaliar e monitorar os parâmetros físicos de um ciclo de esterilização a vapor utilizam-se os indicadores biológicos, formados por esporos de *Bacillus stearothermophilus*, microrganismos considerados de maior termoresistência. Neste sentido este trabalho teve como objetivo cultivar e caracterizar as gerações do microrganismo *Bacillus stearothermophilus*, avaliando a influência destas gerações nos parâmetros de resistência, formação e concentração dos seus esporos a serem utilizados na produção de indicadores biológicos. Os experimentos foram conduzidos cultivando as 1^a, 2^a e 3^a gerações do *B. stearothermophilus* em meios de cultivo adequados para esporulação, em garrafas Roux, durante um período de 15 dias de incubação. Neste período de 15 dias avaliou-se o processo de esporulação através de microscopia, segundo o método de WIRTZ-CONKLIN, a cada 24 horas de incubação. Os resultados mostraram que as gerações influenciam no processo de esporulação, indicando que a 3^a geração é a mais adequada para a produção de esporos formados, em concentração e com características de resistência térmica adequadas às necessidades de um indicador biológico, para validar e monitorar de forma eficiente ciclos de esterilização a vapor.

Palavras-chave: *Bacillus stearothermophilus*. Esporos. Resistência térmica. Indicadores biológicos.

Influence of *Bacillus Stearothermophilus* generations in the production of its spores The validation of sterilization processes in food and pharmaceutical industries is a major tool for quality assurance, making the products safe, effective and reliable. Biological indicators, formed by spores of *Bacillus stearothermophilus* microorganisms considered at higher thermal resistance, are used to evaluate and monitor the physical parameters of a cycle of steam sterilization. In this way this study aimed to cultivate and characterize the microorganism *Bacillus stearothermophilus* generations, assessing the influence of these generations in the parameters of resistance, formation and concentration of its spores to be used in the production of biological indicators. The experiments were conducted cultivating the 1st, 2nd and 3rd generations of *B. stearothermophilus* in suitable culture media for sporulation, in Roux bottles, for a period of 15 days of incubation. During these 15 days, the sporulation process was evaluated by microscopy, according to Wirtz-Conklin's method, every 24 hours of incubation. The results showed that the generations do influence the sporulation process, indicating that the 3rd generation is the most suitable for the production of formed spores, in concentration and thermal resistance appropriate characteristics to the needs of a biological indicator to efficiently validate and monitor steam sterilization cycles.

Keywords: *Bacillus stearothermophilus*. Spores. Thermal resistance. Biological indicators.

1 Introdução

As bactérias são seres unicelulares e têm vida própria, entretanto existem diversos tipos de microrganismos no mundo com características biológicas diferentes, onde os microrganismos de maior termoresistência são os esporos. Os esporos são estruturas de resistência das bactérias, formados quando as condições são adversas às células vegetativas (PELCZAR *et al.*, 1996). Sendo estes muito resistentes: ao efeito letal do calor, dessecação, congelamento, substâncias químicas e radiações; isto devido à capa protéica do esporo e de grandes quantidades de dipicolinato de cálcio existente em seu metabolismo (JORGE, 1997).

Os processos de esterilização têm por finalidade destruir toda e qualquer forma de vida presente em um material. Os métodos de esterilização (calor, radiação, óxido de etileno entre outros) permitem a obtenção de produtos estéreis muito desejáveis na fabricação de produtos farmacêuticos, médico-hospitalares e alimentícios (HOFFMANN, 2001). Os principais indicadores para monitoramento de ciclos de esterilização são químicos e biológicos. Indicadores químicos são tiras ou fitas de celulose impregnadas com

substâncias químicas sensíveis a determinadas temperaturas. São úteis para controle do material que foi ou não submetido ao procedimento de esterilização. Por outro lado, não podem ser interpretados para garantir efetividade dos processos. Os indicadores biológicos são representados por tiras de celulose, meios de cultura ou outros veículos, impregnados geralmente por esporos bacterianos. Os esporos bacterianos mais utilizados são *Bacillus subtilis* para esterilização pelo calor seco (estufa) e o *Bacillus stearothermophilus* para calor úmido (autoclave) (FERRAZ *et al.*, 1990).

É muito comum a utilização do calor seco como agente esterilizante por ser o mais econômico e mais fácil de controlar. O calor úmido quando comparado ao calor seco é um processo efetivo em função do uso de temperaturas mais baixas e, do curto período de tempo necessário para garantir o nível de esterilidade proposto (PELCZAR *et al.*, 1996; MASTROENI, 2004).

Neste sentido, os esporos bacterianos são muito utilizados como indicadores biológicos na avaliação do nível de esterilidade alcançado e também são capazes de detectar possíveis falhas no processo (FERRAZ *et al.*, 1990).

Dentro do contexto apresentado, o presente trabalho teve

*e-mail: mirelavanin@gmail.com

como objetivo avaliar a influência das gerações da bactéria *Bacillus stearothermophilus* na produção de seus esporos para serem utilizados como indicadores biológicos, monitorando ciclos de esterilização a vapor.

2 Material e métodos

Os experimentos foram realizados no laboratório da Empresa Clean-up Brazil Biotecnologia Ltda.

Microorganismo: cepa liofilizada de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (Instituto Adolfo Lutz);

Meios de cultura: caldo tripton de soja (TSB) DIFCO; solução salina peptonada 0,1% (m/v); Ágar para contagem padrão (PCA); Ágar para esporulação.

Reagentes: hidróxido de cálcio, acetato de cálcio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, verde malaquita, púrpura de bromocresol.

Fitas de papel: papel de filtro (Fitec/Klabin – K 250, 250 g/m²) nas dimensões de 20 x 8 mm e com espessura de 0,2 mm

2.1 Ativação, crescimento e produção do esporo de *Bacillus stearothermophilus*

Experimento 1 (1ª geração):

Para esta etapa foram utilizados 6 tubos de ensaio com tampa estéril, em cada tubo foi adicionada uma pequena quantidade da cepa liofilizada de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 que foram hidratadas com 3 mL de solução salina peptonada 0,1% (m/v) estéril; então a estas cepas hidratadas adicionou-se 10 mL de caldo tripton de soja (TSB) estéril, e os tubos de ensaio, bem fechados, foram incubados à 55°C por 24 horas em estufa bacteriológica, para produção da 1ª geração do microrganismo. Após este período um tubo de ensaio foi utilizado para produção da 2ª geração e os demais foram empregados para avaliar a influência da 1ª geração no processo de esporulação.

Para tanto, 5 tubos de ensaio contendo a 1ª geração passaram por um choque térmico, colocando-os em banho de água à temperatura de ebulição durante 30 minutos e resfriando imediatamente os tubos em água com gelo, para destruir as células vegetativas e ativar os esporos. Imediatamente a suspensão (10 mL para cada garrafa) foi semeada em 5 garrafas Roux contendo 200 mL de ágar para esporulação e incubadas à 55°C por um período de 15 dias. O processo de esporulação foi acompanhado a cada 24 horas empregando análises microscópicas, segundo o método de WIRTZ-CONKLIN (BIER, 1977).

Experimento 2 (2ª geração):

A partir da suspensão contendo a 1ª geração, transferiu-se 0,5 mL desta para tubos de ensaio com 4,5 mL de solução salina peptonada 0,1% (m/v) estéril, homogeneizando a solução em vortex. Em seguida realizou-se um choque térmico nos tubos de ensaio, colocando-os em banho de água à temperatura de ebulição durante 30 minutos e resfriando imediatamente os tubos em água com gelo, para destruir as células vegetativas e ativar os esporos. Imediatamente a suspensão foi semeada na superfície inclinada de 40 slants contendo em cada um 7 mL de meio de cultura Ágar para contagem padrão (PCA), e incubados à temperatura de 55°C durante 48 horas. Após este período retirou-se o crescimento dos slants com 2 mL de solução

salina peptonada 0,1% (m/v), e transferiu-se a solução dos slants para um frasco com pérolas de vidro e barra magnética homogeneizando a solução por aproximadamente 30 minutos. A solução homogeneizada foi chamada de 2ª geração. A suspensão foi semeada em 5 garrafas Roux (10 mL de suspensão para cada garrafa) contendo 200 mL de ágar para esporulação e incubadas à 55°C por um período de 15 dias. O processo de esporulação foi acompanhado a cada 24 horas empregando análises microscópicas, segundo o método de WIRTZ-CONKLIN (BIER, 1977).

Experimento 3 (3ª geração):

A partir da suspensão contendo a 2ª geração transferiu-se 10 mL para a superfície de duas garrafas Roux com 200 mL de ágar para esporulação em cada uma, então as garrafas foram incubadas em estufa à 55°C por 24 horas. Após o período de incubação, retirou-se o crescimento das garrafas Roux com 80 mL de solução de acetato de cálcio 0,02M, filtrou-se com gaze para um erlenmeyer com pérolas de vidro e barra magnética, homogeneizando a solução novamente, por 30 minutos. Ajustou-se o pH para 9,7 com solução de hidróxido de cálcio. Na sequência foram transferidas alíquotas de 10 mL da suspensão homogeneizada para a superfície de 200 mL de ágar para esporulação preparado em cada uma das 5 garrafas de Roux e estas foram incubadas à 55°C por aproximadamente 15 dias. Sendo acompanhado o processo de esporulação a cada 24 horas através de microscopia, segundo o método de WIRTZ-CONKLIN (BIER, 1977).

2.2 Suspensão de esporos

O término do processo de esporulação foi detectado através do acompanhamento microscópico (BIER, 1977), sendo que somente o experimento com a 3ª geração produziu esporos como será discutido. Então o crescimento sobre o ágar de esporulação foi removido com 80mL de solução de acetato de cálcio 0,02M, em cada Roux. A suspensão obtida foi filtrada com gaze para um erlenmeyer com pérolas de vidro e barra magnética, homogeneizou-se a suspensão por 30 minutos. Ajustou-se o pH para 9,7 com solução de hidróxido de cálcio, e o obtido foi nomeado de suspensão 3 (3ª geração).

2.3 Impregnação dos esporos em tiras de papel filtro

Um lote de 1.000 tiras de papel filtro estéril, tratadas e secas foi impregnado com os esporos da suspensão 3. A impregnação se deu por inoculação individual de 0,1 mL da suspensão em cada tira de papel, utilizando para esse procedimento uma pipeta automática. As tiras de papel foram dispostas em placas de pétri estéreis, e secas em estufa à 45°C por 24 horas, então o lote foi identificado como Lote 3 (suspensão 3 – 3ª geração); e armazenado em pacote “steribag” para análises posteriores.

2.4 Identificação de esporos e contagem da concentração de esporos (N₀) impregnados nas tiras de papel

A determinação da viabilidade dos esporos de *B. stearothermophilus* nas tiras de papel foi realizada através do método de semeadura em profundidade, esta análise tem por objetivo quantificar a população de esporos bacterianos impregnados em cada tira de papel.

Para tanto, foram utilizadas 4 tiras do Lote 3. Cada tira de papel foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina peptonada 0,1% (m/v) estéril. As tiras foram solubilizadas empregando vórtex, após a solubilização adicionou-se a cada tubo mais 5mL solução salina peptonada 0,1% (m/v) estéril, e homogeneizou-se em vórtex, sendo considerado cada tubo contendo a diluição 10^{-1} . Então, retirou-se 1mL da diluição 10^{-1} e adicionou em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% (m/v) estéril, homogeneizou em vórtex, obtendo-se assim a diluição 10^{-2} , repetiu-se este procedimento até a obtenção da diluição 10^{-7} para cada tira de papel solubilizada do Lote 3.

Após as diluições os tubos de ensaio sofreram um choque térmico, 30 minutos em banho à temperatura de ebulição e imediatamente resfriados em banho com gelo por 4 minutos.

Então foi feito o plaqueamento das diluições utilizando 1 mL de cada diluição e em torno de 15 mL de TSB + agar-agar; as placas foram homogeneizadas levemente em forma de oito. Após a homogeneização e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas em estufa à 55°C durante 48 horas de acordo com Ferraz *et al.* (1990).

Após o período de incubação as placas foram submetidas à observação para identificação contagem dos esporos obtidos.

2.5 Testes de “viragem” - viabilidade dos esporos de *Bacillus stearothermophilus* no indicador biológico

Para avaliar a viabilidade dos esporos impregnados nas tiras de papel foram utilizadas 100 tiras do Lote 3.

Cada tira foi colocada dentro de uma ampola plástica e adicionada uma ampola de vidro contendo o meio de cultura (0,9 mL de TSB adicionado de púrpura de bromocresol, estéril), então a ampola plástica foi fechada com a tampa apropriada contendo um filtro. Os indicadores biológicos montados foram utilizados para o teste de “viragem”.

Cada indicador biológico teve sua ampola de vidro quebrada para promover o contato do meio de cultivo com a tira de papel contendo os esporos, e foram incubados em estufa/incubadora apropriada à 55°C por 48 horas. Após o período de incubação os indicadores biológicos foram avaliados quanto à coloração. Os indicadores biológicos nos quais o meio de cultura permaneceu na cor púrpura apresentaram resultado negativo e àqueles em que o meio de cultura teve sua coloração alterada para amarelo apresentou resultado positivo, indicando que os esporos impregnados podem ser considerados viáveis.

2.6 Teste de resistência térmica – cálculo do valor de D

Para se conhecer a resistência térmica do indicador biológico são realizados testes que culminam no cálculo do valor de D (parâmetro de resistência térmica). Assim para se chegar ao valor de D do indicador biológico produzido utilizou-se o procedimento *Limited Spearman-Karber* sugerido pela norma ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006. O procedimento *Limited Spearman-Karber* requer sucessivas exposições, diferentes, em intervalos de tempo constantes (d) com um mesmo número de replicatas (n) expostas para cada intervalo.

Os intervalos de exposições (U_1, U_2, \dots, U_k) devem ser escolhidos para cobrir completamente a região da *fração negativa*. Sendo que, exposição inicial (U_1) deverá acontecer no maior tempo possível onde não exista nenhuma replicata estéril ($r = 0$), e a última exposição (U_k) deverá ocorrer num tempo onde todas as replicatas fiquem estéreis ($r = n$). O teste é válido se na exposição U_1 todas as replicatas forem positivas ($r = 0$), e todas as replicatas negativas ($r = n$) nas exposições subsequentes a U_k , e pelo menos dois intervalos fracionais de resposta (onde $r > 0$ e $r < n$) entre U_1 e U_k . O cálculo do meio de exposição até a esterilidade (U_{sk}) ou *Limited Spearman-Karber*, é feito usando a Equação 1:

$$U_{SK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \times \sum_{i=1}^{k-i} r_i \quad (1)$$

onde:

U_{sk} : meio de exposição até a esterilidade (U_{sk}) ou *Limited Spearman-Karber*;

U_k : é a primeira exposição que resulte todas as replicatas estéreis, $r_k = n$;

i : é o tempo de exposição;

d : é o intervalo de tempo entre as exposições;

n : é o número de replicatas em cada exposição;

r_i : é o número de replicatas estéreis em cada exposição;

U_1 : é o maior tempo de exposição possível no qual nenhum indicador biológico é esterilizado, $r = 0$;

U_{k-1} : é o tempo de exposição imediatamente anterior ao U_k ;

r_i : é a somatória das replicatas de indicadores biológicos estéreis (r) em todos os tempo de exposição entre U_1 e U_{k-1} .

O cálculo de D deve ser feito de acordo com a equação 2, abaixo.

$$D = \frac{U_{SK}}{\log N_0 + 0,2507} \quad (2)$$

onde:

U_{sk} : é o meio de exposição até esterilização;

N_0 : é a média de esporos viáveis por indicador biológico determinado através da quantidade total de esporos viáveis.

Assim, para a verificação da resistência térmica dos indicadores biológicos foram montados 140 indicadores do Lote 3.

Para montar os indicadores biológicos cada tira foi colocada dentro de uma ampola plástica e adicionada uma ampola de vidro contendo o meio de cultura (0,9 mL de TSB adicionado de púrpura de bromocresol, estéril), então a ampola plástica foi fechada com a tampa apropriada contendo um filtro.

Para a realização do teste o lote foi dividido em grupos de 20 indicadores biológicos que foram colocados dentro de “steribags” e cada grupo passou por um processo de esterilização em autoclave por tempos pré-determinados (6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 minutos). Após o processo de esterilização os indicadores tiveram suas ampolas de vidro quebradas e foram incubados à 55°C por 48 horas.

Tabela 1: Acompanhamento do processo de esporulação a partir das 3 gerações.

Dias	1ª Geração					2ª Geração					3ª Geração				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

R=Roux

Resultado: (-) não se observou a formação de esporos;

.... (+) observou-se a formação de esporos.

3 Resultados e Discussão

3.1 Acompanhamento do processo de esporulação

O processo de esporulação a partir das 1ª, 2ª e 3ª gerações foi acompanhado diariamente (cada 24 horas) por um período de 15 dias segundo o método de WIRTZ-CONKLIN (BIER, 1977). Os resultados são apresentados na Tabela 1.

A Tabela 1 mostra que a partir da 1ª e da 2ª geração não foi possível produzir esporos. A 3ª geração a partir do 3º dia (72 horas) de incubação foi possível identificar a presença de esporos nos 5 Roux, indicando que as gerações do microrganismo influenciam no processo de esporulação. Desta forma, apenas a suspensão de esporos obtida a partir da 3ª geração foi utilizada nos demais experimentos.

3.2 Identificação de esporos e contagem da concentração de esporos (N₀) impregnados nas tiras de papel

Após o período de incubação de 48 horas as placas de petri contendo as diluições das 4 tiras de papel impregnadas com a suspensão de esporos a partir da 3ª geração, foram analisadas. Pôde-se observar a formação de esporos maduros em todas as placas das 4 tiras de papel, resultando numa média de $1,75 \times 10^5$ UFC/tira.

3.3 Testes de “viragem” - viabilidade dos esporos de *Bacillus stearothermophilus* no indicador biológico

Os 100 indicadores biológicos do Lote 3 foram analisados pelo teste de “viragem”. Verificou-se 100% de “viragem”, resultado positivo, pois todas as ampolas apresentaram o meio de cultivo com a coloração alterada para a cor amarelo.

3.4 Teste de resistência térmica – cálculo do valor de D

Os resultados do teste de resistência térmica podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultado do teste de resistência térmica.

Tempo (min.)	Nº de ampolas com resultado positivo (amarelo)	Nº de ampolas com resultado negativo (púrpura)
6	20	0
8	17	3
10	15	5
12	7	13
14	3	17
16	0	20
18	0	20
20	0	20

De posse dos resultados apresentados na Tabela 2, empregando o procedimento *Limited Spearman-Kärber* e utilizando as equações 1 e 2 já apresentadas, calculou-se o valor de D, que foi de 2,0 minutos. Esse valor sugere uma boa resistência térmica para o indicador biológico, indicando que a partir da 3ª geração foi possível produzir esporos maduros, bem formados e com boa resistência térmica, podendo ser utilizado como indicador biológico para monitorar e validar processos de esterilização a vapor.

4 Conclusão

Após a análise dos resultados obtidos no cultivo e caracterização das gerações de *B. stearothermophilus*, pode-se concluir que a 3ª geração é mais eficiente para a produção de esporos. Os resultados alcançados em relação aos parâmetros de resistência, formação e concentração de esporos apresentaram-se bastante satisfatórios, indicando que os parâmetros de temperatura, concentração de meios de cultivo e as metodologias empregadas foram adequados para a produção de indicadores biológicos, e que estes podem ser empregados no monitoramento de processos de esterilização a vapor, pois atendem todas as exigências da norma ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006, para produção de indicadores biológicos.

Sugere-se ainda a utilização dos mesmos parâmetros de processo para a produção de indicadores biológicos em escala piloto e para produção industrial, em maiores volumes.

5 Referências

ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006 – **Sterilization of health care products** – Biological indicators – Part 1: General requirements, 43 p.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia e suas aplicações à medicina e à higiene**. São Paulo: Editora Melhoramentos, 18.ed., 1246 p., 1977.

FERRAZ, C. A. **Fundamentos de controle biológico de artigos médicos hospitalares**. São José dos Campos: Johnson & Johnson, 114p. 1990.

HOFFMAN, F. L. **Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos**, nº 9 Unesp São José do Rio Preto-SP, p. 11-13, 2001.

JORGE, A. O. C.. **Esterilização em Odontologia. Microbiologia: atividades práticas**. São Paulo: Santos, cap. 14, p.75-78, 1997.

MASTROENI, M. F. **Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde**. São Paulo: Atheneu, p. 160-161, 2004.

PELCZAR, JR, M. J.; et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, vol. 2, 2ªed. São Paulo: Macrons Books, p. 59; 61; 64-65; 194-195, 1996.