

FEBBRAIO 2017

NUMERO 1

## Le spore batteriche, il mezzo più affidabile per la valutazione dei processi di sterilizzazione.

Le spore di resistenza si formano in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli e squilibrate come ad esempio a temperature non ottimali e scarsa presenza di nutrienti.

La spora è formata da una capsula molto resistente e da una catena proteica interna contenente l'informazione per la replicazione batterica che serve a dar vita al batterio una volta che le condizioni ambientali tornano ad essere favorevoli.

Sono particolari **strutture di resistenza**, e non possono essere distrutte neanche da agenti chimici molto aggressivi. Le endospore batteriche sono le uniche ad avere un elevato grado di resistenza al calore. Esse sono inoltre **resistenti ad altri agenti chimici e fisici, quali la disidratazione, le radiazioni, gli acidi ed i disinfettanti chimici**. Al microscopio ottico sono facilmente visibili come corpi **altamente rifrangenti**.

La struttura di una spora è costituita da numerosi strati di rivestimento.

Lo strato più esterno, detto **esosporio**, rappresenta uno strato di rivestimento sottile e delicato. All'interno dell'esosporio si trova la **tunica** (o parete della spora) che è composta da uno o più strati proteici. Al di sotto di questa si trova la **corteccia** (o cortex), costituita da uno strato peptidoglicanico lasso, all'interno del quale si trova il "core" costituito da strutture convenzionali, quali parete cellulare, membrana citoplasmatica, nucleotide ecc..

Una sostanza chimica caratteristica delle endospore, assente nelle cellule vegetative, è l'**acido dipicolinico**, localizzato a livello del "core". Le spore contengono inoltre un'elevata concentrazione di **ioni Calcio**, molti dei quali sono legati all'acido. Tale complesso svolge un ruolo importante nel conferire alla spora la caratteristica resistenza al calore.

La loro struttura e le loro caratteristiche li rendono ottimi candidati per la produzione di indicatori biologici utilizzati nei processi di sterilizzazione.

Esistono specie ampiamente conosciute e accettate tra i produttori di indicatori biologici che mostrano una maggiore resistenza a particolari processi di sterilizzazione. Queste specie sono raccomandate sia nella USP che nella ISO 11138.

Non tutti i batteri possono formare spore e le specie più utilizzate nell'industria della produzione di bioindicatori sono del genere *Bacillus*, *Geobacillus* e *Clostridium*. Sono tutti batteri gram-positivi con cellule a forma di bastoncino. Il *Bacillus* e il *Geobacillus* sono aerobi, mentre il *Clostridium* è anaerobio. All'interno del genere *Bacillus* ci sono molte specie e ogni specie ha tolleranze diverse ai processi di sterilizzazione. Le specie più utilizzate sono *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis* 5230.

Ma vediamo più da vicino queste specie protagoniste del mondo della sterilizzazione.

## Una storia tassonomica in continua evoluzione

### **Il *Geobacillus stearothermophilus***

*“The type species is Geobacillus stearothermophilus (basonym Bacillus stearothermophilus Donk 1920); the type strain of this species is strain DSM 22T”.*

***Geobacillus* (Ge.o.ba.cil«lus. Gr. n. *Ge* the Earth; L. dim. n. *bacillus* small rod; M.L. masc. n. *Geobacillus* earth or soil bacillus) - *stearos* (fat) + *thermo* (heat) + *philus* (loving) =fat- and heat-loving bacterium.**

Il *Geobacillus stearothermophilus* è considerato l'organismo tra i più resistenti in natura e con una storia di riclassificazione particolarmente interessante.

Inizialmente fu classificato come *Bacillus stearothermophilus* (Donk 1920), ma già tra gli anni 30 e 40, grandi scienziati come *Nathan R. Smith*, *Francis E. Clark*, e *Ruth E. Gordon*, dimostrarono riluttanza ad accettare questo tipo di classificazione tassonomica e diedero l'inizio ad un periodo di riorganizzazione del genere ***Bacillus***, che venne poi ripreso da *Ash et al.* che riunirono il *Bacillus stearothermophilus* e le sue specie termofile sorelle, il *B. kaustophilus* e il *B. Thermoglucosidasius* in un ben distinto cluster filogenetico definito “gruppo 5”. Però solo con *Nazina et al.* si riuscirà a dare il nome a questa nuova tassonomia e distinguerlo dal genere *Bacillus*.

Un gruppo di scienziati di Mosca, guidato da *N. A. Nazina* presso l'Accademia Russa delle Scienze, iniziò ad esaminare l'ecologia microbica dei giacimenti petroliferi ad alta temperatura in Kazakistan e in altre aree geografiche della Russia e della Cina. Notarono che la produzione di petrolio in questi

depositi era ostacolata da microbi che utilizzavano idrocarburi e riducevano il solfato creando danno alle strutture metalliche e riducendo la qualità del petrolio.

Furono prelevati campioni di acqua a profondità di oltre un chilometro e ad una temperatura compresa tra i 55° e i 74°C. Come risultato, dalle analisi microbiologiche di questi depositi petroliferi, vennero isolate 5 culture pure (ceppi UT, X, 34T, K e Sam).

Tutti e 5 i ceppi isolati erano moderatamente termofili, neutrofilo aerobico o facoltativamente aerobico, motili, a forma di bastoncino che utilizzavano una vasta gamma di idrocarburi, olii, composti aromatici, alcoli inferiori, acidi organici e carboidrati.

Sulla base delle caratteristiche fisiologiche, dai risultati di analisi degli acidi grassi, dagli studi di ibridazione del DNA - DNA e analisi della sequenza genica del 16S rRNA, fu proposto di creare un nuovo genere, *Geobacillus* gen. nov., contenente due nuove specie subsuperficiali, il *Geobacillus subterraneus* sp. nov. (varietà K, Sam e 34T) e *Geobacillus uzenensis* sp. nov. (varietà X e UT).

Si propose poi l'inserimento anche del *B. stearothermophilus*, *B. thermoleovorans*, *B. thermocatenulatus*, *B. kaustophilus*, *B. termoglucosidasius* e *B. thermodenitrificans*, a questo nuovo genere, con il *Geobacillus stearothermophilus* (precedentemente *Bacillus stearothermophilus* DSM 22T) come la specie tipo.

Nel Gennaio 2002 finalmente l' American Type Culture Collection (ATCC) cambiò il nome del *Bacillus stearothermophilus* a *Geobacillus stearo-thermophilus*<sup>1</sup> (ATCC 7953).

Il *Geobacillus stearothermophilus* è considerato tra gli organismi più resistenti in natura. Viene utilizzato per i processi di sterilizzazione a vapore, perossido di idrogeno, formaldeide, ossido di propilene e sterilizzazione con ozono. È un organismo termofilo con un intervallo di crescita ottimale tra i 55°C e i 60°C. Le caratteristiche di resistenza variano in base alla configurazione dell'indicatore biologico e al processo di sterilizzazione.

Per la ISO 11138-3 i valori di D-value devono essere  $\geq 1,5$  minuti e avere un valore  $Z \geq 6$  °C determinato da tre temperature comprese tra i 110°C e i 130°C. La norma USP invece suggerisce un valore D compreso tra 1,5 e 3 min.

## ***Bacillus atrophaeus***

*Il Bacillus atrophaeus* (Fritze D and Pukall R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*.)

*Atrophaeus* ("ater" si riferisce a "black" e "phaeus" marrone). " *Atrophaeus* " significa " marrone scuro.

La posizione tassonomica del *B.atropheus* è drammaticamente cambiata nel corso degli anni e lo troviamo in letteratura sotto diversi nomi " *B. subtilis var. subtilis*," " *Bacillus globigii*," " *B. Subtilis var. niger*," the "red strain," " *Bacillus niger*," or " *B. atrophaeus subsp. globigii* (Vos et al., 2009). Lo si ricorda infatti per "la lunga storia del ceppo DSM 675, il "ceppo rosso".

Il *B. atrophaeus* è stato isolato e caratterizzato per la prima volta da Migula nel 1900 come *Bacillus globigii* (Fritze & Pukal, 2001). Quando Smith et al. (1952) presero in riesame un gran numero di ceppi collocati sotto questo nome, videro che la descrizione fatta per il *B.globigii*, in realtà corrispondeva alla descrizione del *B.licheniformis*, quindi un gran numero di ceppi vennero trasferiti in quest'ultima specie.

Mentre quei ceppi, che non avevano trovato corrispondenza con la descrizione del *B.licheniformis*, vennero assegnati rispettivamente ai *Bacillus circulans*, *bacillus pumilus* e ' *B. subtilis var. niger* '.

In seguito, Smith et al. (1952), ridussero il *B.niger* da specie a varietà perchè non avevano trovato proprietà discriminanti a parte la diversa pigmentazione, e dichiararono che serviva una descrizione più caratteristica per il *B.subtilis in B.subtilis var. Niger* dopo aver osservato la formazione del pigmento quando coltivato in terreno ricco di tirosina.

Più tardi, Gordon et al. (1973) non trovarono soddisfacente il termine "varietà" e lo reinserirono nel *B. Subtilis* sapendo che questo era un gruppo "ammassato" che sarebbe stato smontato con l'arrivo di test e metodi migliori e dare origine a nuove specie. Infatti, da allora, un certo numero di nuove specie sono state separate dalla specie *B. subtilis sensu stricto* e validamente pubblicate (Priest et al., 1987; Nakamura, 1989; Roberts et al., 1994, 1996; Nakamura et al., 1999).

Nel 1989, Nakamura riprese i ceppi di *B. subtilis* che producevano pigmenti scuri. Attraverso lo studio di ibridazione di DNA e l'osservazione di alcune differenze nei modelli di produzione di pigmenti (in due terreni diversi), è stato in grado di individuare e isolare tre gruppi di ceppi.

Constatò che il gruppo 3 non produceva alcun tipo di pigmento su entrambe i terreni, quindi venne inserito nel ceppo *B.subtilis*.

Il gruppo 2 mostrava una piccola variazione di pigmentazione, ma per la somiglianza DNA-DNA con il gruppo 3, venne anch'esso inserito nel ceppo del *B.subtilis* in senso stretto.

Il gruppo 1 invece, produceva un pigmento bruno nerastro su un mezzo e un pigmento marrone sull'altro mezzo e mostrava bassi livelli di ibridazione del DNA con i due gruppi precedenti.

Pertanto, il gruppo 1 è stato descritto come la nuova specie *Bacillus atrophaeus*.

Sfortunatamente, in questo studio non erano ancora stati presi in considerazione nè il *B.subtilis* var.*niger* DSM 675 (originariamente designato come "ceppo rosso), nè il *B.subtilis* var.*niger* DSM 2277. Per rilevare la posizione tassonomica di questi due importantissimi ceppi per il controllo dei processi di sterilizzazione, bisognerà aspettare la tecnica di ibridazione spettroscopica DNA-DNA (Huû et al., 1983) e le analisi automatizzate RiboPrint (Qualicon) effettuate su tutti i ceppi rilevanti (Bruce, 1996).

Saranno Fritze & Pukall (2001) con il loro studio di " **riclassificazione dei ceppi bioindicatori *Bacillus subtilis* DSM 675 e *Bacillus subtilis* DSM 2277 come *Bacillus atrophaeus*"** che troveranno un'alta omologia dei valori DNA - DNA tra i due ceppi (DSM 675 e DSM 2277) e il ceppo tipo di *B. atrophaeus* (DSM 7264<sup>T</sup>) e bassi valori di ibridazione con il *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>, quale omologia verrà anche confermata dai modelli Riboprint generati e confrontati con tutti i ceppi coinvolti.

Quindi, entrambe i ceppi per il controllo della sterilizzazione DSM 675 (ATCC 9372) e DSM 2277 (ATCC 51189), precedentemente nominati "*B. globigii* ", "*B. niger* ", "*B. subtilis* var. *niger* "e, e in ultimo "*B.subtilis*", saranno riclassificati come membri della specie *B. atrophaeus*.

Il *Bacillus atrophaeus* è un organismo mesofilo Gram-positivo, fenotipicamente simile al *B. subtilis*, tranne per la produzione di un pigmento quando coltivato in un terreno contenente una fonte di azoto organico (Nakamura, 1989).

Il *Bacillus atrophaeus* ha avuto un ruolo importante nell'industria biotecnologica come stimolante per la guerra biologica, nello studio dell'inattivazione delle spore, come promotore della crescita delle piante e protettivo delle colture e come produttore di diverse biomolecole. Negli ultimi 5 anni (dal 2003 al 2012), il *B. atrophaeus* è stato citato in circa 400 brevetti internazionali registrati nel *World Intellectual Property Organization data base*.

Un ruolo fondamentale lo assume come indicatore biologico di sterilizzazione per la convalida e il monitoraggio di routine dell'ossido di etilene e del calore secco. L'intervallo di temperatura di crescita ottimale è tra 30°C - 39°C. Le caratteristiche di resistenza variano in base alla configurazione dell'indicatore e al processo di sterilizzazione. La ISO 11138-2 richiede un valore EO D<sub>54</sub> di non meno di 2,5 minuti per un indicatore standard. La norma ISO 11138-4 richiede un valore di D<sub>160</sub> del

calore secco non inferiore a 2,5 minuti e un valore  $Z \geq 20$  ° C determinato da tre temperature comprese tra 150°C e 180°C.

### *Il Bacillus subtilis “5230”*

All'interno del genere Bacillus ci sono molte specie e ogni specie ha tolleranze diverse ai processi di sterilizzazione.

Una specie largamente utilizzata oggi per la produzione di indicatori biologici di particolari processi di sterilizzazione è il ***B.subtilis 5230 (ATCC 35021)***.

Fu usato per la prima volta da Baxter (Travanol Laboratories) più di 20 anni fa e fu la stessa Baxter ad inviare questo specifico ceppo di B.subtilis “5230” all’American Type Culture Collection (ATCC) così da poter essere utilizzato anche nelle industrie.

Oggi è largamente utilizzato per particolari processi di sterilizzazione a vapore a basse temperature, processi che sono stati accettati dall’FDA e necessari per poter sterilizzare soluzioni e prodotti altamente sensibili che subirebbero alterazione alla temperatura di 121°C.

B. subtilis 5230 è un mesofilo con un intervallo di temperatura di crescita ottimale di 30°C - 39°C. Può crescere fino a 56°C.