



Decisão de Diretoria nº 281/2016/P, de 20/12/2016 - Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I (Poder Executivo, Seção I), Edição nº 126 (239) do dia 22/12/2016 páginas: 100 a 102.

NORMA TÉCNICA

P2.111

Jun/2007
18 PÁGINAS

Avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente através do teste com bioindicadores *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www.cetesb . sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br)



AValiação da Eficiência de Sistemas de Tratamento Térmico sem Combustão de Resíduos Contaminados Biologicamente através do teste com os Bioindicadores *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*

P2.111

Jun/07

SUMÁRIO

Página

Introdução.....	1
1 Objetivo.....	1
2 Abrangência.....	2
3 Controle de Qualidade Analítica.....	2
4 Definições.....	2
5 Aparelhagem.....	3
6 Meios de Cultura e Soluções.....	6
7 Bioindicadores.....	11
8 Execução do teste.....	13
9 Avaliação Qualitativa dos Microorganismos após o teste.....	16
10 Referências.....	18

Introdução

Resíduos contaminados biologicamente devem ser submetidos a tratamento térmico sem combustão (calor seco ou calor úmido) antes de sua disposição em aterros sanitários. A CETESB, órgão do Estado de São Paulo de controle ambiental, fixa as condições exigíveis para esse tratamento (CETESB, 2006), sendo igualmente responsável pelo licenciamento dos aterros sanitários. Nessa Norma são adotados critérios estabelecidos por um grupo de estudo internacional (STAATT, 1994; GODFREY et al., 2003), segundo os quais esse tratamento deve promover a desinfecção dos resíduos contaminados biologicamente, com inativação microbiana de nível III. Ainda de acordo com esse grupo, essa inativação é comprovada pela redução superior a 4 e 6 logs das concentrações de esporos de *Bacillus* e de micobactérias, respectivamente. Nesta Norma, para avaliar a eficiência desses processos são entretanto utilizados apenas esporos de *Bacillus atrophaeus* (FRITZE; PUKALL, 2001) para os sistemas que utilizam calor seco e de *Geobacillus stearothermophilus* (NAZINA et al., 2001) no caso de calor úmido.

1 Objetivo

Esta norma tem por objetivo estabelecer os procedimentos necessários para a realização do teste de avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente, através da utilização de suspensões de esporos viáveis dos bioindicadores *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*.

2 Abrangência

Os procedimentos estabelecidos nesta norma devem ser utilizados pelos laboratórios de instituições públicas ou privadas que realizem o teste de avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente, através dos bioindicadores *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*, para licenciamento ambiental desses equipamentos pela CETESB.

3 Controle de Qualidade Analítica

Os laboratórios que executam os procedimentos descritos nesta norma deverão ser acreditados conforme SMA 37 de 30/08/2006 (SÃO PAULO, 2006, p.26).

4 Definições

Para os efeitos desta norma, são adotadas as definições de 4.1 a 4.5.

4.1 Bioindicador

Preparação contendo microorganismos específicos, normalmente esporos bacterianos, que apresenta grande resistência a determinado processo de esterilização, podendo ser usada na forma de suspensão, ou impregnada em veículos como fitas de papel de filtro, pérolas de vidro ou cilindros de porcelana.

4.2 Esporo

Célula de repouso formada por certos microorganismos quando se encontram em condições ambientais desfavoráveis, que apresenta como característica alta resistência a agentes físicos e químicos. Esta propriedade de resistência possibilita sua escolha como indicador biológico.

4.3 Desinfecção

Procedimento que reduz o nível de contaminação microbiana. No âmbito desta norma, a desinfecção deve atingir uma inativação microbiana de nível III, conforme definido no **item 4.4**.

4.4 Inativação microbiana de nível III

Inativação de formas vegetativas de bactérias e fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, com redução igual ou superior a $6\log_{10}$, e inativação de esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus* com uma redução igual ou superior a $4\log_{10}$.

4.5 Resíduo infectante

Resíduo de serviços de saúde que, por suas características de maior virulência, infectividade e concentração de patógenos, apresenta risco potencial adicional à saúde pública.

5 Aparelhagem

5.1 Equipamentos

5.1.1 Balança

Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g. As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento e sua calibração deve ser feita periodicamente.

5.1.2 Autoclave

Deve manter a temperatura em 121°C durante a esterilização e o ciclo total não deve ultrapassar 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos¹. A capacidade deve ser suficiente para permitir a circulação do ar ao redor do material a ser esterilizado.

5.1.3 Estufa (forno) para esterilização

Deve manter uma temperatura de esterilização estável, de 170°C a 180°C, durante o período de esterilização de 2 horas. O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de 10°C ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso.

5.1.4 Incubadora microbiológica equipada com termostato para operar a 35°C±1,0°C

Deve manter a temperatura na faixa de 35°C±1,0°C. O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de 1,0°C ou menos e estar imerso em líquido.

5.1.5 Incubadora microbiológica equipada com termostato para operar a 60°C±1,0°C

Deve manter a temperatura na faixa de 60°C±1,0°C. O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de 1,0°C ou menos e estar imerso em líquido.

5.1.6 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Deve ser equipada com filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,995 para partículas iguais ou maiores que 0,3µm. O ar estéril produzido deve ser dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, para proporcionar segurança nos manuseios que devam ser realizados em condições de esterilidade, como também proteção aos operadores.

5.1.7 Placa agitadora magnética

Deve ter velocidade regulável.

¹As autoclaves mais modernas que possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão, também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

5.1.8 Contador de colônias

Deve ser utilizado um contador de colônias tipo Quebec, de preferência de campo escuro e que forneça aumento equivalente a 1,5 diâmetros.

5.1.9 Agitador "tipo Vortex"

Deve atingir 2.600rpm, possuir revestimento de espuma e ser acionado com toque do tubo.

5.1.10 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH.

5.1.11 Banho-maria com temperatura regulável para 45°C

Equipado com termostato para manter a temperatura uniforme ($45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de 1°C ou menos.

5.1.12 Banho-maria com temperatura regulável para 80°C

Equipado com termostato para manter a temperatura uniforme ($80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. O termômetro deve ter a escala graduada em incrementos de 1°C ou menos.

5.1.13 Cronômetro

5.1.14 Termômetros

Devem ter escala adequada ao uso e a coluna de mercúrio não deve apresentar interrupções. Também podem ser utilizados termômetros eletrônicos digitais, desde que apresentem faixa, sensibilidade e exatidão adequadas.

5.1.15 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2°C a 8°C , e ter capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ser graduado em incrementos de 1°C ou menos.

5.2 Vidraria e Material Plástico²

5.2.1 Ampolas

Ampolas para congelamento em polipropileno, capacidade de 2,0mL, com tampa de rosca de fechamento interno e batoque de silicone (ou anel O). Podem ser utilizadas ampolas similares desde que proporcionem fechamento hermético.

² Todas a vidrarias e materiais plásticos devem estar estéreis

5.2.2 Frascos de vidro

Frascos de vidro borossilicato, com tampa de borracha e selo de alumínio, capacidade de 2,0mL.

5.2.3 Pipetas

Pipetas graduadas tipo Mohr de 1, 5 e 10mL, com graduação de 1/10 e erro volumétrico inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis, ou de vidro borossilicato.

5.2.4 Ponteiras

Ponteiras de polipropileno para pipetadores automáticos de 1000 μ L e 100 μ L

5.2.5 Tubos de ensaio

De borossilicato ou vidro neutro de 16x150mm.

5.2.6 Tubos de ensaio com tampa de rosca

De borossilicato ou vidro neutro com tampa de rosca de material não tóxico, com capacidade adequada para conter 12 a 15mL do meio de cultura (usualmente são empregados tubos de ensaio de 15 x 150 mm).

5.2.7 Placas de Petri

Devem ser de borossilicato ou vidro neutro de boa qualidade, com 100mm de diâmetro e 15mm de altura ou de plástico não tóxico, de 90mm de diâmetro e 15mm de altura.

5.2.8 Pérolas de vidro

Pérolas de vidro de 3mm de diâmetro.

5.2.9 Garrafa de Roux

De borossilicato ou vidro neutro, com face plana de 209cm² para cultivo microbiano.

5.2.10 Proveta

De borossilicato ou vidro neutro, graduadas, de 100ml e 1000mL de capacidade, com erro volumétrico inferior a 2,5%.

5.2.11 Funil de vidro

Funil analítico de vidro com haste.

5.3 Outros materiais

5.3.1 Recradora para frascos de vidro

Adequada para os frascos de vidro citados no **item 5.2.2.**

5.3.2 Barra magnética

Recoberta com teflon, com tamanhos variáveis.

5.3.3 Pipetadores automáticos de 1000µL e 100µL.

Calibrados periodicamente e com erro inferior a 2,5%.

5.3.4 Estantes para tubos de ensaio

5.3.5 Gaze estéril

5.3.6 Alça de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5mm de diâmetro e 70 a 80mm de comprimento, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

5.3.7 Caixa isotérmica

Caixa em poliestireno leve, com capacidade adequada para conter gelo reaproveitável e as ampolas ou frascos que serão utilizadas no teste

5.3.8 Luvas descartáveis

5.3.9 Alças de Drigalski

5.3.10 Plástico termo-encolhível

5.4 Culturas

5.4.1 Cultura de *Bacillus atropheus* ATCC 9372³

5.4.2 Cultura de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

6 Meios de Cultura e Soluções

6.1 Ágar triptona e soja (“Tryptic Soy Agar with Dextrose”)

6.1.1 Fórmula

Triptona.....	17,0g
Peptona de soja.....	3,0g
Dextrose.....	2,5g

³ *Bacillus atropheus* depositado por Nakamura como *Bacillus subtilis* var. *niger* Smith et al.

Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0g
Monohidrogeno-fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).....	2,5g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0mL
pH final após esterilização :	7,3 ± 0,2

6.1.2 Preparo

Pesar 30,0g do meio desidratado "Tryptic Soy Agar with Dextrose," acrescentar 15g de ágar e 1000ml de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH 1N) . Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Após esterilização estabilizar o meio a 50°C e distribuir volumes de 20mL em placas de Petri de plástico de 90mm de diâmetro e 15mm de altura.

6.1.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado ao abrigo da luz e sob refrigeração (2°C a 8°C) durante, no máximo, 15 dias. Após esse período, deverá ser descartado.

6.2 Caldo triptona e soja com dextrose (Tryptic Soy Broth with Dextrose)

6.2.1 Fórmula

Triptona.....	17,0g
Peptona de soja.....	3,0g
Dextrose.....	2,5g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0g
Monohidrogeno-fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).....	2,5g
Água destilada.....	1000,0mL
pH final após esterilização :	7,3 ± 0,2

6.2.2 Preparo

Pesar 30,0g do meio desidratado "Tryptic Soy Broth with Dextrose" e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 com solução de hidróxido de sódio 1N. Distribuir volumes de 15,0mL em tubos de 15,0mm x 150mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.2.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, 15 dias. Após esse período, deverá ser descartado.

6.3 Ágar triptona glicose extrato de levedura ("Plate Count Agar")

6.3.1 Fórmula

Triptona.....	5,0g
Extrato de levedura.....	2,5g
Dextrose.....	1,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0mL
pH final após esterilização:	7,0 ± 0,2

6.3.2 Preparo

Pesar 23,5g do meio desidratado "Plate Count Agar" e acrescentar 1000ml de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH 1N). Distribuir volumes de 12,0mL em tubos de 15mm x 150mm com tampa de rosca e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.3.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e livre de poeira, durante, no máximo, 15 dias. Após esse período, deverá ser descartado.

6.4 Ágar para esporulação de *G. stearothermophilus*

6.4.1 Fórmula

Ágar triptona glicose extrato de levedura.....	23,5 g
Sulfato de manganês (MnSO ₄).....	0,5 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄).....	0,5 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂).....	0,5 g
Amido solúvel.....	1,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

6.4.2 Preparo

Pesar cada componente do meio, dissolver em água destilada fria, mantendo em repouso por cerca de 15 minutos. Aquecer em manta ou chapa aquecedora até próximo a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 200mL em garrafas de Roux. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Manter sobre superfície plana até solidificação do meio. O valor final de pH é de 7,0 ± 0,1.

6.4.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado à temperatura de geladeira (2°C a 8°C) durante, no máximo, 15 dias. Após esse período, deverá ser descartado.

6.5 Solução Fisiológica

6.5.1 Fórmula

Cloreto de sódio (NaCl).....	0,85g
Água destilada.....	100,0mL

6.5.2 Preparo

Pesar o cloreto de sódio e dissolver na água destilada. Distribuir em tubos de ensaio de 12x120mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.5.3 Armazenamento

A solução preparada deverá ser conservada à temperatura ambiente durante no máximo 15 dias. Após esse período deverá ser descartada.

6.6 Acetato de cálcio 0,02M

6.6.1 Fórmula

Acetato de cálcio [Ca(C ₂ H ₃ O ₂) ₂].....	3,16g
Água destilada.....	1000,0mL

6.6.2 Preparo

Pesar o acetato de cálcio e dissolver na água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.6.3 Armazenamento

A solução preparada deverá ser estocada em geladeira (entre 2°C e 8°C) durante no máximo 15 dias. Após esse período, deverá ser descartada.

6.7 Hidróxido de cálcio saturado

6.7.1 Fórmula

Hidróxido de cálcio [Ca(OH) ₂].....	0,14g
Água destilada.....	100,0mL

6.7.2 Preparo

Pesar o hidróxido de cálcio e dissolver na água destilada, previamente fervida e resfriada até a temperatura ambiente.

6.7.3 Armazenamento

A solução preparada deverá ser estocada em geladeira (entre 2°C e 8°C) durante no máximo 15 dias. Após esse período, deverá ser descartada.

6.8 Água de diluição

6.8.1 Fórmula

Solução-estoque A.....	1,25mL
Solução-estoque B.....	5,00mL
Água destilada.....	1000mL
pH final após esterilização:.....	7,2 ± 0,1

6.8.1.1 Solução-estoque A

6.8.1.1.1 Fórmula

Dihidrogeno-fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄).....	34,0g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

6.8.1.1.2 Preparo

Dissolver o dihidrogeno-fosfato de potássio em 500mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,1 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes adequados ao uso em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

6.8.1.1.3 Armazenamento⁴

Armazenar em geladeira (2°C a 8°C).

6.8.1.2 Solução-estoque B

6.8.1.2.1 Fórmula

Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O) p.a.....	81,1g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

6.8.1.2.2 Preparo

Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água destilada, homogeneizar e completar o volume para 1000mL. Distribuir volumes adequados ao uso em frascos com tampa de rosca.

6.8.1.2.3 Armazenamento

Armazenar em geladeira (2°C a 8°C).

⁴ Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

6.8.2 Preparo final da água diluição

Adicionar 1,25mL da solução-estoque A e 5mL da solução-estoque B a 1000mL de água destilada. Distribuir quantidades adequadas, em tubos de ensaio de 16x150mm ou em tubos de ensaio com tampa de rosca, volumes adequados para preparo de diluições seriadas de razão 1:10.

6.8.3 Armazenamento

A solução preparada deverá ser conservada à temperatura ambiente durante no máximo 15 dias. Após esse período deverá ser descartada.

7 Bioindicadores

7.1 Suspensão de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 com densidade mínima de 10⁶ esporos/mL

7.1.1 Constituição

Essa suspensão é constituída de esporos viáveis de *B. atrophaeus* ATCC 9372 veiculados em solução de acetato de cálcio 0,02M cujo pH é ajustado a 9,6 com solução de hidróxido de cálcio saturado e deverá ser preparada conforme descrito a seguir⁵.

7.1.2 Preparo

7.1.2.1 Inoculação da garrafa de Roux

Preparar o pré-inóculo, estriando 2 ou 3 placas de Petri contendo ágar triptona glicose extrato de levedura ("Plate Count Agar" – PCA) com a cultura⁶ de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e incubar em estufa a 35±1°C durante 24 horas. Selecionar 5 colônias alaranjadas, repicar em cinco tubos de ensaio contendo 7mL de PCA inclinado e incubar os tubos em estufa a 35±1°C durante 24 horas. Colocar 2mL de solução fisiológica (0,85% NaCl) em cada tubo e raspar delicadamente a superfície com a pipeta. Transferir a suspensão de cada tubo para um frasco contendo pérolas de vidro e barra magnética (total de 10mL de suspensão). Submeter a suspensão à agitação magnética durante 30 minutos em banho de água e gelo. Transferir a suspensão para a superfície de 200mL de PCA, contido em uma garrafa de Roux e incubar a garrafa na posição horizontal, em estufa a 35±1°C durante 7 dias.

7.1.2.2 Lavagem da cultura da garrafa de Roux

Introduzir cerca de 20g de pérolas de vidro na garrafa de Roux. Medir 100mL de solução de acetato de cálcio 0,02M em proveta, colocar cerca de 80mL na garrafa e fazer movimentos circulares de forma que as pérolas de vidro raspem a superfície da cultura. Transferir o conteúdo para um frasco contendo pérolas de vidro e barra magnética (caso seja necessário, pode-se filtrar a suspensão através de um funil contendo algumas camadas de gaze). Repetir o procedimento, usando o restante da solução de acetato de cálcio, até lavar totalmente a superfície do agar, retirando toda a cultura.

⁵ Procedimento desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de São Paulo

⁶ Seguir as instruções da ATCC para reconstituição e preparo dessa cultura

Ajustar o pH para 9,6 com solução saturada de hidróxido de cálcio e conservar em geladeira.

7.1.2.3 Procedimento do choque térmico

Submeter a suspensão à agitação magnética, durante 30 minutos, em banho de água e gelo e transferir 1mL para um frasco contendo 99mL de solução fisiológica, cerca de 20g de pérolas de vidro e barra magnética (diluição 10^{-2}). Submeter a diluição 10^{-2} à agitação magnética durante 15 minutos e transferir 1mL para um frasco contendo 99mL de solução fisiológica, cerca de 20g de pérolas de vidro e barra magnética (diluição 10^{-4}). Pipetar 5mL para um tubo de ensaio com tampa de rosca, manter em banho-maria a 80°C durante 10 minutos e imediatamente após transferir para banho de água e gelo.

7.1.2.4 Contagem do número de esporos de *B. atrophaeus* na suspensão

Após o choque térmico, quando o tubo estiver frio, transferir 1mL (diluição 10^{-4}) para um tubo de ensaio contendo 9mL de solução fisiológica (diluição 10^{-5}). Homogeneizar e transferir 1mL deste para outro tubo contendo 9mL de solução fisiológica (diluição 10^{-6}). Repetir o procedimento até a diluição 10^{-9} .

Colocar 1mL de cada diluição em placas de Petri, acrescentar cerca de 20mL de “Plate Count Agar”, previamente fundido e mantido em banho-maria para a estabilização da temperatura a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em cada placa, homogeneizar por meio de movimentos circulares, e deixar em repouso, até a solidificação do ágar. Embrulhar as placas em plástico termo-encolhível e incubar em estufa a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas.

Selecionar para contagem as placas que apresentarem entre 10 e 300 colônias e calcular o número de esporos por mL da suspensão original.

7.2 Suspensão de esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 com densidade mínima de 10^5 esporos/mL

7.2.1 Constituição

Essa suspensão é constituída de esporos viáveis de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 veiculados em solução de acetato de cálcio 0,02M cujo pH é ajustado a 9,6 com solução de hidróxido de cálcio saturado, e deverá ser preparada conforme descrito a seguir⁷:

7.2.2 Preparo

7.2.2.1 Preparo do pré-Inóculo

Repicar a cultura⁸ de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 sobre a superfície de 2 a 3 placas de Petri contendo PCA e incubar as placas durante 48 horas a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Selecionar 5 colônias pequenas e lisas e transferir para 5 tubos contendo PCA inclinado (7ml por tubo) e incubar a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Lavar os tubos com 2ml de solução fisiológica cada, e transferir os 10ml obtidos para a garrafa de Roux contendo o ágar para esporulação (**item 6.4**). Incubar a garrafa em estufa a

⁷ Procedimento desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de São Paulo

⁸ Seguir as instruções do ATCC para reconstituição e preparo da cultura.

60°C±1°C durante 6-10 dias (acompanhar a esporulação por microscopia). Retirar a garrafa da estufa e deixar em geladeira ou temperatura ambiente até o endurecimento do ágar.

7.2.2.2 Lavagem da Garrafa de Roux

Medir 100ml de acetato de cálcio 0,02M em proveta. Colocar cerca de 30g de pérolas de vidro dentro da garrafa, acrescentar cerca de 10ml da solução de acetato e raspar a superfície do ágar com as pérolas, até desprender toda a camada de cultura. Filtrar através de um funil com gaze, recolhendo a suspensão em frasco de tampa de rosca contendo pérolas de vidro e barra magnética. Lavar novamente a garrafa e os resíduos do funil com o restante da solução de acetato. Ajustar o pH da suspensão para 9,6 com solução saturada de hidróxido de cálcio e conservar em geladeira.

7.2.2.3 Procedimento do choque térmico

Antes de proceder à contagem, deixar a suspensão sob agitação magnética, durante 30 minutos, em banho de água e gelo. Transferir 1ml da suspensão para um frasco contendo 99ml de solução fisiológica, pérolas de vidro e barra magnética (diluição 10^{-2}). Submeter à agitação magnética durante 15 minutos e transferir 1ml para um frasco contendo 99ml de solução fisiológica, pérolas de vidro e barra magnética (diluição 10^{-4}). Submeter à agitação magnética durante 15 minutos e pipetar 5ml para um tubo de ensaio com tampa de rosca e manter em banho de água fervente durante 20 minutos. Retirar o tubo do banho fervente e transferir rapidamente para um banho de água e gelo.

7.2.2.4 Contagem do número de esporos de *G. stearothermophilus* na suspensão.

Após o choque térmico, quando o tubo estiver frio, transferir 1mL (diluição 10^{-4}) para um tubo de ensaio contendo 9mL de solução fisiológica (diluição 10^{-5}). Homogeneizar e transferir 1mL deste para outro tubo contendo 9mL de solução fisiológica (diluição 10^{-6}). Repetir o procedimento até a diluição 10^{-8} . Colocar 1mL de cada diluição em placas de Petri, acrescentar cerca de 20mL de "Plate Count Agar", previamente fundido e mantido em banho-maria para a estabilização da temperatura a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em cada placa, homogeneizar por meios de movimentos circulares e deixar em repouso até solidificação do meio. Embrulhar as placas em plástico termo-encolhível e incubar em estufa a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Selecionar para contagem as placas que apresentarem entre 10 e 300 colônias e calcular o número de esporos por mL da suspensão original.

8 Execução do Teste

8.1 Diluição das suspensões de esporos para o teste

Submeter as suspensões de *B. atrophaeus* (7.1.2.4) ou de *G. stearothermophilus* (7.2.2.4) à agitação magnética, durante 30 minutos, em banho de água e gelo.

Diluir a suspensão de *B. atrophaeus*, de acordo com sua concentração, em caldo tripton e soja, de forma a ser obtida uma suspensão contendo 10^4 a 10^6 esporos/mL.

Diluir a suspensão de *G. stearothermophilus*, de acordo com sua concentração, em caldo tripton e soja, de forma a ser obtida uma suspensão contendo 10^4 a 10^6 esporos/mL.

8.2 Preparo das ampolas ou frascos

Distribuir 1,8mL de cada uma das suspensões de esporos, preparadas no item anterior, em ampolas para congelamento (*B. atrophaeus*) ou frascos de vidro (*G. stearothermophilus*), devidamente identificados, na quantidade requerida para o teste. Para o transporte, colocá-las, a seguir, em caixa isotérmica, contendo gelo reaproveitável, para manutenção da temperatura a 4°C - 8°C.

Observação: O teste deve ser realizado com um mínimo de 6 ampolas ou frascos.

8.3 Avaliação quantitativa das suspensões de esporos preparadas para o teste

Preparar diluições 10^{-3} a 10^{-7} das suspensões de esporos preparadas no item 8.1 e inocular 0,1mL na superfície de placas de Petri contendo ágar triptona e soja (em duplicata). Incubar as placas correspondentes ao *B. atrophaeus* a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, e as placas correspondentes ao *G. stearothermophilus* a $60^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas e efetuar a contagem. Essa avaliação tem por objetivo verificar se a concentração das suspensões preparadas está situada na faixa de 10^4 a 10^6 esporos/mL.

8.4 Teste

As ampolas ou frascos preparados são submetidos ao processo de tratamento em teste, durante uma operação de rotina do equipamento. Uma das ampolas ou frascos, que será utilizado como controle, será mantido na caixa isotérmica contendo gelo reaproveitável, juntamente com as ampolas ou frascos recuperados após passagem pelo equipamento. Terminado o teste, todas as ampolas ou frascos deverão ser imediatamente levados ao laboratório.

8.4.1 Acompanhamento do teste

Um funcionário do laboratório encarregado da preparação e avaliação das ampolas ou frascos deverá acompanhar o teste, observando a colocação e retirada dos frascos ou ampolas no equipamento e a manutenção do frasco ou ampola controle na caixa isotérmica contendo gelo reaproveitável.

8.5 Análise quantitativa dos microorganismos após o teste

8.5.1 Ampola ou frasco-controle

Para análise quantitativa da ampola ou frasco controle, inocular a superfície de placas de Petri contendo ágar triptona e soja (em duplicata), com 0,1mL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , preparadas em tubos com água de diluição. As placas correspondentes ao *B. atrophaeus* são incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e as placas correspondentes ao *G. stearothermophilus* a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 48h.

8.5.2 Ampolas ou frascos tratados

Para análise quantitativa, de cada uma das ampolas ou frascos remanescentes após passagem pelo equipamento, inocular a superfície de placas de Petri contendo ágar triptona e soja (em duplicata), com 0,1mL da suspensão de esporos pura, e 0,1mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} , preparadas em tubos com água de diluição. As placas correspondentes ao *B. atrophaeus* são incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e as placas correspondentes ao *G. stearothermophilus* a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h.

8.6 Análise qualitativa dos microorganismos após o teste

Para esta avaliação, de cada uma das ampolas ou frascos de *G. stearothermophilus* remanescentes após passagem pelo equipamento, inocular 0,5mL em 2 tubos contendo caldo triptona e soja, sendo 1 tubo incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o outro a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Caso o teste seja realizado com *B. atrophaeus* inocular somente uma série de tubos contendo caldo triptona e soja com 0,5mL do conteúdo remanescente das ampolas após a passagem pelo equipamento e incubá-los a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Em intervalos de 24h, durante 7 dias, deve ser realizada a observação visual dos tubos para detecção de turbidez, indicativa da presença de contaminantes mesófilos ou termófilos.

Essa avaliação é realizada com o objetivo de verificar se, durante o processo de tratamento ou transporte para o local do teste, ocorreu contaminação das ampolas ou frascos. Entretanto, se o tratamento não tiver sido eficiente, ou se a concentração da suspensão de esporos for superior a 10^4 esporos/mL, poderá ocorrer o crescimento de *B. atrophaeus* ou de *G. stearothermophilus*.

8.7 Avaliação e interpretação dos resultados

8.7.1 Análise quantitativa dos microorganismos após o teste

8.7.1.1 Ampola ou frasco controle

Selecionar para contagem as placas que apresentarem entre 10 e 300 colônias e calcular o número de esporos por mL da suspensão de esporos proveniente da ampola ou frasco controle..

8.7.1.2 Ampolas ou frascos tratados

Selecionar para contagem as placas que apresentarem entre 10 e 300 colônias e calcular o número de esporos por mL da suspensão de esporos proveniente de cada ampola tratada.

8.7.2 Cálculo da redução na contagem da ampola controle com relação às ampolas tratadas

Calcula-se a redução na contagem, subtraindo-se do logaritmo em base 10 da contagem em UFC (unidades formadoras de colônias) obtida para cada microorganismo na ampola ou frasco controle, o logaritmo em base 10 da contagem em UFC de microorganismos, eventualmente observada nas ampolas ou frascos submetidos ao processamento no equipamento em teste, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Redução} = \text{Log}_{10} \text{ UFC ampola ou frasco controle} - \text{Log}_{10} \text{ UFC ampola tratada}$$

O processo de tratamento deve proporcionar uma redução mínima de 4 log 10 nas concentrações dos esporos bacterianos.

Observações:

1. É necessária a recuperação de pelo menos 50% das ampolas ou frascos submetidos ao processo de tratamento para que o teste seja considerado válido;
2. Caso seja observada uma redução superior a $2\log_{10}$ na concentração de esporos da ampola ou frasco controle, com relação ao valor obtido no item 8.3, ou, se a concentração de esporos obtida nessa ampola ou frasco for inferior a 10^4 esporos/mL, o teste será cancelado.

8.7.3 Análise qualitativa dos microorganismos após o teste

Se for observado crescimento nos tubos de caldo triptona e soja inoculados com 0,5mL da suspensão remanescente das ampolas ou frascos tratados, realizar os procedimentos descritos no **item 9**.

8.8 Boletins analíticos

Os boletins analíticos referentes a esse teste deverão conter no mínimo os seguintes itens:

8.8.1 Dados do Sistema

- Endereço completo
- Tipo, modelo e marca do equipamento

8.8.2 Dados do Teste

- Data
- Microorganismo utilizado indicando o nº ATCC
- Concentração inicial da suspensão de esporos em UFC (unidades formadoras de colônias por mL)
- Número de frascos ou ampolas preparados
- Nome do funcionário encarregado do acompanhamento do teste

8.8.3 Resultados

- Concentração do frasco ou ampola controle em UFC/mL
- Concentração de cada frasco ou ampola tratada em UFC/mL
- Redução em log₁₀

8.8.4 Conclusões

8.8.5 Observações (se houver)

9 Avaliação Qualitativa dos Microorganismos após o Teste

9.1 Crescimento em ágar triptona e soja

Estriar as culturas de cada tubo de caldo triptona e soja (**item 8.7.3**) em placas contendo ágar triptona e soja e incubar durante 48 horas, na temperatura adequada (35°C ± 1°C para o *B. atrophaeus* e 60°C ± 1°C para o *G. stearothermophilus*). Após o crescimento, observar a morfologia das colônias e preparar lâminas a partir de cada tipo de colônia (típica e atípica) e corar pelo método de Wirtz-Conklin (BIER, 1985).

9.2 Choque térmico

- Manter os tubos de *B. atrophaeus* a 80°C durante 10 minutos e imediatamente transferir para banho de água e gelo;
- Manter os tubos de *G. stearothermophilus* a cerca de 100°C (banho de água fervente), durante 20 minutos e imediatamente transferir para banho de água e gelo;
- Estriar essas culturas em placas de ágar triptona e soja e incubar, durante 48 horas na temperatura adequada (35°C±1°C para o *B. atrophaeus* e 60°C±1°C para o *G. stearothermophilus*).

9.3 Interpretação dos resultados

Se não houver crescimento nas placas preparadas após o choque térmico, trata-se de formas vegetativas de bactérias contaminantes, que foram destruídas pelo aquecimento. A interpretação dos resultados deve ainda ser feita com base na morfologia das colônias, que deverá ser típica para *B. atrophaeus* ou *G. stearothermophilus* (colônias alaranjadas ou negras para o *B. atrophaeus* e esbranquiçadas para o *G. stearothermophilus*) e através da microscopia pelo método de Wirtz-Conklin, que permite a visualização dos esporos em cor verde e as formas vegetativas em cor vermelha.

Caso for concluído que não se trata de *B. atrophaeus* ou *G. stearothermophilus*, ocorreu contaminação das ampolas ou frascos e o teste deverá ser cancelado.

10 Referências

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

APHA; AWWA; WEF. Microbiological examination. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21thed. Washington, DC: APHA, 2005. Part 9000

ATCC. Manassas, VA, 2007. Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: mar. 2007.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985.

BORDNER, R.; WINTER, J. (Ed.). **Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes**. Cincinnati, OH: EPA, 1978. 338 p. (EPA 600/8-78/017; PB 290329/2BE)

CETESB (São Paulo). **E15.010**: sistema de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente – procedimento. São Paulo, 2006. 13 p.

FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Great Britain, v. 51, n. 1, p. 35-37, 2001.

GODFREY, L. et al. **Validation and monitoring of non-burn health care risk waste treatment facilities in Gauteng**. Presented on International Healthcare Waste Management Conference & Exhibition, Johannesburg, South Africa, 2003. Disponível em: <<http://csir.co.za/ciwm/L%20Godfrey%20HCWR%20paper%20-%20nonburn.pdf>>. Acesso em: mar. 2007.

INMETRO. **NIT - DICLA 028**: critérios para credenciamento de laboratórios de ensaios segundo os princípios BPL - boas práticas de laboratório. Rio de Janeiro, 2003.

NAZINA, T.N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of geobacillus ... **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 433-446, mar. 2001.

PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A.; TAQUEDA, M.E.S. *Bacillus stearothermophilus* sporulation response to different composition media. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Iowa, v. 52, n. 5, p. 198-208, 1998.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Resolução SMA 37 de 30 ago. 2006. Dispõe sobre os requisitos dos laudos analíticos submetidos aos órgãos integrantes do Sistema Estadual de Administração da Qualidade Ambiental, Proteção, Controle e Desenvolvimento do Meio Ambiente e Uso Adequado dos Recursos Naturais – SEAQUA. **Diário Oficial Estado de São Paulo**, Poder Executivo, São Paulo, v. 116, n. 166, 31 ago. 2006. Seção 1, p. 26.

STAATT. **Technical assistance manual**: state regulatory oversight of medical waste treatment technologies. United States, 1994. Disponível em: <<http://www.epa.gov/epaoswer/other/medical/publications.htm#tam>>. Acesso em: mar. 2007.