

# Eficacia comparada de bio-indicadores de uso en la validación microbiológica de biodescontaminaciones con formaldehido vaporizado

G. Pascual Álvarez<sup>1</sup>, D. Garrido Velayos<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Paz De Miguel Casas<sup>3</sup>, E. Nancy Gómez-España<sup>4</sup>, F. David García Domínguez<sup>5</sup>, M. Angel Casado Cuadrado<sup>6</sup>, L. Martínez Alonso<sup>7</sup>, M<sup>a</sup> Paz Mengibar Vallejo<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Jefe del Servicio de Seguridad Biológica del Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA.

<sup>2</sup>Jefe de Equipo de Seguridad Biológica de Veolia Servicios LECAM.

<sup>3,4,5,6,7,8</sup>Técnicos de Seguridad Biológica de Veolia Servicios LECAM.

## RESUMEN

El presente estudio compara los resultados de validación microbiológica para procesos de descontaminación biológica de espacios biocontaminados por inyección de formaldehido vaporizado, de 2 bio-indicadores estándar (*Bacillus atrophaeus* y *Geobacillus stearothermophilus*) en diferentes formatos de presentación y uso.

*Geobacillus stearothermophilus* ha sido utilizado en dos presentaciones: encapsulado (en contenedor hermético bajo cubierta de Tyvek) y no encapsulado (en siembra).

*Bacillus atrophaeus* ha sido utilizado en el formato de presentación habitual no encapsulado dispuesto para siembra en placa.

Los espacios tratados se corresponden con una sala de necropsias y tres boxes de experimentación para grandes animales, ambos bajo condiciones de biocontención de nivel 3 (NCB3/BSL3).

Se concluye si los formatos de uso probados son adecuados para este biodescontaminante.

## ABSTRAT

The present study compares the results of microbiological validation with two bio-indicators (*Bacillus atrophaeus* and *Geobacillus stearothermophilus*) used for biological decontamination processes of vaporized formaldehyde injection spaces.

*Geobacillus stearothermophilus* has been used in two presentations: encapsulated (in sealed container under Tyvek's cover) and unencapsulated (in seed).

*Bacillus atrophaeus* has been used in the usual unencapsulated presentation format arranged for plaque seeding.

The treated spaces correspond to one necropsy room and three experiment boxes for large animals, both under level 3 biocontainment conditions (NCB3 / BSL3).

It is concluded that the usage formats, are suitable for this bio-contaminant.

## PALABRAS CLAVE

NCB3/BSL3:	Nivel de Contención Biológica 3 / Biosafety Level 3
FMDV:	Food and Mouth Disease Virus / Virus de la Fiebre Aftosa
INSHT:	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
Formalina:	Denominación comercial del formaldehido como biodescontaminante
Biodescontaminante:	Producto químico para descontaminaciones biológicas de espacios y superficies.
Bio-indicador:	Indicador biológico que permite validar procesos de biodescontaminación.
Formolizador:	Equipo vaporizador de formalina por calentamiento mediante resistencias eléctricas.

## INTRODUCCIÓN

La descontaminación con formaldehido sublimado o vaporizado a partir del compuesto comercial "formalina", es considerada de alta eficacia, ya que el producto ofrece un amplio espectro de acción frente a virus, hongos y bacterias [1] [2].

Además, correctamente utilizado bajo las condiciones requeridas de humedad relativa y concentración en relación al volumen, el formaldehido permite salvaguardar la integridad de equipos de infraestructura científica, mobiliario, herramientas, utensilios o instalaciones.

En su estado vaporizado, el formaldehido está especialmente indicado para la descontaminación de espacios y equipos teóricamente contaminados con el virus de la Fiebre Aftosa.

Debido a que todo proceso de biodescontaminación deber ser microbiológicamente validado, existen en el mercado diferentes bioindicadores específicos para este producto con diferentes formatos de presentación y uso.

## OBJETIVO

El objetivo de este estudio ha sido la comparación de dos tipos diferentes de indicadores biológicos y diferentes métodos de cultivo en los procesos de biodescontaminación de espacios por inyección de formaldehído vaporizado.

El desarrollo del estudio tratará de demostrar si distintos formatos de presentación de los bio-indicadores *Bacillus atrophaeus* y *Geobacillus stearothermophilus* resultan igualmente adecuados y eficaces en la validación microbiológica del proceso de descontaminación con formaldehído vaporizado de estancias biocontaminadas y específicamente con el virus de la Fiebre Aftosa.

## MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se ha realizado en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), concretamente en su sala de necropsias de unos 220m<sup>3</sup>, y en 3 boxes NCB3<sup>+</sup> de unos 42m<sup>3</sup>. Estos espacios han sido destinados en cinco ocasiones a tareas de investigación con experimentación y toma de muestras en especímenes del género *sus* y en concreto la subespecie *sus scrofa spp. doméstica*, de unos 90Kg de peso e inoculados con el virus de la Fiebre Aftosa (FMDV).

Finalizadas las etapas de experimentación, los espacios utilizados fueron sometidos a limpieza a base de detergente neutro y agua, donde se retiró la materia orgánica existente en superficies, y a posterior descontaminación con formaldehído vaporizado.

Las condiciones físicas paramétricas de los espacios fueron controladas. La humedad relativa se situó entre el 70% y el 80% [5] [8], la temperatura se mantuvo entre los 20°C y 22 ° C y la velocidad del aire se estableció en valores inferiores a 0,12m/s.

Se parte del preparado comercial formalina en estado líquido en solución de 700ml de agua des-ionizada con para-formaldehído a una concentración del 37% y metanol al 10% [9]. Se prepara a razón de 4gr/ m<sup>3</sup> sobre el espacio a tratar calentándose hasta alcanzar la fase vapor, suficiente como para ocupar el volumen espacial total durante un tiempo predeterminado. Finalizado el tiempo de residencia del gas, se llevaron a cabo neutralizaciones del formaldehído excedente con amoniaco al 25%. El tiempo total del proceso nunca fue inferior a las 8 horas [3][4].

La producción de formaldehído gas está condicionada al uso de un tipo de generador que permita la variación de las condiciones físicas del compuesto, oxidando finalmente la formalina en permanganato potásico [6].

Para garantizar la idoneidad del proceso, los espacios se encontraron herméticamente sellados. Los puntos críticos existentes (drenajes), fueron sellados con placas de acero inoxidable AISI 316, siliconado perimetral y cinta selladora de seguridad (cinta americana) superpuesta. Las puertas presentan junta activa neumática, los conductos de aire en impulsión, válvulas de corte estanco y las rejillas de aire en extracción, cierre estanco por presión con la junta de neopreno.

Finalizado el proceso, se monitorizó la concentración de formaldehído y amoniaco residual garantizando una concentración inferior a los límites de exposición profesional para agentes químicos (VLA y VLA-EC), establecidos por el INSHT; Madrid; España.

En el proceso de biodescontaminación y con el fin de ser validado microbiológicamente, se emplearon microorganismos marcadores que "per sé" demuestran susceptibilidad al biodescontaminante empleado [2].

La especie usada *Bacillus atrophaeus* es una bacteria pigmentada en negro, Gram positiva, catalasa-positiva, aerobio facultativo y comúnmente encontrada en el suelo. Tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente adversas.

Las cepas de *B. atrophaeus* se han utilizado ampliamente en la biomedicina como cepas indicadoras para regímenes de descontaminación basados en calor y químicos. La mayoría de las cepas en uso son derivados de un linaje de *B. atrophaeus* que se originó en Camp Detrick en la década de 1950, donde se desarrollaron muchos procedimientos modernos de biocontención. [11] [12] [13] *B. atrophaeus* ha sido históricamente conocido por varios otros nombres, incluyendo *B. globigii* (origen militar "BG") y *B. subtilis var. Níger* [14].

*Geobacillus stearothermophilus* es una bacteria Gram-positiva con forma de bacilo, aeróbica y que se encuadra en el filo Firmicutes. Es utilizado en múltiples procesos de validación microbiológica a temperatura ambiente y bajo condiciones de presión y/o calor [10].

Las esporas vienen adheridas en un pequeño disco de poliestireno impermeable al peróxido de hidrógeno que a su vez se encuentra aislado por un envoltorio de Tyvek/clear Mylar. La cara inferior (Mylar) resulta impermeable al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la superior (Tyvek/Clear) resulta porosa. El indicador biológico está expuesto hacia la cara impemeable.

El trabajo de campo se realizó entre abril y junio de 2016 siendo el material de infraestructura científica utilizado:

- Indicador biológico 3M Attest®; población *Bacillus atrophaeus* de  $1.7 \times 10^6$ , de REF 1264-S,
- Indicador biológico 3M Attest®; población *Geobacillus stearothermophilus* de  $3.7 \times 10^5$ , REF 1262-S,
- Indicador biológico Spordex®; población *Geobacillus stearothermophilus* de  $2.0 \times 10^5$  (ATCC 7953), REF NA300P, lote 0846; caducidad 224/02/2017.
- Medio de cultivo Spordex® STERIS REF NA117,
- Placas de cultivo TRYPTONA SOJA AGAR®,
- Formaldehido al 37-38% de la marca PANREAC®,
- Amoniaco al 25% de la marca PANREAC®,
- 2 Formolizadores FORAMAFLOW VAP/2 (2000L),
- Incubador P. Selecta® INCUDIGIT
- Cabina de Seguridad Biológica clase IIB. TELSTAR PV-100

Para la validación de la sala de necropsias se prepararon bajo cabina de seguridad Biológica clase II, 40 placas de cultivo TSA con tiras de esporas de *Bacillus atrophaeus*, 40 placas de cultivo TSA con tiras de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y 20 controles Spordex® de *Geobacillus stearothermophilus*, todos ellos numerados y siguiendo un mapeo de control (figura 1).

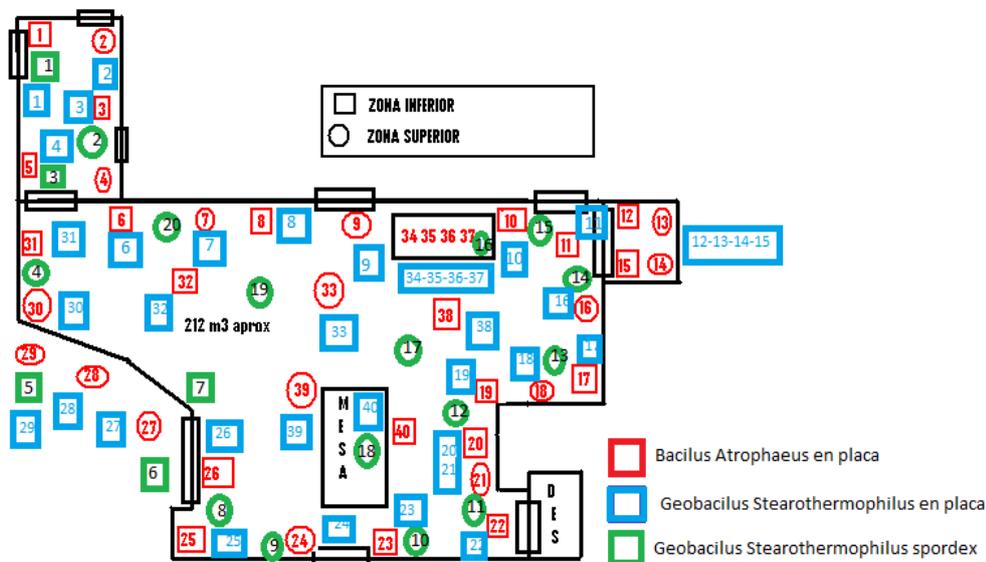


Figura 1. Disposición de los bioindicadores en la sala de necropsia.

Para la validación de los boxes NCB3+ se preparan 10 placas de cultivo TSA con tiras de esporas de *Bacillus atrophaeus*, 10 placas de cultivo TSA con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y 20 controles Spordex® de *Geobacillus stearothermophilus*, todos ellos numerados y siguiendo el mapeo de control de box (figura 2).

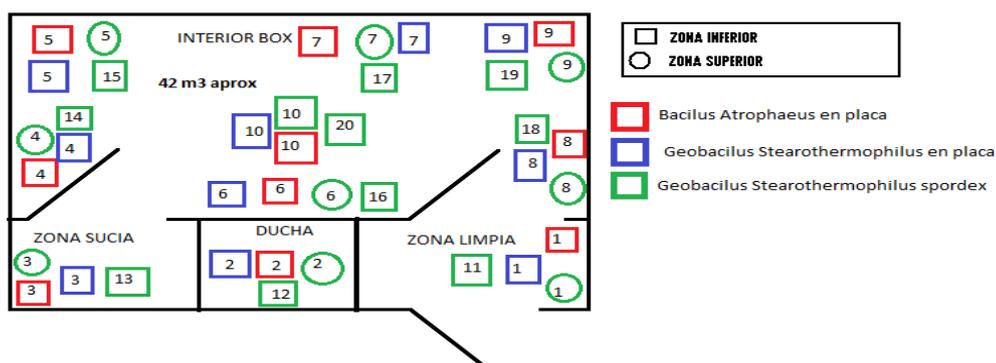


Figura 2. Disposición de los bioindicadores en los boxes.

Se prepararon las salas a descontaminar, se sellaron, se dispusieron los equipos formolizadores en puntos centrados y se cargaron con las cantidades necesarias de formalina-agua-amoniaco según el volumen a tratar. Se programaron los tiempos adecuados de tratamiento y neutralización (tabla 3).

VOL. DEL ÁREA ( m² )	FORMALINA 40% ( ml )	AGUA ( ml )	AMONIACO 25% ( ml )	AJUSTE DEL TEMPORIZADOR		TIEMPO TOTAL	
				Horas	Minutos	Horas	Minutos
100	400	400	250	5	00	5	30
200	500	500	330	5	00	5	30
300	650	650	430	5	30	6	00
400	750	750	500	5	30	6	00
500	900	900	600	6	00	7	00
600	1.0	1.000	660	6	00	7	00
700	1.150	1.150	760	6	30	7	30
800	1.250	1.250	830	6	30	7	30
900	1.400	1.400	930	7	00	8	00
1000	1.500	1.500	1.000	7	00	8	00
1100	1.620	1.620	1.080	7	30	9	00
1200	1.740	1.740	1.160	7	30	9	00
1300	1.860	1.860	1.240	8	00	9	30
1400	1.980	1.980	1.320	8	00	9	30
1500	2.100	2.100	1.400	8	30	10	00
1600	2.220	2.220	1.480	8	30	10	00
1700	2.340	2.340	1.560	9	00	11	30
1800	2.460	2.460	1.640	9	00	11	30
1900	2.580	2.580	1.720	9	30	11	00
2000	2.700	2.700	1.800	9	30	11	00
2100	2.820	2.820	1.880	10	00	12	30
2200	2.940	2.940	1.960	10	00	12	30
2300	3.060	3.060	2.040	10	30	13	00
2400	3.180	3.180	2.120	10	30	13	00
2500	3.300	3.300	2.200	11	00	13	00

Tabla 3. Cantidad de formaldehído y amoniaco según el volumen de la estancia a descontaminar.

Se colocaron los bioindicadores sobre superficie según la estrategia de muestreo establecida (figura 1 y 2). Finalizado el proceso, se retirarán y se transportan a incubador para cultivo.

Pasadas 48, 72 y 168 horas (7 días) de incubación a 55°C, se observaron y anotan los resultados de crecimiento.

### RESULTADOS

En ambas estancias, se aprecia una buena circulación del formaldehído y la humedad relativa, temperatura y velocidad del aire en los espacios tratados, se encontraron dentro de los límites fijados. Todas las placas donde se ha cultivado *Geobacillus stearothermophilus* no encapsulado, no muestran crecimiento, los controles Spordex® muestran crecimiento en todas las posiciones muestreadas, al cabo de 48, 72 y 168 horas (7 días). Todos los controles positivos se comportaron correctamente, con crecimiento de los 3 agentes.

#### Sala de Necropsias (tabla 4)

		Placas de cultivo con <i>Bacillus atrophaeus</i>																																																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	+	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40									
Prueba 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
Prueba 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Prueba 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Prueba 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Prueba 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		Placas de cultivo con <i>Geobacillus stearothermophilus</i>																																																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	+	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40											
Prueba 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Prueba 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Prueba 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Prueba 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Prueba 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		Controles biológicos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Prueba 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 4: Resultados de crecimiento obtenidos para los distintos bio-indicadores en espacio de sala de necropsias.

En la prueba 1, los controles 7, 14 y 18 muestran crecimiento. Se atribuye el crecimiento a una contaminación ocurrida durante la manipulación de retirada de placas. El suceso se anotó en el momento en cada una de ellas.

**Boxes** (tablas 5)

BOX 9											
Placas de cultivo con <i>Bacillus atrophaeus</i>											
	1	2	3	4	5	+	6	7	8	9	10
Prueba 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

BOX 10											
Placas de cultivo con <i>Bacillus atrophaeus</i>											
	1	2	3	4	5	+	6	7	8	9	10
Prueba 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Placas de cultivo con <i>Geobacillus stearothermophilus</i>											
	1	2	3	4	5	+	6	7	8	9	10
Prueba 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Placas de cultivo con <i>Geobacillus stearothermophilus</i>											
	1	2	3	4	5	+	6	7	8	9	10
Prueba 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Controles biológicos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Prueba 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Controles biológicos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Prueba 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

BOX 11											
Placas de cultivo con <i>Bacillus atrophaeus</i>											
	1	2	3	4	5	+	6	7	8	9	10
Prueba 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Placas de cultivo con <i>Geobacillus stearothermophilus</i>											
	1	2	3	4	5	+	6	7	8	9	10
Prueba 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prueba 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Controles biológicos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Prueba 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabla 5.** Resultados de crecimiento obtenidos para los distintos bio-indicadores en espacio de box.

**CONCLUSIONES**

Según los resultados obtenidos:

- 1.- El formaldehído vaporizado no actúa sobre la población de *Geobacillus stearothermophilus* que se encuentra encapsulada al no ser capaz, a presión atmosférica, de penetrar a través de la cubierta de Tyvek que constituye la capa exterior del Spordex®, por lo que este formato comercial no resulta apropiado para este tipo de descontaminaciones.
- 2.- En los formatos de bio-indicadores no encapsulados (en siembra) de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*, se observa que tras la realización del proceso de siembra e incubación no existe crecimiento, por lo que su uso permite determinar la idoneidad microbiológica del proceso de biodescontaminación.
- 3.- El sistema desarrollado, resulta válido, reproducible y extrapolable a cualquier sala o estancia que sea descontaminada con formaldehído vaporizado en adecuadas condiciones de humedad, estanqueidad, temperatura y capacidad, no siendo exclusivo para Instalaciones de nivel 3 de biocontención.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Vesley D, Lauer J, Hawley R. Decontamination, sterilization, disinfection, and antisepsis. In: Fleming DO, Hunt DL, editors. Laboratory safety: principles and practices. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2001. p. 383-402.
- 2.- Favero M. Developing indicators for sterilization. In: Rutala W, editor. Disinfection, sterilization and antisepsis in health care. Washington, DC: Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc.; 1998. p. 119-132.
- 3.- Tearle P. Decontamination by fumigation. *Commun Dis Public Health*. 2003; 6:166-8. Appendix B: Decontamination and Disinfection 335
- 4.- Ackland N R, Hinton M R, Denmeade K R. Controlled formaldehyde fumigation system. *Appl Environ Microbiol*. 1980; 39:480-487.
- 5.- Hoffman R K, Spiner D R. Effect of relative humidity on the penetrability and sporicidal activity of formaldehyde. *Appl Microbiol*. 1970; 20:616-619.
- 6.- Lach V H. A study of conventional formaldehyde fumigation methods. *J Appl Bacteriol*. 1990; 68:471-477.
- 7.- McCormick P. Biological indicators. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1988; 9:504-507.
- 8.- Spiner D R, Hoffman R K. Effect of relative humidity on formaldehyde decontamination. *Appl Microbiol*. 1971; 22:1138-1140.
- 9.- Taylor L A, Barbeito M S, Gremillion G G. Paraformaldehyde for surface sterilization and detoxification. *Appl Microbiol*. 1969; 17:614-618.
- 10.- Wright A M, Hoxey E V, Soper C J, Davies D J G. Biological indicators for low temperature steam and formaldehyde sterilization: the effect of defined media on sporulation, growth index and formaldehyde resistance of spores of *Bacillus stearothermophilus* strains. *J Appl Bacteriol*. 1995;79: 432-438.
- 11.- Wedum, Arnold. "Special Report No. 185 (Declassified)" (PDF). Defense Technology Information Center. United States Chemical Corps. Retrieved 25 February 2015.
- 12.- Gibbons, Henry; et al. (25 Mar 2011). "Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant". *PLoS ONE*. 6 (3): e17836. doi:10.1371/journal.pone.0017836. PMC 3064580 Freely accessible. PMID 21464989.
- 13.- Hayward, AE; Marchetta, JA; Hutton, RS (July 1946). "Strain variation as a factor in the sporulating properties of the so-called *Bacillus globigii*." *Journal of Bacteriology*. 52: 51-4. PMID 20994868.
- 14.- Dagmar Fritze and Ru\$ diger Pukall. (2001). "Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001), 51, 35-37