

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE LINHAGENS
DE *Bacillus* E GÊNEROS RELACIONADOS ISOLADAS DE DUAS INDÚSTRIAS
FARMACÊUTICAS NO RIO DE JANEIRO**

**MULTIPHASE IDENTIFICATION OF STRAINS
OF *Bacillus* AND RELATED GENERA ISOLATED FROM TWO
PHARMACEUTICAL COMPANIES IN RIO DE JANEIRO**

Pamella de Sousa Silva

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0009-0006-6812-8707>
pamella.silva@bio.fiocruz.br

Paula Araujo de Souza

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-4381-8107>
paula.souza@bio.fiocruz.br

Andressa Sbano da Silva Ferreira*

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>
andressa.ferreira@bio.fiocruz.br

Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-7131-6155>
rebeca.lage@bio.fiocruz.br

Maria Luiza Souza Galvão Dacio

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0009-0004-8833-276X>
maria.galvao@bio.fiocruz.br

Angela Dias de Senna

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0009-0004-2688-7217>
angela.senna@fiocruz.br

Maria Giovanna de Araujo Ferreira

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0009-0003-6674-0941>
mariagiovannabiomedica@gmail.com

Marcelo Luiz Lima Brandão

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1121-7312>
marcelo.brandao@bio.fiocruz.br

Leticia de Sousa Albuquerque

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0009-0001-1046-1324>
leticia.albuquerque@bio.fiocruz.br

Luciana Veloso da Costa

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>
luciana.costa@bio.fiocruz.br

Talita Bernardo Valadão

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-5877-8048>
talita.valadao@bio.fiocruz.br

***Autor por correspondência**

Artigo Científico
Submetido em: 20.06.2026
Aprovado em: 15.07.2026

RESUMO

Introdução: A identificação de bactérias formadoras de esporos em ambientes farmacêuticos é essencial para a rastreabilidade microbiológica, a investigação de desvios e o fortalecimento das estratégias de controle de contaminação. **Objetivo:** Realizar a identificação polifásica e a análise filogenética de linhagens bacterianas formadoras de esporos pertencentes ao gênero *Bacillus* e gêneros relacionados, isoladas de diferentes tipos de amostras de duas indústrias farmacêuticas do estado do Rio de Janeiro. **Metodologia:** Foram analisadas 30 linhagens por espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF MS), sequenciamento parcial do gene rRNA 16S e, quando necessário, do gene *rpoB*. **Resultados:** O MALDI-TOF MS apresentou baixa confiabilidade ou ausência de identificação para as linhagens avaliadas. O sequenciamento do gene rRNA 16S permitiu a identificação em nível de gênero, enquanto o gene *rpoB* proporcionou maior resolução para diferenciação de espécies filogeneticamente próximas. **Conclusão:** A abordagem polifásica mostrou-se eficiente para a identificação taxonômica de bactérias ambientais e pode contribuir para a rastreabilidade microbiológica e para a melhoria da acurácia de bases de dados aplicadas à indústria farmacêutica.

Palavras-Chave: *Bacillus*. Identificação de bactérias. MALDI-TOF MS. 16S rRNA. *rpoB*.

ABSTRACT

Introduction: The identification of spore-forming bacteria in pharmaceutical environments is essential for microbiological traceability, deviation investigations, and strengthening contamination control strategies. **Objective:** To perform polyphasic identification and phylogenetic analysis of spore-forming bacterial strains belonging to the genus *Bacillus* and related genera, isolated from different types of samples from two pharmaceutical companies in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Methodology:** Thirty strains were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), partial sequencing of the 16S rRNA gene and, when necessary, of the *rpoB* gene. **Results:** MALDI-TOF MS showed low-confidence identification or no identification for the evaluated strains. Sequencing of the 16S rRNA gene enabled genus-level identification, while the *rpoB* gene provided greater resolution for differentiating phylogenetically close species. **Conclusion:** The polyphasic approach proved to be efficient for the taxonomic identification of environmental bacteria and may contribute to microbiological traceability and to improving the accuracy of databases applied to the pharmaceutical industry.

Keywords: *Bacillus*. Identification of bacteria. MALDI-TOF MS. 16S rRNA. *rpoB*.

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade é a parte das Boas Práticas de Fabricação (BPF) relacionada à coleta de amostras e à execução de ensaios destinados a assegurar que insumos, produtos intermediários, produtos a granel e produtos terminados somente sejam liberados após avaliação satisfatória de sua qualidade (Brasil, 2022a). No contexto de produtos biológicos e farmacêuticos, o sistema de garantia da qualidade deve assegurar a realização dos controles necessários sobre matérias-primas, etapas intermediárias e produto final, além de controles em

processo, como análise de água, ar e monitoramento ambiental, com registro e investigação de desvios (Brasil, 2022a; FDA, 2004; Mattoso *et al.*, 2025).

O monitoramento ambiental desempenha papel fundamental na detecção de bactérias presentes em áreas de produção farmacêutica, contribuindo para a manutenção das BPF e, consequentemente, para a qualidade dos produtos (Brasil, 2022b). Apesar das rígidas medidas de controle na produção de medicamentos, ainda há risco de contaminação por agentes adventícios, que podem ser introduzidos inadvertidamente nos produtos ou persistir no ambiente produtivo (Kremer; Patel, 2019; Ramos *et al.*, 2024). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e agências reguladoras internacionais recomendam a realização de análises em diferentes etapas do processo para garantir a ausência ou níveis aceitáveis de contaminação (EMA, 2022; FDA, 2004; WHO, 2010).

Nesse contexto, ensaios microbiológicos são realizados rotineiramente com o objetivo de detectar e identificar potenciais contaminantes presentes no ambiente produtivo, uma vez que essas bactérias podem comprometer a qualidade, a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos, além de causar alterações físico-químicas indesejáveis (EMA, 2022; FDA, 2004). Dessa forma, a correta caracterização e identificação bacteriana torna-se fundamental para a avaliação das etapas do processo produtivo e para a implementação de ações preventivas e corretivas diante de resultados fora de tendência ou de especificação (Brasil, 2024; Mattoso *et al.*, 2025).

A identificação bacteriana em nível de espécie possui papel fundamental em investigações microbiológicas, especialmente em situações que envolvem recuperações atípicas de bactérias ou contagens que excedem os limites estabelecidos para determinadas categorias de produtos e ambientes produtivos (Brasil, 2024; USP, 2024).

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* estão entre os principais contaminantes bacterianos recuperados em programas de monitoramento ambiental de áreas limpas farmacêuticas (Bottale; Riera; Rabinovitch, 2015; Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022a; Pacheco; Pinto, 2010). A ampla distribuição ambiental dessas bactérias e sua capacidade de formar endósporos altamente resistentes favorecem sua persistência em ambientes produtivos, mesmo após processos de limpeza e sanitização (Celandroni *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2022a; Deal *et al.*, 2016). Nos últimos anos, análises moleculares e filogenômicas resultaram em sucessivas revisões taxonômicas dentro do gênero *Bacillus*, com a criação de gêneros como *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Peribacillus* e *Rumeliibacillus*, entre outros (Gupta *et al.*, 2020; Patel; Gupta, 2020). Atualizações taxonômicas recentes também reposicionaram algumas espécies novamente no gênero *Bacillus*, incluindo linhagens anteriormente classificadas no

gênero *Niallia* (Göker *et al.*, 2025), evidenciando a complexidade filogenética e a constante revisão taxonômica desse grupo bacteriano. Além disso, a elevada similaridade fenotípica e genética entre espécies relacionadas dificulta sua identificação por métodos convencionais, tornando necessária a utilização de abordagens polifásicas que associem métodos fenotípicos, proteômicos e moleculares para uma caracterização taxonômica mais precisa (Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022b; Nunes Ramos *et al.*, 2025; Pereira *et al.*, 2020).

A Espectrometria de Massas por Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) tem contribuído para a identificação bacteriana devido à rapidez na obtenção dos resultados, à simplicidade dos protocolos e ao menor custo por análise, após a aquisição do equipamento, quando comparada a métodos moleculares convencionais (Song *et al.*, 2024). Apesar de sua ampla aplicação, a utilização dessa tecnologia para bactérias isoladas de ambientes farmacêuticos ainda apresenta limitações, principalmente em razão da baixa representatividade de espécies ambientais nos bancos de dados comerciais, o que pode comprometer a identificação desses isolados (Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022a; De Miranda *et al.*, 2023).

Por outro lado, os métodos genotípicos baseiam-se na análise de ácidos nucleicos e apresentam maior precisão taxonômica quando comparados aos métodos fenotípicos, por utilizarem marcadores moleculares conservados entre diferentes espécies bacterianas (Silva-Santana; de Sales; Brandão, 2026). Essas abordagens reduzem a subjetividade da identificação e aumentam a confiabilidade dos resultados, embora envolvam maior custo operacional e demandem maior tempo de execução quando comparadas aos métodos fenotípicos convencionais (Li *et al.*, 2026; Nunes Ramos *et al.*, 2025; Song *et al.*, 2024). Estudos anteriores demonstraram que a identificação de bactérias isoladas de áreas produtivas farmacêuticas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, associado à análise de outros genes constitutivos, como o gene *rpoB*, tem contribuído para uma identificação taxonômica mais precisa. Para a diferenciação de espécies filogeneticamente próximas do gênero *Bacillus*, o gene *rpoB* tem se destacado por apresentar maior variabilidade genética e melhor poder discriminatório quando comparado ao gene 16S rRNA (Costa *et al.*, 2022b; Mohkam *et al.*, 2016). A identificação por metodologia genotípica associada à inserção dos espectros proteômicos em bancos de dados de MALDI-TOF MS tem possibilitado a criação de bases de dados customizadas mais eficientes para identificação de bactérias ambientais (Costa *et al.*, 2022b; Costa *et al.*, 2024; De Miranda *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2024).

Este estudo teve como objetivo identificar linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados isoladas de diferentes tipos de amostras de duas unidades farmacêuticas, por meio de uma

abordagem polifásica envolvendo MALDI-TOF MS e sequenciamento genético, visando subsidiar a construção de uma base de dados customizada e aumentar a acurácia na identificação de bactérias de origem ambiental.

2 METODOLOGIA

2.1 ISOLAMENTO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Trinta linhagens bacterianas de bastonetes Gram-positivos esporulados, previamente classificadas no fluxo de controle microbiológico das unidades farmacêuticas, foram isoladas entre 2016 e 2025 a partir de diferentes tipos de amostras de duas instalações farmacêuticas, denominadas A e B, localizadas no estado do Rio de Janeiro. Para preservar a confidencialidade institucional, o tipo de produto fabricado em cada unidade não foi discriminado. As linhagens foram armazenadas em caldo infusão cérebro-coração (Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 20% em temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Dessas linhagens, cinco, codificadas por B+número/ano de isolamento, foram isoladas da unidade A, enquanto 25 linhagens, codificadas por BF+número/ano de isolamento, foram isoladas da unidade B. Todas foram depositadas na Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

2.2 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS

As linhagens foram submetidas à identificação proteômica por MALDI-TOF MS no equipamento MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Após incubação em ágar sangue de carneiro (ASC) (Biocen, Campinas, Brasil) ou ágar triptona de soja (TSA) (Biocen, Campinas, Brasil), por 24-48 h a 30-35 °C, uma pequena porção das colônias foi transferida, em duplicata, para os orifícios de uma placa metálica específica do equipamento. Em seguida, adicionou-se 1 µL de ácido fórmico a 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado 1 µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Bruker Daltonics, Billerica, EUA). O padrão Bacterial Test Standards (BTS, Bruker Daltonics, Billerica, EUA) foi utilizado para calibração do equipamento. Os espectros obtidos foram analisados no software MBT Compass HT v. 5.1.100, de acordo com os seguintes critérios: escores $< 1,70$, não identificado; escores entre 1,70 e 1,99, identificação de baixa confiabilidade; e escores $\geq 2,00$, identificação de alta confiabilidade. As linhagens não identificadas ou identificadas com baixa confiabilidade foram encaminhadas para o sequenciamento do gene 16S rRNA.

2.3 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA

A extração do DNA foi realizada com o reagente PrepMan Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), conforme instruções do fabricante. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado por metodologia Sanger com o kit MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo as instruções do fabricante, ou utilizando os iniciadores universais PA e 1492 (amplificação e sequenciamento) e 519, 1242, 1831 e 1832 (sequenciamento) (Quadro 1) e o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Quadro 1 – Iniciadores utilizados para o sequenciamento do gene 16S rRNA

Iniciadores	Direção	Sequência (5'-3')	Fontes
PA	<i>forward</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Watts <i>et al.</i> , 2000
1492	<i>reverse</i>	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Polz; Colleen, 1998
1831	<i>forward</i>	GAG GAA CAC CGA TGG CGA AGG C	Watts <i>et al.</i> , 2000
1832	<i>reverse</i>	GCC CCC GTC AAT TCC TTT GAG TT	Watts <i>et al.</i> , 2000
1242	<i>forward</i>	CAC ACG TGC TAC AAT GG	Johnson, 1994
519	<i>reverse</i>	GWA TTA CCG CGG CKG CTG	Johnson, 1994

Legenda: Y = C ou T; W = A ou T; K = G ou T.

Fonte: Elaborado pelos autores.

As sequências foram montadas com o programa DNASTAR Lasergene SeqMan v. 7.0.0 e depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para identificação das linhagens, as sequências foram posteriormente comparadas com a base de dados EzBioCloud v. 21/04/2025 - <https://www.ezbiocloud.net/> (acesso em 26/05/2026). Os pontos de corte de 97% e 98,7% foram considerados para identificação em nível de gênero e espécie, respectivamente, considerando parâmetros usualmente empregados para análise de similaridade do gene 16S rRNA (Kim *et al.*, 2014). As linhagens cuja identificação em nível de espécie não foi possível, por apresentarem mais de uma espécie com similaridade $\geq 98,7\%$, foram submetidas ao sequenciamento do gene *rpoB*.

2.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *rpoB*

O sequenciamento do gene *rpoB* foi realizado conforme Costa *et al.* (2022b), com base na metodologia proposta por Ki, Zhang e Qian (2009). As sequências obtidas foram editadas

utilizando o software DNASTAR Lasergene SeqMan v. 7.0.0 e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank/NCBI por meio da ferramenta BLAST para determinação taxonômica das linhagens. Como não há um ponto de corte universalmente estabelecido para identificação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados com base no *rpoB*, a interpretação considerou a maior similaridade obtida, a distância em relação às espécies mais próximas e a coerência com os resultados das análises do gene 16S rRNA. Posteriormente, as sequências foram depositadas no GenBank/NCBI.

2.5 EXPANSÃO DA BASE DE DADOS DO MALDI Biotyper®

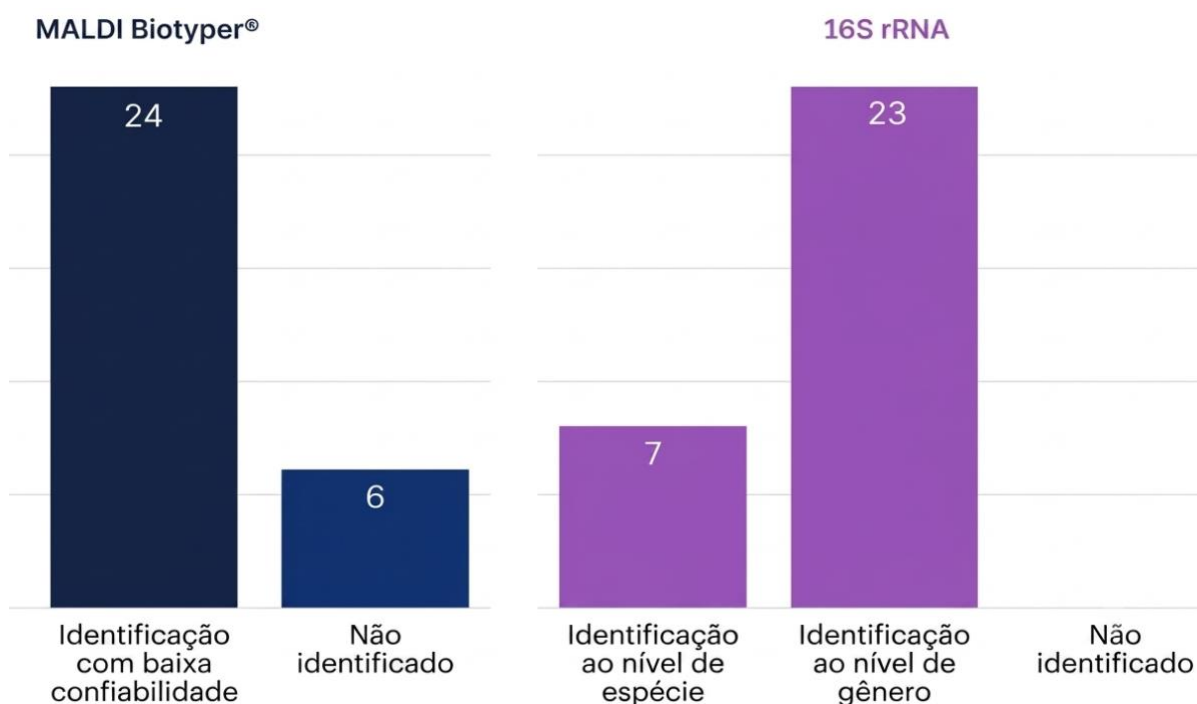
As linhagens identificadas ao nível de espécie após sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB* foram avaliadas para expansão da base de dados do equipamento MALDI Biotyper®. A seleção considerou a identificação taxonômica final em nível de espécie, a disponibilidade da linhagem para obtenção de espectros de qualidade e a contribuição potencial para complementar espécies ambientais sub-representadas no banco de dados comercial. Para isso, as linhagens selecionadas foram semeadas em placas contendo TSA ou ASC e incubadas a 30-35 °C por 24-48 h. Em seguida, foi realizado o protocolo descrito por Costa *et al.* (2024).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por MALDI-TOF MS identificou com baixa confiabilidade 80,0% das linhagens (n = 24) e não foi capaz de identificar 20,0% (n = 6) (Tabela 1; Figura 1). A baixa eficácia dessa metodologia para a identificação confiável de linhagens de *Bacillus* e gêneros relacionados isoladas de ambientes de produção farmacêutica já foi demonstrada anteriormente (Caldeira *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2022b), o que provavelmente se deve à representatividade ainda limitada de espécies ambientais nos bancos de dados comerciais. Com a finalidade de aumentar a acurácia dos resultados de identificação, foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA, que identificou 76,7% (n = 23) das linhagens em nível de gênero e 23,3% (n = 7) em nível de espécie. Esse resultado demonstra que, embora o sequenciamento do gene 16S rRNA tenha sido mais eficaz que o MALDI-TOF MS, por identificar 100% das linhagens ao menos em nível de gênero, sua resolução foi limitada para espécies filogeneticamente próximas. *Bacillus* (56,7%), *Peribacillus* (20,0%) e *Metabacillus* (13,3%) foram os gêneros mais encontrados no presente estudo e compreendem a família *Bacillaceae* (Figura 2). Esses grupos são frequentemente associados a ambientes industriais e apresentam elevada capacidade de persistência em áreas produtivas devido à formação de endósporos resistentes, reforçando a importância de estratégias eficazes de monitoramento e controle microbiológico. Algumas

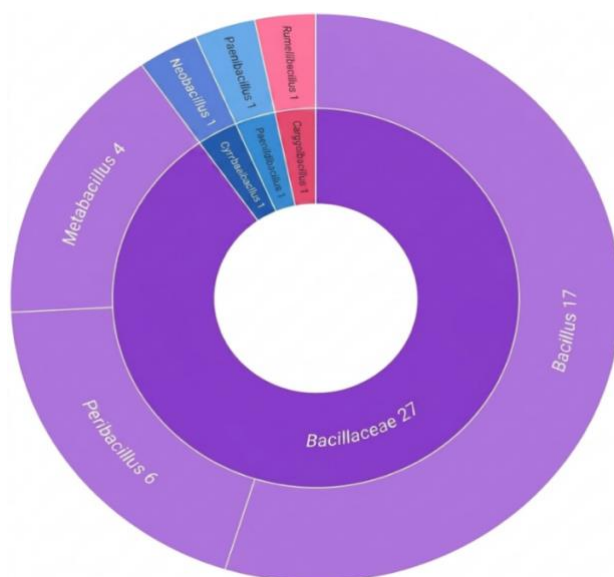
espécies pertencentes a *Bacillus* e gêneros relacionados também já foram relatadas em contextos clínicos, embora o presente estudo não tenha avaliado potencial patogênico ou fatores de virulência (Celandroni *et al.*, 2016).

Figura 1 – Comparação entre MALDI Biotyper® e sequenciamento do gene 16S rRNA na identificação das 30 linhagens bacterianas avaliadas



Fonte: Elaborada pelos autores (2026).

Figura 2 – Famílias e gêneros bacterianos identificados nas 30 linhagens avaliadas



Legenda: O anel interno indica a família dominante (*Bacillaceae*, n = 27) e o anel externo apresenta a discriminação em nível de gênero, acompanhada pelo número absoluto de isolados identificados para cada grupo.

Fonte: Elaborada pelos autores no Flourish (<https://flourish.studio/>).

As 23 linhagens não identificadas ao nível de espécie pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foram submetidas ao sequenciamento do gene *rpoB*; contudo, o sequenciamento foi realizado com êxito em apenas quatro linhagens (B2455/21, B0401/22, BF024/23 e BF25/23) (17,4%). O gene *rpoB* foi capaz de identificá-las em nível de espécie, demonstrando maior resolutividade na diferenciação de espécies de *Bacillus* e gêneros relacionados em comparação ao gene 16S rRNA (Costa *et al.*, 2022b; Ki *et al.*, 2009; Mohkam *et al.*, 2016). Ao contrário do 16S, que possui regiões altamente conservadas nas quais iniciadores universais anelam facilmente (Nunes Ramos *et al.*, 2025), o gene *rpoB* é mais variável. Trata-se de um gene de cópia única, o que evita a heterogeneidade de sequência observada no 16S, presente em múltiplas cópias no genoma bacteriano. O gene *rpoB* apresenta taxa de mutação mais elevada, o que geralmente permite melhor distinção entre espécies intimamente relacionadas, embora dificulte o desenvolvimento de iniciadores universais capazes de anelar em todas as espécies bacterianas (Bivand *et al.*, 2024). Após o sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*, 12 linhagens (40,0%) foram identificadas em nível de espécie e, dentre elas, quatro foram inseridas na base de dados do MALDI Biotyper® (Tabela 1). Essa inclusão contribuirá para o aumento da acurácia do sistema de identificação, favorecendo futuras investigações de fontes de contaminação e a implementação de medidas preventivas para reduzir a ocorrência de desvios nas indústrias farmacêuticas estudadas.

Tabela 1 – Identificação proteômica e genotípica de linhagens bacterianas formadoras de esporos isoladas de duas unidades farmacêuticas no estado do Rio de Janeiro

Linhagem (número do depósito na CBAS)	Origem	MALDI Biotyper® (escore)	Sequenciamento 16S rRNA (% de similaridade)	Nº de acesso NCBI (nº de pb)	Sequenciamento <i>rpoB</i> (% de similaridade)	Nº de acesso NCBI (nº de pb)	Identificação final
B636/16** (CBAS1133)	Material de embalagem	Não identificado (1,43)	<i>Neobacillus drenthensis</i> (99,42)/ <i>N. soli</i> (99,16)/ <i>N. bataviensis</i> (99,02)/ <i>N. vireti</i> (99,01)/ <i>N. cucumis</i> (98,95)/ <i>N. novalis</i> (98,81)/ <i>N. kokaensis</i> (98,81)	PP060583 (1432)	NR	NA	NA
B1585/18¹ (CBAS1282)	Monitoramento de contato	Não identificado (1,45)	<i>*Paenibacillus polygoni</i> (98,71%)	PP060482 (1488)	NR	NA	<i>Paenibacillus polygoni</i>
B2438/21** (CBAS1147)	Meio de cultura	<i>Bacillus</i> sp. (1,72)	<i>Peribacillus frigiditolerans</i> (99,86%)/ <i>P. simplex</i> (99,73)/ <i>P. muralis</i> (99,59)/ <i>P. butanolivorans</i> (99,52)	OR652418 (1481)	NR	NA	NA
B2455/21 (CBAS1144)	Produto intermediário	<i>Bacillus licheniformis</i> (1,70)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,79)/ <i>haynesii</i> (99,72)/ <i>B. sonorensis</i> (99,58)/ <i>B. paralicheniformis</i> (99,44)/ <i>B. aerius</i> (99,36)/ <i>B. glycinifermentans</i> (99,22)/ <i>B. swezeyi</i> (99,01)/ <i>B. changyiensis</i> (98,73)	OR652587 (1439)	<i>Bacillus licheniformis</i> (98,68) / <i>B. haynesii</i> (95,69) / <i>B. paralicheniformis</i> (95,77)	OR576233 (1138)	<i>Bacillus licheniformis</i>
B0401/22 (CBAS1143)	Monitoramento ativo do ar	Não identificado (1,27)	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (100)/ <i>B. glycinifermentans</i> (99,79)/ <i>B. haynesii</i> (99,72)/ <i>B. sonorensis</i> (99,44)/ <i>B. licheniformis</i> (99,36)/ <i>B. aerius</i> (98,94)/ <i>B. swezeyi</i> (98,73)/ <i>B. cabrialesii</i> subsp. <i>cabrialesii</i> (98,73)/ <i>B. changyiensis</i> (98,73)/ <i>B. cabrialesii</i> subsp. <i>cabrialesii</i> (98,73)	OR652589 (1439)	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (99,73) / <i>B. haynesii</i> (97,04) / <i>B. licheniformis</i> (96,50)	PP706412 (1146)	<i>Bacillus paralicheniformis</i>
BF006/23** (CBAS1130)	Monitoramento ativo do ar	<i>Peribacillus simplex</i> (1,86)	<i>Peribacillus frigiditolerans</i> (99,73)/ <i>P. muralis</i> (99,46)/ <i>P. simplex</i> (99,33)/ <i>P. butanolivorans</i> (99,19)	PQ284529 (747)	NR	NA	NA

BF007/23** (CBAS1129)	Monitoramento ativo do ar	<i>Peribacillus simplex</i> (1,91)	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> (99,72)/ <i>P. simplex</i> (99,51)/ <i>P. muralis</i> (99,37)/ <i>P. butanolivorans</i> (99,30)	OR652607 (1419)	NR	NA	NA
BF009/23** (CBAS1128)	Monitoramento ativo do ar	<i>Niallia taxi</i> (1,75)	<i>Bacillus taxi</i> (99,59)/ <i>B. nealsonii</i> (99,32)/ <i>B. circulans</i> (98,91)	OR083094 (1521)	NR	NA	NA
BF012/23	Monitoramento ativo do ar	<i>Bacillus infantis</i> (1,95)	<i>Bacillus infantis</i> (99,93)	PQ042037 (1506)	NR	NA	<i>Bacillus infantis</i>
BF022/23¹ (CBAS1257)	Monitoramento ativo do ar	<i>Rummeliibacillus suwonensis</i> (1,74)	<i>Rummeliibacillus suwonensis</i> (99,79)	PP126323 (1446)	NR	NA	<i>Rummeliibacillus suwonensis</i>
BF024/23 (CBAS1258)	Monitoramento ativo do ar	<i>Bacillus</i> sp. (1,84)	<i>Bacillus circulans</i> (99,52)/ <i>B. nealsonii</i> (98,89)	PP622802 (1256)	<i>Bacillus circulans</i> (90,35)/ <i>B. nealsonii</i> (82,67)	PX842449 (1232)	<i>Bacillus circulans</i>
BF025/23 (CBAS1259)	Monitoramento ativo do ar	<i>Niallia circulans</i> (1,92)	<i>Bacillus circulans</i> (99,41)/ <i>B. oryzae</i> (98,73)	PQ284552 (1021)	<i>Bacillus circulans</i> (89,64%)/ <i>B. nealsonii</i> (82,13)/ <i>B. oryzae</i> (77,88)	PX842447 (1189)	<i>Bacillus circulans</i>
BF039/23**	Monitoramento ativo do ar	Não identificada (1,50)	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> (100)/ <i>P. simplex</i> (99,72)/ <i>P. muralis</i> (99,59)/ <i>P. butanolivorans</i> (99,52)	PP623074 (1477)	NR	NA	NA
BF040/23** (CBAS1262)	Monitoramento ativo do ar	<i>Peribacillus simplex</i> (1,82)	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> (100)/ <i>P. simplex</i> (99,73)/ <i>P. muralis</i> (99,59)/ <i>P. butanolivorans</i> (99,52)	PP623087 (1474)	NR	NA	NA
BF009/24 (CBAS1266)	Produto em granel	<i>Niallia taxi</i> (1,73)	<i>Bacillus taxi</i> (99,38)/ <i>B. nealsonii</i> (99,10)/ <i>B. circulans</i> (98,82)	PQ362008 (1469)	NR	NA	NA
BF020/24¹	Matéria-prima	<i>Metabacillus indicus</i> (1,70)	<i>Metabacillus idriensis</i> (99,72)	PP701427 (1486)	NR	NA	<i>Metabacillus idriensis</i>
BF022/24 (CBAS1271)	Matéria-prima	<i>Metabacillus indicus</i> (1,75)	<i>Metabacillus idriensis</i> (99,72)	PP701431 (1477)	NR	NA	<i>Metabacillus idriensis</i>
BF025/24¹ (CBAS1272)	Matéria-prima	<i>Metabacillus indicus</i> (1,74)	<i>Metabacillus idriensis</i> (99,72)	PP701433 (1487)	NR	NA	<i>Metabacillus idriensis</i>

BF056/24** (CBAS1529)	Matéria-prima	<i>Bacillus pumilus</i> (1,78)	<i>Bacillus altitudinis</i> (99,93) / <i>B. xiamenensis</i> (99.86)/ <i>B. pumilus</i> (99.59)/ <i>B. zhangzhouensis</i> (99.59)/ <i>B. australimaris</i> (99.52)/ <i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i> (99.52)/ <i>B. safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i> (99.52)	PQ284603 (1500)	NR	NA	NA
BF058/24** (CBAS1530)	Matéria-prima	Não identificada (0)	<i>Bacillus siamensis</i> (99.86)/ <i>B. amyloliquefaciens</i> (99.86)/ <i>B. velezensis</i> (99.86)/ <i>B. subtilis</i> (99.59)/ <i>B. nakamurai</i> (99.59)/ <i>B. mexicanus</i> (99.54)/ <i>B. inaquosorum</i> (99.52)/ <i>B. stercoris</i> (99.52)/ <i>B. cabrialesii</i> subsp. <i>cabrialesii</i> (99.52)/ <i>B. vallismortis</i> (99.46)/ <i>B. atrophaeus</i> (99.39)/ <i>B. tequilensis</i> (99.39)/ <i>B. halotolerans</i> (99.39)/ <i>B. spizizenii</i> (99.39)/ <i>B. mojavensis</i> (99.32)	PQ284605 (1513)	NR	NA	NA
BF066/24** (CBAS1536)	Monitoramento ativo do ar	<i>Niallia taxi</i> (1,80)	<i>Bacillus taxi</i> (99,59)/ <i>B. nealsonii</i> (99.32)/ <i>B. circulans</i> (98.91)	PQ284620 (1507)	NR	NA	NA
BF067/24 (CBAS1537)	Monitoramento ativo do ar	Não identificado (1,80)	<i>Metabacillus idriensis</i> (99,72)	PQ043510 (1507)	NR	NA	<i>Metabacillus idriensis</i>
BF102/24** (CBAS147)	Validação de limpeza	<i>Niallia taxi</i> (1,99)	<i>Bacillus taxi</i> (99,45)/ <i>B. nealsonii</i> (98,96)	PV491508 (1474)	NR	NA	NA
BF103/24**	Validação de limpeza	<i>Niallia taxi</i> (1,90)	<i>Bacillus taxi</i> (99,66)/ <i>B. nealsonii</i> (99,38)/ <i>B. circulans</i> (98,90)	PV491510 (1486)	NR	NA	NA
BF104/24**	Matéria-prima	<i>Niallia taxi</i> (1,87)	<i>Bacillus taxi</i> (99,66)/ <i>B. nealsonii</i> (99,38)/ <i>B. circulans</i> (98,90)	PV492408 (1485)	NR	NA	NA
BF113/24**	Monitoramento ativo do ar	<i>Bacillus licheniformis</i> (1,76)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,79)/ <i>B. haynesii</i> (99,73)/ <i>B. sonorensis</i> (99,59)/ <i>B. paralicheniformis</i> (99,45)/ <i>B. glycinifermentans</i> (99,25)/ <i>swezeyi</i> (99,04)/ <i>B. changyiensis</i> (98,77)	PV492506 (1474)	NR	NA	NA

BF130/24**	Monitoramento ativo do ar	<i>Peribacillus muralis</i> (1,81)	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> (99,93)/ <i>P. simplex</i> (99,79)/ <i>P. muralis</i> (99,66)/ <i>P. butanolivorans</i> (99,59)	PV492508 (1476)	NR	NA	NA
BF136/24**	Monitoramento ativo do ar	<i>Bacillus licheniformis</i> (1,99)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,66), <i>haynesii</i> (99,59)/ <i>B. sonorensis</i> (99,46)/ <i>B. paralicheniformis</i> (99,32)/ <i>B. glycinifermentans</i> (99,12)/ <i>B. swezeyi</i> (98,91)	PZ053903 (1524)	NR	NA	NA
BF021/25**	Monitoramento ativo do ar	<i>Bacillus licheniformis</i> (1,89)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,38)/ <i>B. haynesii</i> (99,38)/ <i>B. sonorensis</i> (99,31)/ <i>B. paralicheniformis</i> (99,17)/ <i>B. glycinifermentans</i> (98,97)/ <i>B. swezeyi</i> (98,69)	PX712728 (1491)	NR	NA	NA
BF026/25**	Monitoramento ativo do ar	<i>Kocuria indica</i> (1,96)	<i>Bacillus licheniformis</i> (99,32)/ <i>B. haynesii</i> (99,25)/ <i>B. sonorensis</i> (99,12)/ <i>B. paralicheniformis</i> (98,98)/ <i>B. glycinifermentans</i> (98,78)	PZ048097 (1551)	NR	NA	NA

Legenda: CBAS – Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde; NCBI – National Center of Biotechnology Information; pb – pares de bases; NR – não realizado; NA – não aplicável; l – linhagem inserida na base de dados do MALDI Biotyper®; * – possível nova espécie, analisada por Caldeira *et al.* (2024), com resultado atualizado no presente estudo; ** – sequenciamento do gene *rpoB* pendente.

Fonte: Elaborada pelos autores (2026).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação de bactérias formadoras de esporos isoladas da cadeia produtiva da indústria farmacêutica continua sendo um desafio para os laboratórios microbiológicos, especialmente quando se trata de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* e grupos filogeneticamente relacionados. Neste estudo, foi possível observar que o MALDI Biotyper® apresentou limitações para a identificação das linhagens analisadas, evidenciando a necessidade de métodos complementares para obtenção de resultados mais precisos.

O sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu ampliar a capacidade de identificação das linhagens, porém também apresentou limitações na diferenciação de espécies filogeneticamente próximas. Nesse contexto, a análise do gene *rpoB* demonstrou maior poder discriminatório nas linhagens em que o sequenciamento foi obtido com êxito, possibilitando a identificação em nível de espécie e confirmando sua importância como marcador molecular complementar para estudos envolvendo *Bacillus* e gêneros relacionados.

Além disso, os resultados obtidos contribuíram para a caracterização da diversidade de bactérias formadoras de esporos presentes em ambientes farmacêuticos e forneceram informações relevantes para a expansão da biblioteca do MALDI Biotyper®. A incorporação de novas espécies ao banco de dados poderá aumentar a capacidade de identificação de isolados ambientais em análises futuras, fortalecendo a estratégia de controle de contaminação, a investigação de desvios e a avaliação de risco microbiológico na indústria farmacêutica.

Dessa forma, a abordagem polifásica empregada neste estudo mostrou-se uma estratégia eficiente para a identificação taxonômica de linhagens ambientais, contribuindo para o aprimoramento da rastreabilidade microbiológica e para a geração de conhecimento sobre bactérias formadoras de esporos de interesse industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Plataforma de Sequenciamento por Eletroforese Capilar- Metodologia Sanger - RPT01A - Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ. Maria Luiza S. G. Dacio e Pamella S. Silva agradecem ao suporte do CNPq em forma de Bolsa referente ao Programa Pibic/Fiocruz (Inscrição número 15262) e IC/Maré (Inscrição número 14422), respectivamente. Letícia S. Albuquerque e Maria Giovanna A. Ferreira agradecem ao suporte da Faperj em forma de Bolsas de Iniciação Tecnológica (Processos E-26/260.341/2022 e E-26/260.338/2023, respectivamente). Marcelo L. L. Brandão agradece ao suporte do CNPq em forma de Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ-C) (Processo: 304877/2024-7) e a Faperj em forma de Bolsa de Jovem Cientista do Nosso Estado (Processo: E-26/204.245/2025-BOLSA N.º de Matrícula:

2005.03225.2). Andressa S. S. Ferreira agradece ao suporte da Fiocruz em forma de Bolsa referente ao Programa de Pós-Doutorado Junior (Inscrição número 134).

REFERÊNCIAS

- BIVAND, J. M. *et al.* Broad-range amplification and sequencing of the *rpoB* gene: a novel assay for bacterial identification in clinical microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 62, n. 7, p. e00266-24, 2024.
- BOTTALE, A. J.; RIERA, L. M.; RABINOVITCH, L. Evaluación de la carga microbiológica ambiental en áreas destinadas a producción y control de vacunas. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 49, n. 1, p. 47-60, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira. 7. ed. Brasília: ANVISA, 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n.º 127, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Insumos e Medicamentos Biológicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 mar. 2022a. Edição 62, Seção 1, p. 350.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 mar. 2022b. Edição 62, Seção 1, p. 320.
- CALDEIRA, N. G. S. *et al.* Characterization by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing of aerobic endospore-forming bacteria isolated from pharmaceutical facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 724, 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12040724.
- CELANDRONI, F. *et al.* Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152831, 2016.
- COSTA, L. V. *et al.* Assessment of VITEK®2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 194, p. 106419, 2022a.
- COSTA, L. V. *et al.* *Bacillus lumedeiriae* sp. nov., a Gram-Positive, Spore-Forming Rod Isolated from a Pharmaceutical Facility Production Environment and Added to the MALDI Biotyper® Database. **Microorganisms**, v. 12, n. 12, p. 2507, 2024.
- COSTA, L. V. *et al.* MALDI-TOF MS database expansion for identification of *Bacillus* and related genera isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 203, p. 106625, 2022b.
- DEAL, A. *et al.* Cleaning and disinfection of *Bacillus cereus* biofilm. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 70, n. 3, p. 208-217, 2016.

DNASTAR. Lasergene SeqMan Pro. Version 7.0.0. Madison: DNASTAR Inc., 2006.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4: **European Union Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use**. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products. Brussels: EMA, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice**. Bethesda, MD: U.S. Food and Drug Administration, 2004.

GÖKER, M. *et al.* List of Recommended Names for bacteria of medical importance: report of the Ad Hoc Committee on Mitigating Changes in Prokaryotic Nomenclature. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 75, p. 6943, 2025.

GUPTA, R. S. *et al.* Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5753-5798, 2020.

JOHNSON, J. L. Similarity analysis of rRNAs. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.;

KI, J. S.; ZHANG, W.; QIAN, P. Y. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 1, p. 48-57, 2009.

KIM, M.; OH, H.-S.; PARK, S.-C.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 346-351, 2014.

KREMER, T.; PATEL, R. Correlation between Environmental Monitoring and Product Bioburden. **Biomed Instrum Technol**, v. 53, n. s2, p. 32-37, 2019.

LI, Q. *et al.* Leveraging whole-genome sequencing for microbial contamination tracking and risk assessment in pharmaceutical manufacturing. **Front. Microbiol**, v. 17, p. 1807989, 2026.

MATTOSO, J. M. V.; *et al.* Quantitative and qualitative evaluation of microorganism profile identified in bioburden analysis in a biopharmaceutical facility in Brazil: Criteria for classification and management of results. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 79, n. 2, p. 125-126, 2025.

MOHKAM, M. *et al.* Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* gene sequencing and RAPD-PCR. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 1, p. 8-18, 2016.

MIRANDA, R. V. S. L. De *et al.* Identification of *Sutcliffiella horikoshii* strains in an immunobiological pharmaceutical industry facility. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 5, p. ovad056, 2023.

NUNES RAMOS, J. *et al.* Challenges in the identification of environmental bacterial isolates from a pharmaceutical industry facility by 16S rRNA gene sequences. **DNA**, v. 5, n. 3, p. 33, 2025.

PACHECO, F. L. C.; PINTO, T. J. A. The bacterial diversity of pharmaceutical clean rooms analyzed by the fatty acid methyl ester technique. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 156-166, 2010.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406-438, 2020.

PEREIRA, P. P. *et al.* Polyphasic characterization and identification of the bioremediation agent *Bacillus* sp. SFC 500-1E. **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4525-4535, 2020.

POLZ, M. F.; COLLEEN, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3724-3730, 1998.

RAMOS, Victoria Bárbara de Almeida *et al.* Desenvolvimento de classificação da criticidade de bactérias em monitoramento ambiental de indústria farmacêutica de imunobiológicos. In: SIMPÓSIO DE BIOSSEGURANÇA E BIOPROTEÇÃO, 1.; SEMANA DA QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS, 11., 2024, Rio de Janeiro. **Anais [...]**. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz), 2024. 1 p.

SILVA-SANTANA, G.; DE SALES, F. L. S.; BRANDÃO, M. L. L. Laboratory strategies for the identification of *Burkholderia* species: from classical phenotyping to advanced genomic and proteomic approaches. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 119, n. 3, p. 59, 2026.

SONG, M. *et al.* A comprehensive technology strategy for microbiological identification in a pharmaceutical facility: a case study. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1327175, 2024.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **United States Pharmacopeia and National Formulary**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2024.

WATTS, J. L. *et al.* Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2372-2379, 2000.

WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 683-700.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. In: **WHO Expert Committee on Biological**

Standardization: Sixty-first Report. Geneva: World Health Organization, 2010. (WHO Technical Report Series, n. 978), p. 79-188.

YOON, S.-H. *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 2017.