

AValiação DO MÉTODo DE ESPALHAMENTO EM PLACA E DO BIOLAMINOTEST PARA QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*

Milena Yuki Rosental Sudo, Gabriel de Almeida Valentin, Erick José Nogueira de Andrade, Paula Macedo Gonçalves, Maiara Lima Castilho.

Laboratório de Bionanotecnologia. Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, milenarosental@gmail.com, gabriel.almeida.valentin@gmail.com, eriick.n.andrade@gmail.com, paula.yushiro@gmail.com, mcastilho@univap.br.

Resumo

O controle microbiológico é essencial na indústria alimentícia, química e ambiental para garantir a qualidade dos produtos e a segurança do consumidor. A escolha de métodos adequados de contagem bacteriana impacta diretamente na tomada de decisões, prevenção de contaminações e atendimento às normas sanitárias. Este estudo analisou a técnica tradicional de espalhamento em ágar com alça de Drigalski e o método alternativo Biolaminotest, utilizando *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que a técnica de espalhamento em placa apresentou maior precisão, estabilidade e menor desvio padrão, sendo mais indicada para análises quantitativas e rigorosas. Em contrapartida, o Biolaminotest se destacou pela praticidade e rapidez, mostrando-se útil para triagens preliminares em ambientes industriais, mas com elevada variação entre repetições. Conclui-se que, para análises que exijam resultados confiáveis e quantitativos, o método de espalhamento permanece sendo o mais indicado, ideal para avaliação da segurança alimentar, detecção de contaminações e validação das etapas industriais, enquanto o Biolaminotest pode ser aplicado em monitoramentos iniciais de campo.

Palavras-chave: Controle microbiológico. Qualidade industrial. Métodos laboratoriais.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

Na indústria, a contagem microbiológica é uma etapa crítica do controle de qualidade, uma vez que microrganismos patogênicos podem comprometer a segurança do produto, afetar a saúde pública e gerar perdas econômicas significativas (Mendes; Ribeiro, 2021). Dessa forma, a detecção de contaminação em processos relacionados à saúde é de fundamental importância. Setores como a indústria alimentícia, a indústria química e as análises ambientais, ainda que de forma indireta, exercem impacto direto sobre a saúde da população (Wang; Wu, 2024). Nesse contexto, a análise microbiológica representa um dos principais desafios no controle de qualidade.

A utilização de meios de cultura e de técnicas de detecção bacteriana é indispensável, permitindo identificar a presença de microrganismos, determinar sua espécie e, em alguns métodos, quantificar sua carga bacteriana (Gill, 2017). Essas informações são cruciais para que empresas adotem medidas preventivas, garantindo não apenas alimentos mais seguros, mas também processos químicos com menor risco de contaminação e a oferta de recursos ambientais em condições adequadas (Canciu et al., 2021).

Entre esses microrganismos, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) se destaca, por ser frequentemente associado a surtos de intoxicação alimentar devido à produção de enterotoxinas resistentes ao calor, podendo estar presente tanto em ambientes hospitalares quanto industriais e comunitários, tendo seu tratamento dificultado pela presença de cepas multirresistentes (Taylor & Unakal, 2023; Pagnocca & Sette, 2012).

A quantificação de microrganismos viáveis é geralmente realizada por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), permitindo avaliar a quantidade microbiana ativa presente em amostras de alimentos, superfícies, água e equipamentos industriais (Martini et al., 2024; Fernandes & Vieira, 2012). Métodos precisos são fundamentais, especialmente quando decisões sobre a liberação de lotes de produção ou o descarte de matérias-primas dependem desses resultados (Santos; Paganoto; Pinto, 2025). O método de espalhamento em placa é considerado um procedimento padrão

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

para a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), devido à sua simplicidade, reprodutibilidade e capacidade de proporcionar crescimento microbiano isolado e quantificável na superfície do meio de cultura. Essa técnica é amplamente empregada na quantificação de microrganismos viáveis por meio da determinação do número de UFC, utilizando-se frequentemente a alça de Drigalski — um instrumento em formato de 'Δ' que permite distribuir uniformemente o inóculo sobre o ágar. A aplicação da alça de Drigalski favorece o crescimento isolado e homogêneo das colônias, conferindo maior precisão e confiabilidade aos resultados, motivo pelo qual este método é considerado o padrão-ouro em procedimentos microbiológicos quantitativos (Sanders, 2012; Szermer-Olearnik *et al.*, 2014). No entanto, esse método demanda estrutura laboratorial completa, além de tempo e profissional qualificado (Takamune & Vieira, 2013).

O Biolaminotest oferece praticidade e rapidez na detecção microbiológica, sendo uma forma alternativa, a qual permite a aplicação direta em superfícies, água e alimentos. Ele contém duas superfícies seletivas, sendo uma para bactérias heterotróficas totais que originam colônias vermelhas e outra para fungos e leveduras que formam colônias bege, sem a necessidade de equipamentos sofisticados (Lanxess, 2013; Guimarães, 2021). Apesar da facilidade de uso, métodos rápidos como o Biolaminotest precisam ser avaliados quanto à sua confiabilidade, pois decisões equivocadas podem comprometer a qualidade dos produtos e a segurança do consumidor.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o método padrão de espalhamento em placa com alça de Drigalski e o método alternativo Biolaminotest para a quantificação de *Staphylococcus aureus*, um microrganismo presente em diversos produtos industriais, destacando as vantagens e limitações de cada técnica no contexto do controle microbiológico.

Metodologia

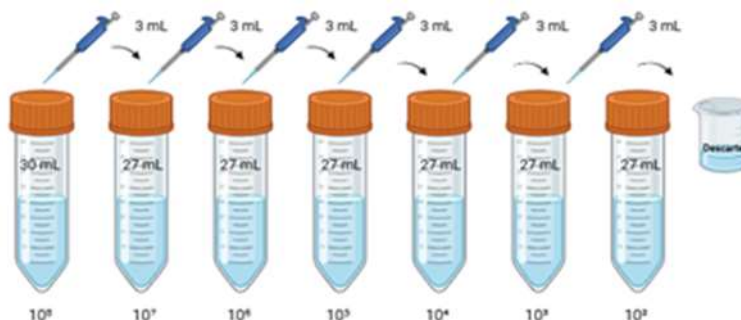
Cultura bacteriana

A cepa *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi®) por 24 horas. Em seguida, utilizando uma alça de platina previamente esterilizada, o inóculo foi repicado em meio Ágar Manitol Salgado (AMS) com o objetivo de verificar a pureza da cepa e excluir a possibilidade de contaminação. Após a confirmação, procedeu-se ao repique em meio Ágar Mueller-Hinton suplementado com sangue de cavalo, esse meio foi utilizado devido às suas características de enriquecimento, que favorecem a viabilidade e o crescimento adequado de *Staphylococcus aureus*, sem comprometer a integridade e o desenvolvimento das colônias empregando a técnica de semeadura por esgotamento. Embora não seja o meio tradicionalmente empregado, essa escolha visa garantir maior sensibilidade na detecção e contagem das colônias. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado com concentração 10^8 UFC/mL utilizando 30 mL de solução salina estéril 0,9% em tubo Falcon, contendo aproximadamente 10 colônias. A homogeneização foi feita em vórtex a cada nova colônia adicionada. Posteriormente, 1300 µL da solução foram medidos em turbidímetro Densichek (Biomérieux®) para padronização na escala 0,5 Mcfarland. A partir deste inóculo, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^3 e 10^2 UFC/mL, descartando-se 3 mL do último tubo, como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Procedimento de preparação do inóculo utilizando a técnica de diluição seriada.

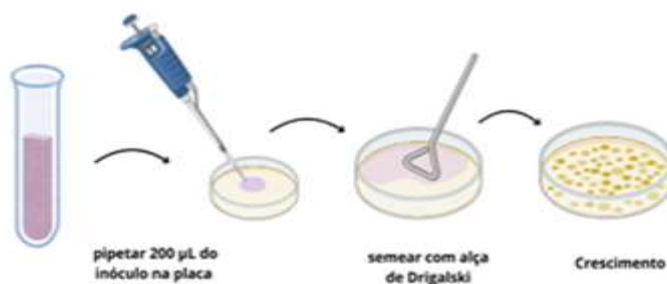


Fonte: Os autores, 2025.

Método de espalhamento em placa

Alíquotas de 200 μL das diluições 10^3 e 10^2 UFC/mL da cepa de *S. aureus* foram transferidas para placas contendo Ágar Mueller-Hinton com sangue de cavalo (Figura 2). O espalhamento foi feito com alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C , com fotografia após 24 horas e contagem de UFCs ao final do período. O experimento foi conduzido em duplicata e realizado em duas repetições independentes adicionais, com o objetivo de ampliar a confiabilidade dos dados.

Figura 2: Esquema representativo do método de espalhamento em placa de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Os autores, 2025.

Método Biolaminotest

As lâminas do Biolaminotest (IPEL®/Lanxess) foram imersas nos inóculos das concentrações 10^3 e 10^2 UFC/mL, assegurando cobertura completa das superfícies. Após homogeneização em vórtex, as lâminas permaneceram por 15 minutos nos tubos, sendo então drenadas e recolocadas nos recipientes originais. A incubação ocorreu a 37°C por 48 horas, com leituras realizadas a cada 24 horas. O experimento foi realizado em duplicata e reproduzido mais duas outras vezes, tendo o objetivo de ampliar a acurácia dos dados. Os resultados foram comparados com a escala padrão fornecida pelo guia de referência enviado pelo fornecedor do teste que indica como as lâminas devem se apresentar de acordo com as concentrações bacterianas previstas (Figura 3).

Figura 3: Gabarito de resultados do teste com a escala padrão do fabricante para concentrações bacterianas previstas.



Fonte: Alves, 2017.

Resultados

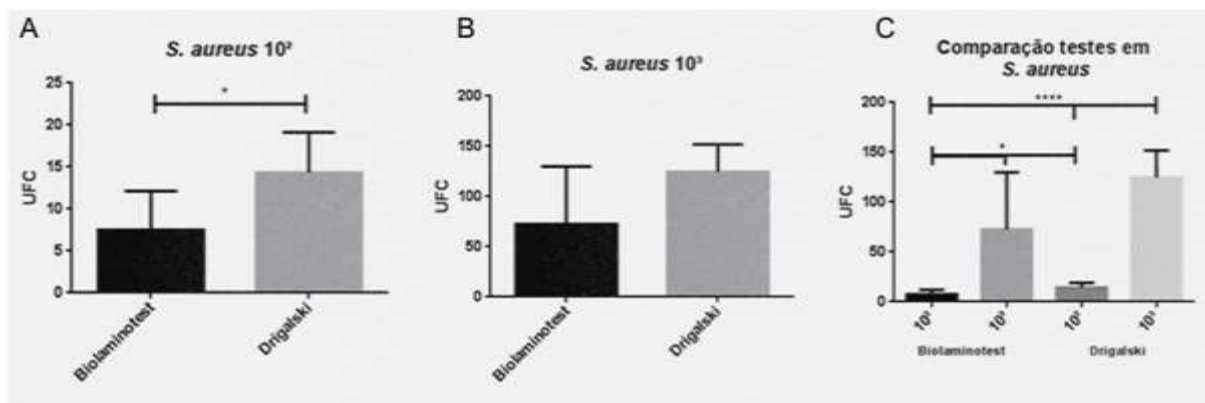
Os métodos avaliados apresentaram diferenças significativas, uma vez que o padrão-ouro (espalhamento em placa) e o Biolaminotest utilizam abordagens analíticas distintas. Na Figura 4, utilizando a concentração de 10^2 UFC/mL, o Biolaminotest apresentou variação semelhante à técnica de espalhamento, mas com maior desvio padrão, evidenciando menor precisão. Já na concentração de 10^3 UFC/mL, as diferenças entre os métodos foram ainda mais acentuadas, com o Biolaminotest exibindo inconsistências significativas.

A análise estatística revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os métodos, especialmente em concentrações elevadas, as discrepâncias do Biolaminotest são potencialmente problemáticas para

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

decisões críticas de controle de qualidade na indústria. Em contraste, a técnica de espalhamento em placa com alça de Drigalski apresentou resultados estáveis e reprodutíveis, confirmando sua adequação para análises quantitativas rigorosas.

Figura 4: Análise das concentrações bacterianas nos dois dispositivos. (A) *Staphylococcus aureus* diluído em 10^2 UFC/mL em Biolaminotest e espalhamento em placa. (B) *S. aureus* com carga bacteriana mais elevada entre utilizando o método de espalhamento e o Biolaminotest. (C) Comparação entre os concentrados dos dois métodos utilizados (* $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$, em comparação com o método de espalhamento).



Fonte: Os autores, 2025

Discussão

Na indústria alimentícia, química e até mesmo o setor ambiental precisam de rapidez na detecção de contaminações, uma vez que é essencial para prevenir surtos epidemiológicos, evitar perdas econômicas e problemas de saúde causadas por microrganismos. Neste contexto, o Biolaminotest atenderia a essa demanda, pois permite uma avaliação preliminar sem necessidade de equipamentos complexos, sendo ideal para triagens iniciais em linhas de produção ou inspeções de rotina. Entretanto, o estudo demonstrou que o Biolaminotest apresentou alto desvio padrão, indicando baixa reprodutibilidade, principalmente em concentrações mais elevadas de *S. aureus*. Esses resultados corroboram a literatura (Lanxess, 2013; Guimarães, 2021), que já aponta o Biolaminotest como um recurso de triagem, mas não como substituto de métodos convencionais em análises microbiológicas que exigem padrões regulatórios rigorosos, como os exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na indústria de alimentos.

Quando se trata de quantificação eficaz, precisa e confiável, especialmente em casos que envolvem identificação bacteriana detalhada ou liberação de lotes de produção, a técnica de espalhamento em placa com alça de Drigalski se mostrou superior, produzindo dados quantitativos e consistentes, de modo a proporcionar crescimento microbiano isolado e sem sobreposição de colônias, o que permite uma melhor identificação da cepa bacteriana juntamente com testes bioquímicos, garantindo uma maior precisão em tratamentos médicos e industriais sejam eles químicos, alimentícios ou ambientais (Sanders, 2012; Clark, 1967).

Embora não sejam métodos equivalentes o uso do dispositivo comercial Biolaminotest é recomendado em monitoramentos iniciais, enquanto a técnica de espalhamento em placa utilizando a alça de Drigalski deve ser empregada para confirmações quantitativas e qualitativas de decisões críticas no controle de qualidade.

Conclusão

A aplicação das técnicas de espalhamento em placa com alça de Drigalski e do Biolaminotest permitiu a quantificação de *Staphylococcus aureus* para o controle microbiológico. O método de espalhamento

em placa demonstrou elevada precisão, estabilidade e reprodutibilidade dos resultados, sendo indicado para análises laboratoriais que exigem maior rigor técnico, como nas etapas de validação de processos e controle de qualidade em ambientes regulados. Já o Biolaminotest apresentou-se como uma ferramenta prática e de fácil aplicação, especialmente útil em triagens iniciais, monitoramentos em campo uma vez que apresenta um desvio padrão elevado. No entanto, ambas as técnicas se mostraram relevantes dentro de suas finalidades, contribuindo para a segurança e eficiência das ações de vigilância microbiológica em contextos industriais.

Referências

ALVES, C. L. S. C. **Redução de Microorganismos na Massa do Papel Reciclado**. Universidade de Uberaba. 2017. Disponível em: <<https://dspace.uniube.br/bitstream/123456789/430/1/TCC%20-%20CINTIA.pdf>>. Acesso em: 2 mai. 2025.

CANCIU, A. *et al.* Modern Analytical Techniques for Detection of Bacteria in Surface and Wastewaters. **Sustainability**, v. 13, n. 13, p. 7229, 28 jun. 2021.

CLARK, D.S. Comparação dos métodos de vazamento e de placa de superfície para determinação de contagens bacterianas. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1409–1412, 1967.

FERNANDES, N. C. A.; VIEIRA, D. A. P. **Microbiologia Aplicada**. Disponível em: <https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/413/2018/12/04_microbiologia_aplicada.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2025.

GILL, A. The Importance of Bacterial Culture to Food Microbiology in the Age of Genomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 1 maio 2017.

GUIMARÃES, S. S. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO COSMÉTICA CONTENDO ARGILA BENTONITA**. Universidade federal do paraíba. 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/31827/1/SamanthaDaSilvaGuimar%C3%AAs_Dissert.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2025.

LANXESS. **QUALITY PROTECTS**. 2013. Disponível em: <https://lanxess.com/-/media/project/lanxess/corporate-internet/products-and-solutions/industries/microbial-control/tintas_port.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2025.

MARTINI, K. M. *et al.* **Maximum likelihood estimators for colony-forming units**. Microbiology spectrum, v. 12, n. 9, p. e0394623, 2024.

MENDES, A. M.; RIBEIRO, L. F. O controle microbiológico da qualidade de alimentos. **PubVet**, v. 15, n. 2, p. 1–10, 2021.

PAGNOCCA, F. C.; SETTE, L. D. **ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS**. Unesp/ Rio Claro. 2012. Disponível em: <<https://ib.rc.unesp.br/Home/Departamentos47/BioquimicaeMicrobiologia/aula2fernandomicro.doc>>. Acesso em: 9 mai. 2025.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 63, p. e3064, 2012.

SANTOS, E. R.; PAGANOTTO, F. S.; PINTO, E. V. A ATUAÇÃO DO PROFISSIONAL FARMACÊUTICO NO CONTROLE DA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS NO BRASIL. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 11, n. 6, p. 5124–5136, 2025.

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

SZERMER-OLEARNIK, B. *et al.* Comparison of microbiological and physicochemical methods for enumeration of microorganisms. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, v. 68, p. 1392–1396, 2014.

TAKAMUNE, L. F.; VIEIRA, D. C. M. **Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e método de espalhamento.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2013.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. **Staphylococcus aureus infection.** StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

WANG, L. WU, Z. A Simple High-Throughput Technology for Microorganism Detection and Quantitative Analysis. **Foods**, v. 13, n. 18, p. 2954, 18 set. 2024.