

# AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DE CEPA DE BACILLUS SUBTILIS SOB CONSERVAÇÃO REFRIGERADA: ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE PLAQUEAMENTO MICROBIANO

## VIABILITY ASSESSMENT OF BACILLUS SUBTILIS STRAINS UNDER REFRIGERATED STORAGE: A COMPARATIVE ANALYSIS OF MICROBIAL PLATING METHODS

Artigo recebido em: 16/1/2026

Artigo aceito em: 15/4/2026

**David Borovicz Carvalho da Silva de Jesus\***

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7564288500948998>

Orcid: <https://orcid.org/0009-0002-4765-4186>  
[david.engaqui@gmail.com](mailto:david.engaqui@gmail.com)

**Analice Timoteo de Araujo\***

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3154303920979373>

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3575-1694>  
[analice.t.araujo@gmail.com](mailto:analice.t.araujo@gmail.com)

**Pedro Rondon Werneck\***

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/5293699847807939>

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8729-5259>  
[prondonwerneck@gmail.com](mailto:prondonwerneck@gmail.com)

**Luci Emi Ogava\***

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/0436036942050569>

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4218-275X>  
[luci.ogava@gmail.com](mailto:luci.ogava@gmail.com)

**Aldi Feiden\***

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/8384358462664823>

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6823-9291>  
[aldifeiden@gmail.com](mailto:aldifeiden@gmail.com)

**Altevir Signor\***

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/4844380942902865>

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4659-6466>  
[altevir.signor@gmail.com](mailto:altevir.signor@gmail.com)

The authors declare that there is no conflict of interest



## Resumo

A manutenção e avaliação da viabilidade de cepas microbianas são desafios centrais em microbiologia, especialmente sob armazenamento refrigerado. Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos métodos Spread Plate e Streak Plate na quantificação viável de *Bacillus subtilis* após armazenamento a 4 °C. Foram realizadas diluições seriadas, aplicadas em ambos os métodos, com análise quantitativa da formação de colônias e observação microscópica após coloração de Gram. O Spread Plate proporcionou resultados mais precisos e reprodutíveis na contagem de unidades formadoras de colônia, enquanto o Streak Plate apresentou limitações quantitativas, menor sensibilidade e distribuição menos uniforme do inóculo. A coloração de Gram indicou coloração roxa-rosada, sugerindo bactéria gram-negativa, porém a presença de esporulação e endósporos esverdeados pode indicar gram-variabilidade devido a estresse térmico. A regressão linear entre os log<sub>10</sub> das contagens obtidas revelou  $R^2 = 0,89$ , demonstrando correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre os métodos. Entretanto, o teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que o Streak Plate subestima sistematicamente as unidades viáveis em relação ao Spread Plate, confirmando sua menor eficácia para análises quantitativas.

**Palavras-chave:** Microbiologia. Microbiano. Metodologia. Bacillus.

## Abstract

*The maintenance and evaluation of microbial strain viability are central challenges in microbiology, especially under refrigerated storage. This study aimed to compare the efficiency of the Spread Plate and Streak Plate methods in the viable quantification of Bacillus subtilis after storage at 4 °C. Serial dilutions were prepared and applied using both methods, followed by quantitative analysis of colony formation and microscopic observation after Gram staining. The Spread Plate method provided more precise and reproducible results in the counting of colony-forming units, whereas the Streak Plate method showed quantitative limitations, lower sensitivity, and a less uniform distribution of the initial inoculum. Gram staining indicated a purplish-pink coloration, suggesting a gram-negative bacterium; however, the presence of sporulation and greenish endospores may indicate gram variability due to thermal stress. Linear regression between the log<sub>10</sub> of the obtained counts yielded an  $R^2 = 0.89$ , demonstrating a positive and statistically significant correlation ( $p < 0.05$ ) between the methods. However, the Wilcoxon test showed a significant difference ( $p < 0.05$ ), indicating that the Streak Plate method systematically underestimates viable units compared with the Spread Plate method, confirming its lower effectiveness for quantitative analyses.*

**Keywords:** Microbiology. Microbial. Methodology. Bacillus.

## 1 INTRODUÇÃO

Em estudos envolvendo biologia de microrganismos, com o avanço da biotecnologia e ciência, laboratórios buscam aplicar técnicas de conservação de coleções microbiológicas, para diversas atividades de caráter didático e científico. Logo campos experimentais cujo interesse utilizam microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários, apresentam o desafio da manutenção e preservação destas coleções biológicas para uso em pesquisas e ensino (Amorim *et al.*, 2020; Sá; Silva, 2017; Sola *et al.*, 2012).

Em laboratórios de microbiologia, a preservação de culturas microbianas envolve a análise da sobrevivência, resistência e viabilidade de armazenamento, aliada à adoção de métodos que reduzam contaminações e variações de espécies (Sola *et al.*, 2012). O

conhecimento em fisiologia microbiana reforça a necessidade de manter linhagens puras em condições de cultivo adequadas e de utilizar meios seletivos para a detecção de colônias do microrganismo alvo (Riedel *et al.*, 2022; Cota; Alvim, 2018). A escassez de estudos metodológicos sobre conservação e manutenção reforça a importância de avaliar vantagens, limitações, custos e duração das técnicas de armazenamento, bem como de empregar métodos de contagem e determinação de viabilidade celular para validar protocolos técnicos (Lemos *et al.*, 2020).

Além da quantificação por plaqueamento, é fundamental diferenciar microrganismos para detectar contaminações e eventuais falhas de técnica. A coloração de Gram, proposta por Hans Christian Gram em 1882, permanece como ferramenta central para a distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, permitindo a observação de morfologia e organização celular por microscopia (Coico, 1997; Tripathi; Sapa, 2020; Paray *et al.*, 2023). Nesse contexto, *Bacillus subtilis*, bactéria Gram-positiva, não patogênica e formadora de esporos, destaca-se como importante modelo em microbiologia e biotecnologia, em virtude de sua ampla aplicação industrial e da elevada resistência conferida pelos esporos a condições adversas e ao armazenamento (Alves *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2024; Stülke *et al.*, 2023; Swarge *et al.*, 2020). Avaliar a viabilidade de cepas de *B. subtilis* sob diferentes condições de conservação, portanto, é fundamental para o planejamento e a execução de estudos microbiológicos.

O objetivo deste estudo foi analisar a viabilidade da cepa *Bacillus subtilis* sob condição de refrigeração a 4 °C, comparando a eficiência das técnicas de plaqueamento spread plate e streak plate na determinação de unidades formadoras de colônia (UFC). Foram conduzidas diluições seriadas, seguido de plaqueamento segundo cada metodologia, coloração de Gram e tratamento estatístico dos dados, com o propósito de verificar diferenças significativas entre os procedimentos e indicar qual técnica se mostra mais acurada e robusta para fins de quantificação microbiológica.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Microbiologia e as técnicas de plaqueamento**

A introdução da microbiologia no Brasil (século XIX – início do XX) foi marcada por conflitos técnicos e sociais (Carreta, 2006). Embora a medicina moderna avançasse,

as práticas microbiológicas inseridas na medicina experimental tiveram alcance limitado e não geraram consenso para fundamentar as atividades de saúde. O conhecimento microbiológico foi pouco aceito por profissionais e pela sociedade, revelando que a ciência não se desenvolve isoladamente e deixando lacunas a serem exploradas.

A microbiologia é um campo da biomedicina e da biotecnologia que busca compreender processos biológicos para aplicações tecnológicas e para o aperfeiçoamento de práticas em saúde (Sartori, 2023). Trata-se de uma área multidisciplinar, utilizada por diferentes campos do conhecimento como ferramenta conceitual e aplicada. Nesse sentido, Silva *et al.* (2023) destacam que a integração da microbiologia com metodologias ativas e educacionais amplia o desenvolvimento de habilidades científicas experimentais em pesquisa.

Bancos de microrganismos são cruciais para estudos microbiológicos e para assegurar o controle de qualidade em aplicações tecnológicas em saúde, ambiente, educação e agricultura (Oliveira *et al.*, 2006). Contudo, manter e caracterizar essas coleções implica custos elevados e demanda protocolos ajustados à infraestrutura laboratorial, o que dificulta a adoção de padrões técnicos de conservação (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Oliveira *et al.* (2006) apontam que técnicas de plaqueamento utilizadas para verificar a viabilidade de microrganismos apresentam limitações de cultivo e recuperação, relacionadas à composição dos meios de cultura e à ausência de protocolos específicos para cada microrganismo, o que pode gerar resultados equivocados. Apesar do grande número de estudos sobre técnicas microbiológicas, ainda são escassos os trabalhos que discutem as adversidades associadas às técnicas de viabilidade e plaqueamento.

A falta de padronização de protocolos de conservação dificulta a reprodutibilidade dos experimentos e a comparabilidade de resultados entre laboratórios. Variáveis como método de plaqueamento, temperatura, tempo de conservação e meio de cultura exigem controle rigoroso para garantir a viabilidade e a fidelidade das coleções biológicas (Cota; Alvim, 2018). Nesse contexto, estudos que comparam métodos e técnicas podem esclarecer discrepâncias de resultados entre laboratórios de microbiologia.

## 2.2 Caracterização de *Bacillus subtilis*

A *Bacillus subtilis* é uma bactéria com formato bastonete e denominada Gram – positiva, quando cultivada em meios de cultura adequados como Ágar nutriente, formam colônias circulares de morfologia rugosa espalhada, opacas, com colorações esbranquiçadas a ligeiramente amarelas e com bordas irregulares ramificadas (Hellany *et al.*, 2024; LU *et al.*, 2018).

A *Bacillus subtilis* é uma bactéria reconhecida por seus princípios probióticos seguros e confiáveis, não patogênica para uso humano e animal. A proteína ou polipeptídeo denominado bacteriocina é gerado durante o processo de desenvolvimento e reprodução desta bactéria. As bacteriocinas são um grupo de proteínas com atividades antimicrobianas que são secretados pela matriz extracelular durante o processo de metabolização de algumas bactérias. Essas proteínas são responsáveis por impedir o desenvolvimento de certos microrganismos (LU *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2008).

Atualmente, o processo de identificação de bactérias é realizado por métodos convencionais, como observações das características das colônias bacterianas, desde sua morfologia ou por meio de testes bioquímicos. Como destacado pelo estudo de LU *et al.*, 2018, embora os métodos convencionais consigam detectar a presença de bactérias e sua morfologia, cada vez mais patógenos se tornaram mais complexos, mudando desde seu código genético até mesmo suas características morfológicas, demandando então técnicas e métodos mais modernos de identificação.

## 2.3 Técnicas de isolamento e quantificação de microrganismos

Devido à elevada taxa de multiplicação, populações bacterianas podem atingir milhões ou bilhões de células em pouco tempo, o que torna indispensável a quantificação acurada de microrganismos em meios específicos, com base no conceito de unidade formadora de colônia (UFC), em que cada colônia visível é atribuída a uma célula viável (Owuama, 2015). A contagem padrão em placa é o método mais utilizado para quantificar células viáveis em meios líquidos, demandando diluições seriadas decimais em função das altas concentrações encontradas em culturas em caldo, etapa essencial para garantir precisão e reprodutibilidade das análises (Ugbogu, 2004).

Paralelamente, uma cultura é considerada pura ou axênica quando contém apenas uma espécie ou linhagem microbiana (Green, 2021; Okereke; Kanu, 2004). Como, na natureza, as bactérias geralmente se organizam em comunidades mistas, o isolamento de culturas puras é requisito para investigações confiáveis de parâmetros como crescimento, metabolismo e resistência antimicrobiana. Para esse fim, utilizam-se, sobretudo, as técnicas de spread plate, streak plate e pour plate, que dependem de condições assépticas rigorosas para evitar contaminações e garantir a qualidade dos resultados (Willey *et al.*, 2011; Ogado *et al.*, 2022).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Amostra

A amostra da cepa bacteriana *Bacillus subtilis*, foram obtidas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia - LEMBiotec, localizado no Campus Piúma do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES), em parceria com o grupo de pesquisa. As cepas foram estocadas em frascos âmbar esterilizados, acondicionadas em recipiente isotérmico e transportadas para o Laboratório de Qualidade de Alimentos - LQA, do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura – GEMAQ, onde foram devidamente armazenadas sob refrigeração a 4°C, para posteriormente ser submetida a análises de viabilidade bacteriana no laboratório de microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo, onde foram testadas duas metodologias de plaqueamento.

#### 3.2 Esterilização de materiais e meio de cultura

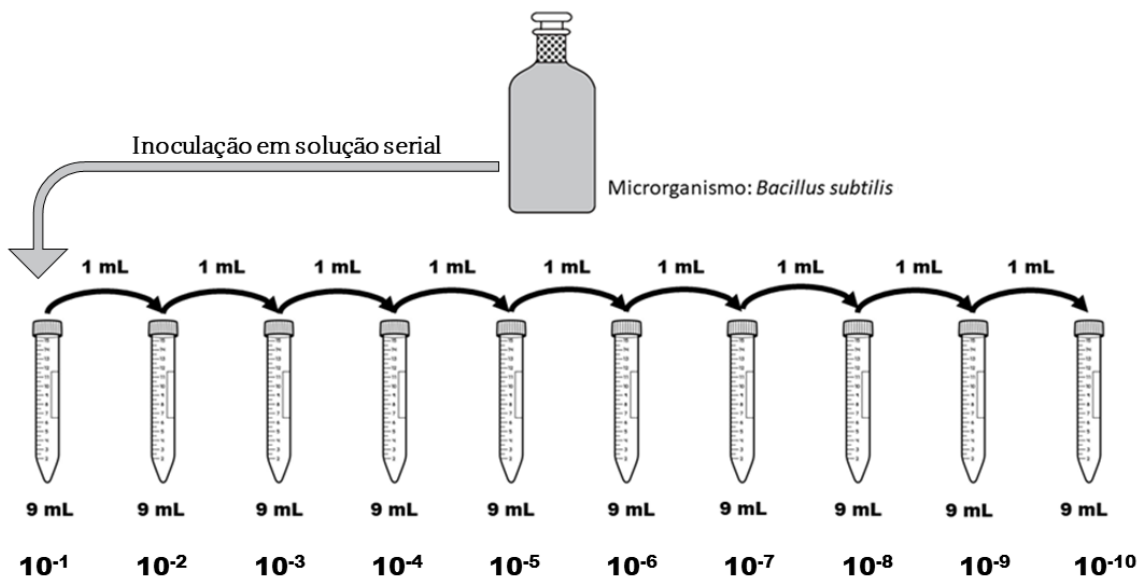
Todos os materiais utilizados nos ensaios foram esterilizados para garantir a integridade microbiológica das análises. O Ágar Nutriente, a solução salina (NaCl 0,85%) e as placas de Petri foram autoclavados a 121 °C, 15 psi, por 15 min, sendo as placas posteriormente secas em estufa a 60 °C. Os parâmetros de esterilização seguiram o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Salfinger *et al.*, 2015), assegurando a eliminação de contaminantes. Após a esterilização, os materiais

foram mantidos em capela de fluxo laminar previamente higienizada e submetida à luz UV por 15 min, antes do preparo dos inóculos bacterianos.

### 3.3 Preparo de amostras

O preparo das amostras e a realização de diluições seriadas em triplicata seguiram os protocolos do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Salfinger *et al.*, 2015), da *American Public Health Association (APHA)*, visando às análises de plaqueamento e viabilidade microbiana. Retirou-se 1 mL da cepa bacteriana e procederam-se diluições seriadas até  $10^{-10}$ , transferindo-se 1 mL para 9 mL de solução estéril de NaCl 0,85%, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1. Demonstração de procedimento de diluição seriada da cepa microbiana.

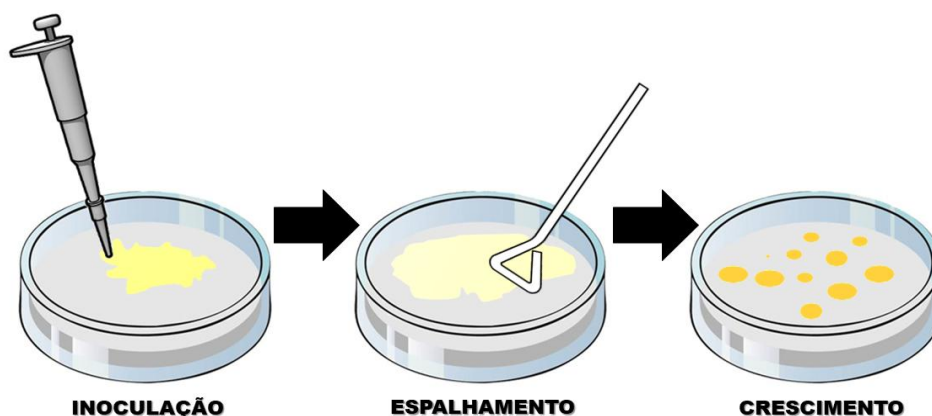


Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

### 3.4 Plaqueamento de microrganismos pelo método Spread Plate (espalhamento)

Para a realização da técnica de espalhamento (Spread Plate), inoculou-se 0,1 mL de cada diluição seriada da cepa bacteriana a ser quantificada sobre a superfície da placa de Petri contendo o meio de cultura Agar Nutrient, distribuindo-se o inóculo de forma homogênea com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril, a fim de evitar danos ao meio de cultura (Figura 2).

**Figura 2.** Representação do método de plaqueamento Spread Plate (espalhamento).

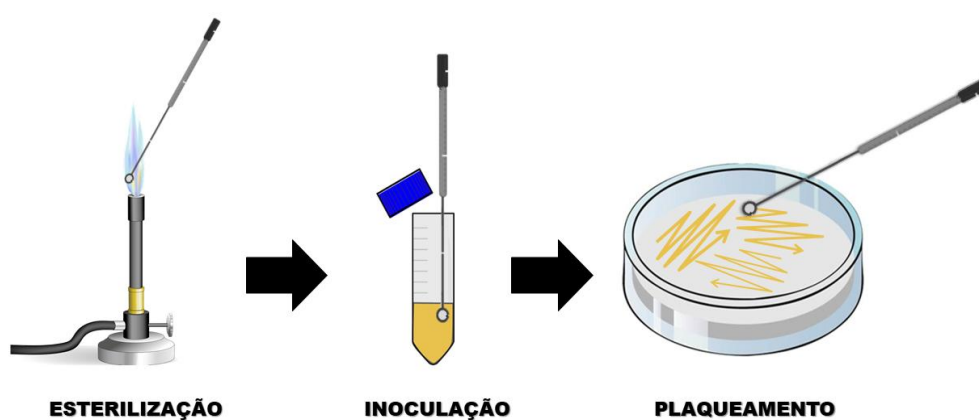


Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

### 3.5 Plaqueamento de microrganismos pelo método Streak plate (estriamento)

Para o isolamento e quantificação da cepa bacteriana, foram preparadas diluições seriadas decimais a partir das diluições seriadas. A partir dessas diluições, foram coletadas alíquotas específicas do volume de 0,1 mL, que foram submetidas ao processo de estriamento (Streak Plate) em placas contendo meio de cultura Agar Nutrient, utilizando-se alça de platina bacteriológica esterilizada. O estriamento consistiu na deposição e espalhamento da amostra sobre a superfície do meio de cultura, com movimentos cuidadosos e sequenciais, visando a quantificação e presença bacteriana (Figura 3).

**Figura 3.** Representação do método de plaqueamento Streak Plate (estriamento).



Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

### 3.6 Crescimento e contagem dos microrganismos

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, permitindo o crescimento adequado das colônias. Posteriormente, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas correspondentes às diluições de interesse, posteriormente calculado com base no volume da amostra as UFC/mL (Equação 1). O número final de bactérias por mililitro foi calculado com base na contagem de colônias visíveis, no volume inoculado e no respectivo fator de diluição (Monnerat *et al.*, 2020).

Equação 1:

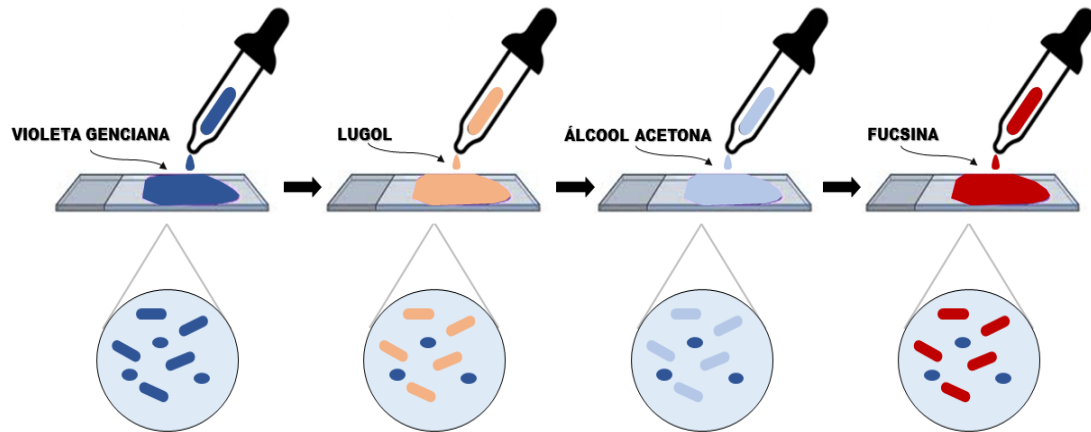
$$UFC/mL = \frac{\text{número de colônias na placa}}{\text{fator de diluição } (10^{-x})} \times \text{volume da amostra (mL)} \quad (1)$$

### 3.7 Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram foi conduzida de acordo com o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA). Inicialmente, preparou-se um esfregaço bacteriano fino em lâmina limpa e desengordurada, o qual foi seco ao ar. O material foi então corado com cristal violeta por 1 minuto e tratado com solução de Lugol por mais 1 minuto. Após a descoloração com álcool-acetona e lavagem com água destilada, aplicou-se fucsina por 30 segundos como corante de contraste, seguida de nova lavagem (Figura 4).

A lâmina foi então seca e examinada em microscópio óptico na objetiva de imersão de 100X, permitindo a diferenciação entre bactérias Gram-positivas, que retêm a coloração violeta, e Gram-negativas, que adquirem coloração avermelhada.

Figura 4. Representação da técnica de coloração de Gram para verificação de presença de bactérias gram – positivas e gram – negativas.



Fonte: Elaborada pelo próprios autores, 2026

### 3.8 Análise estatística dos dados

Os resultados foram submetidos à análise estatística inferencial, após transformação dos dados em escala logarítmica ( $\log_{10} x$ ) para normalizar as grandezas obtidas pelos diferentes métodos de contagem bacteriana. Em seguida, os metadados foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, utilizado para comparar amostras pareadas entre os métodos de plaqueamento na ausência de normalidade, considerando as contagens de UFC/mL nas mesmas diluições seriadas. Todas as análises foram realizadas no software RStudio, com uso do pacote ggplot2 para análise gráfica.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Plaqueamento por Spread Plate (espalhamento)

Os resultados obtidos pelo método de plaqueamento Spread Plate (espalhamento) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Unidades formadoras de colônias bacterianas da cepa *Bacillus subtilis* em placas pelo método de plaqueamento Spread Plate (espalhamento) após incubação em temperatura de 37°C por 24 horas.

SPREAD PLATE (ESPALHAMENTO) - NÚMERO DE COLÔNIAS										
DILUIÇÃO	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
NÚMERO	NC	NC	NC	NC	NC	NC	2	1	0	0
DE	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1	4	0	0
COLÔNIAS	NC	NC	NC	NC	152	8	4	0	0	0

NC – Não contável

Fonte: Elaborada pelo próprios autores, 2026

Na aplicação do método spread plate, com inoculação de 100 µL das diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup> em Ágar Nutriente, observou-se que as diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> resultaram em contagens não calculáveis (NC), em razão do crescimento confluentemente distribuído e da intensa sobreposição de colônias. Essa configuração inviabiliza a contagem acurada de UFC e ilustra uma limitação operacional do método em suspensões mais concentradas, assim como o relato de Mendes (2022) sobre os desafios de manipulação de diluições seriadas e os potenciais erros na avaliação da viabilidade de cepas microbianas.

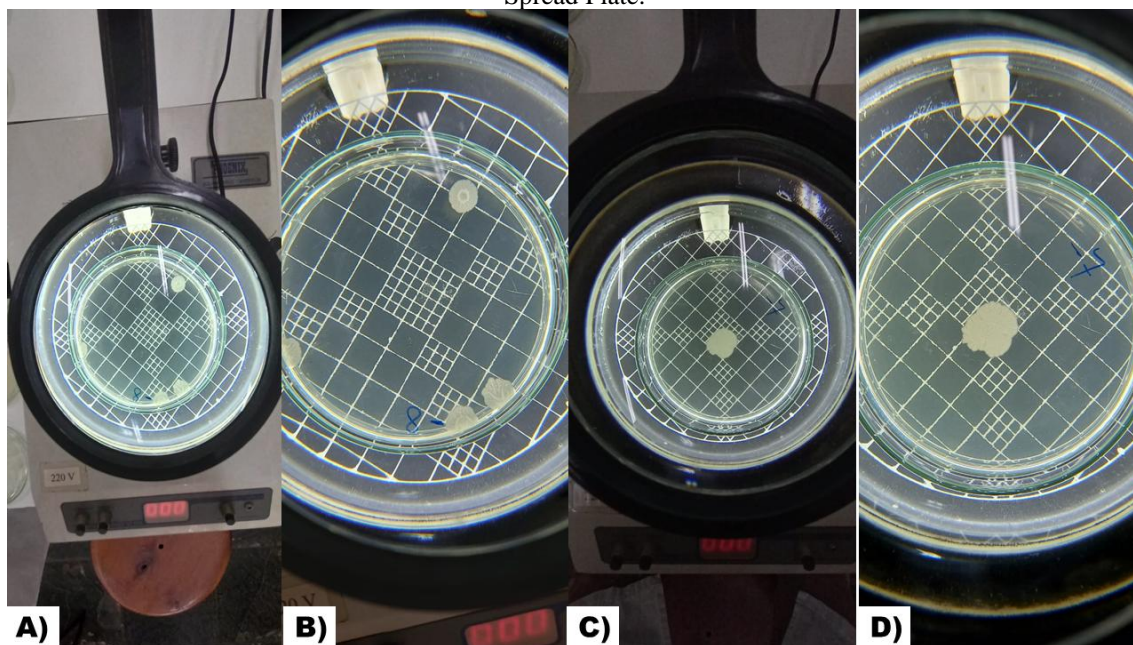
Na amostra diluída em 10<sup>-5</sup>, o resultado obtido foi de 152 unidades formadoras de colônia, apesar de a amostra ser em triplicata, as unidades bacterianas ainda tiveram sobreposição sobre o núcleo celular, utilizado para contabilizar uma unidade de colônia bacteriana, enquanto que uma amostra com diluição 10<sup>-6</sup>, obteve uma média de 8 unidades formadoras de colônia, assim como observado em diluições subsequentes 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-10</sup>, os resultados mostram uma diminuição na presença de colônias bacterianas isoladas.

No contexto da manutenção de culturas, os resultados obtidos reforçam que subcultivos seriados, apesar de amplamente empregados, apresentam limitações relevantes, como suscetibilidade à contaminação, necessidade de manipulação constante e potencial de deriva genética (Simione; Cypess, 2012). A comparação com métodos de conservação em baixas temperaturas indica que a estabilização celular por resfriamento, com interrupção das atividades metabólicas, oferece vantagens em termos de estabilidade e redução de intervenções (Simione; Sharp, 2017). Assim como destacado por Simione (2020), esses achados apontam que técnicas de armazenamento em baixas temperaturas constituem uma estratégia mais segura e eficiente para manter a viabilidade de diferentes tipos de células e microrganismos.

O método spread plate demonstrou ser eficaz para a contagem de microrganismos viáveis, por favorecer a formação de colônias isoladas na superfície do ágar (Figura 5). Essa característica o torna particularmente útil para o isolamento de colônias individuais, que podem ser posteriormente utilizadas em diferentes ensaios microbiológicos.

Conforme descrito por Sanders (2012), essa técnica é amplamente aplicada em enriquecimento seletivo, seleção de variantes e triagens, viabilizando a recuperação de células de interesse para análises mais detalhadas.

Figura 5. Placa com crescimento bacteriano da cepa *Bacillus subtilis* contendo amostra em diluição seriada em  $10^{-8}$  (A e B). Placa com crescimento bacteriano da cepa *Bacillus subtilis* em placa contendo amostra em diluição seriada  $10^{-7}$  (C e D), incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas pelo método de plaqueamento Spread Plate.



Fonte: Acervo pessoal dos autores, 2026

#### 4.2 Plaqueamento por Streak Plate (estriamento)

Os resultados obtidos pelo método de plaqueamento Streak Plate (espalhamento) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Unidades formadoras de colônias bacterianas da cepa *Bacillus subtilis* em placas pelo método de plaqueamento Streak Plate (estriamento) após incubação em temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

STREAK PLATE (ESTRIAMENTO)										
DILUIÇÃO	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$
NÚMERO	NC	NC	NC	NC	15	8	1	1	0	ER
DE	NC	NC	NC	NC	ER	1	0	1	0	0
COLÔNIAS	NC	NC	NC	24	7	5	2	0	0	0

NC – Não contável

ER – Erro de plaqueamento

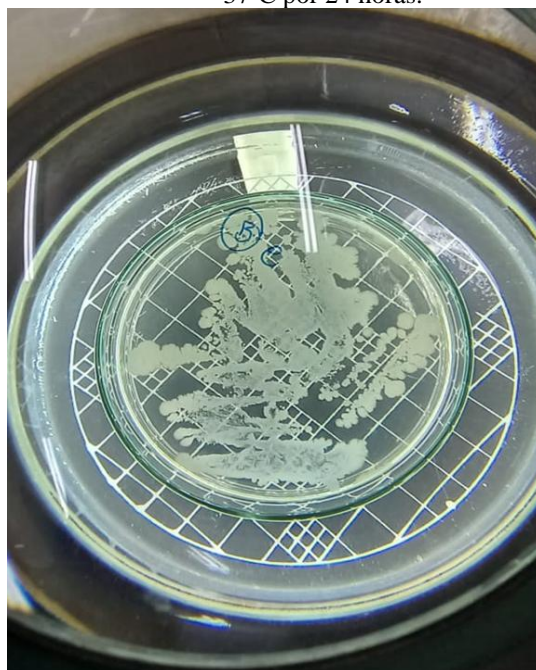
Fonte: Elaborada pelo próprios autores, 2026

No presente estudo, o método streak plate possibilitou contagem e visualização adequadas de colônias a partir da diluição  $10^{-4}$ , confirmando sua eficiência para obtenção

de colônias isoladas em faixas de concentração intermediária, em consonância com o protocolo descrito por Katz (2008). Em diluições mais elevadas ( $10^{-7}$ ), observou-se queda acentuada no número de colônias, indicando que a baixa densidade celular limita a detecção de crescimento, o que evidencia a dependência do método em relação à concentração inicial da amostra. Esse resultado ressalta que, embora consolidado, o streak plate é sensível a variações de concentração, a falhas de esterilização dos instrumentos e ao tempo de execução das estrias, fatores que podem impactar a avaliação de viabilidade microbiana.

Adicionalmente, foram registradas colônias filamentosas e aglomerados densos com ramificações extensas, dificultando a contagem e o isolamento de colônias puras, achado que corrobora os relatos de Katz (2008). De forma semelhante ao observado por Zipkes *et al.* (1981), houve tendência de maior crescimento nas bordas das placas, prejudicando a análise morfológica e a quantificação de colônias (Figura 6). Apesar dessas limitações, o método se manteve vantajoso para fins de identificação e seleção de colônias para posterior isolamento.

Figura 6. Placa com crescimento bacteriano da cepa *Bacillus subtilis* pelo método de plaqueamento Streak Plate (estriamento) contendo amostra em diluição seriada  $10^{-3}$  incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.



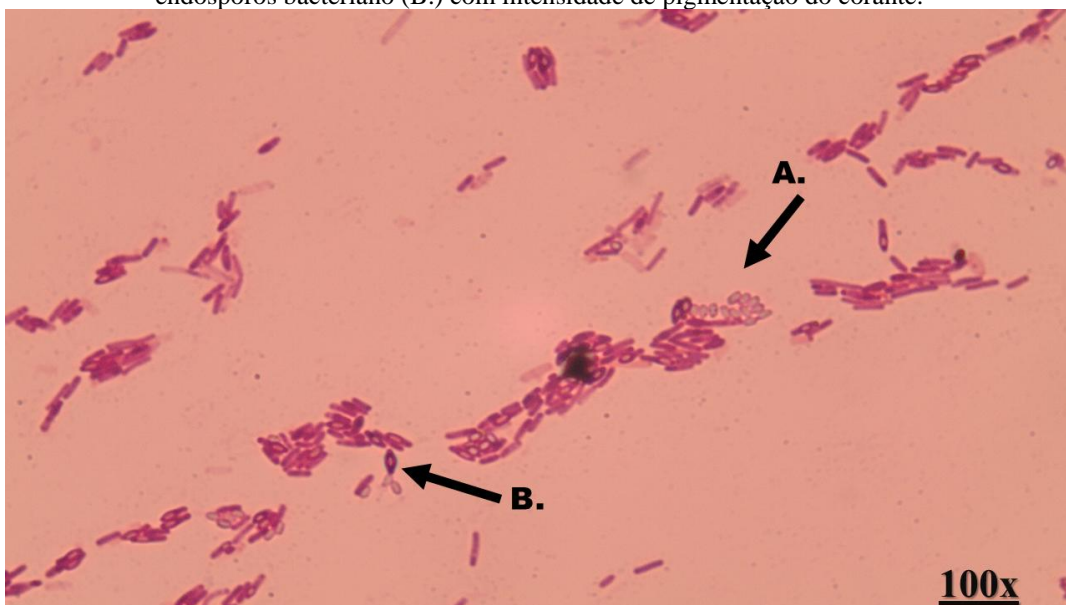
Fonte: Acervo pessoal dos autores, 2026

### 4.3 Coloração de Gram e análise óptica

Embora *B. subtilis* seja tradicionalmente classificada como Gram-positiva, devido à sua parede celular espessa e rica em peptidoglicano (Akinsemolu *et al.*, 2024), há relatos de que a formação de esporos pode resultar em padrões de coloração Gram-variáveis, por vezes semelhantes a Gram-negativos (Chęcinska *et al.*, 2015; Kim; Schumann, 2009; Nicholson, 2002; Nicholson *et al.*, 2000, 2002). No presente estudo, a coloração obtida (Figura 7) mostrou predominância de roxo com áreas rosadas, sugerindo um perfil Gram-negativo, ao mesmo tempo em que a microscopia evidenciou esporulação e endósporos compatíveis com *B. subtilis*. Essa discrepância pode estar relacionada a estresse térmico durante o armazenamento, com reflexos sobre a estabilidade da parede celular e o processo de esporulação (Price, 2014; Setlow, 2014).

Esses resultados ilustram as limitações interpretativas da coloração de Gram, que, embora seja ferramenta fundamental na rotina microbiológica, pode apresentar ambiguidades em organismos com paredes intermediárias ou em condições de estresse (Costa *et al.*, 2024). Como descrito por Beveridge (2001), a distinção entre Gram-positivas e Gram-negativas baseia-se na estrutura da parede celular, mas padrões atípicos de coloração exigem análise cuidadosa e, idealmente, confirmação por métodos complementares.

Figura 7. Coloração de Gram da cepa de *Bacillus subtilis* apresentando fixação do corante fucsina (cor avermelhada/roxa), com presença de esporos bacterianos (A.) com falta de pigmentação, e formação de endósporos bacteriano (B.) com intensidade de pigmentação do corante.

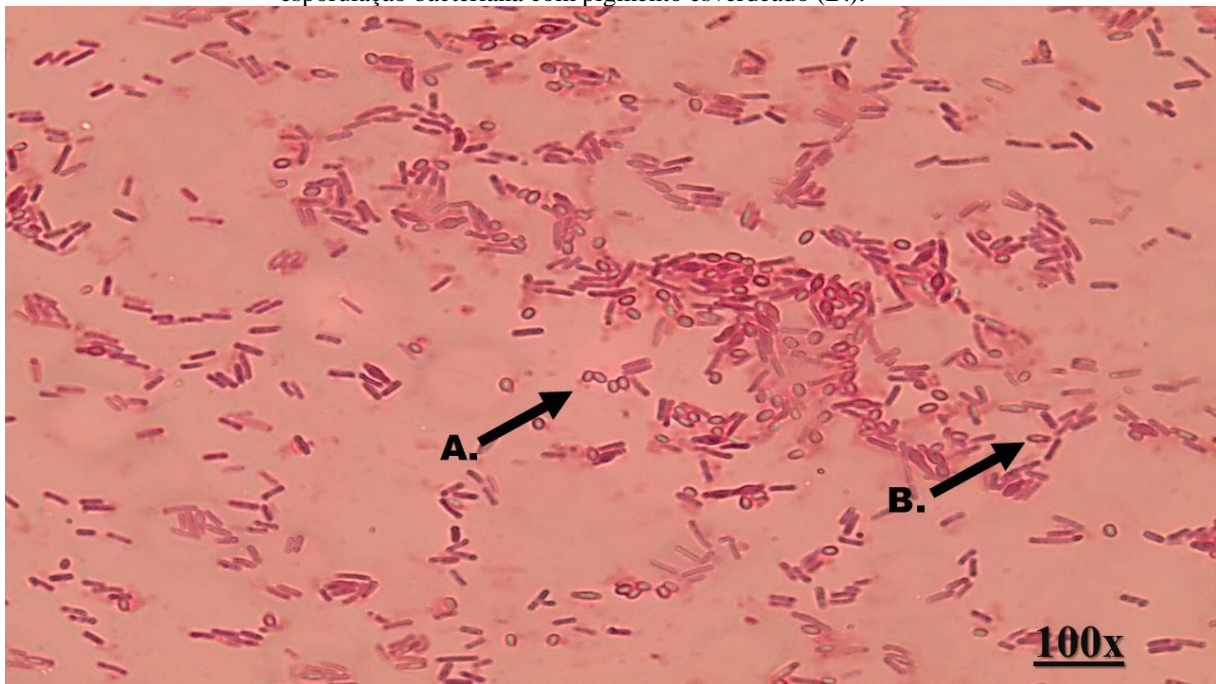


Fonte: Acervo pessoal dos autores, 2026

A microscopia óptica permitiu identificar esporulação em *B. subtilis*, indicada pela coloração esverdeada dos esporos (Figura 8). Tal observação está alinhada com a “Gram-variabilidade” descrita por Beveridge (1990), atribuída a modificações na parede celular e à redução da camada de peptidoglicano, que prejudicam a retenção do cristal violeta e originam misturas de células Gram-positivas e Gram-negativas.

Em consonância com Beveridge (2001), os resultados sugerem que regiões de septação apresentam maior fragilidade, podendo sofrer ruptura e liberar o complexo corante, fenômeno conhecido como “blow-out”. Isso contribui para padrões de coloração inconsistentes e ressalta a limitação da coloração de Gram como único parâmetro para classificação e diagnóstico em *Bacillus* e outras Gram-positivas.

Figura 8. Coloração de Gram da cepa de *Bacillus subtilis* apresentando fixação do corante fucsina (cor avermelhada), com presença de pigmentação esverdeada de esporos da cepa bacteriana (A.), e esporulação bacteriana com pigmento esverdeado (B.).



Fonte: Acervo pessoal dos autores, 2026

Dessa forma, a Gram-variabilidade em *Bacillus* pode estar relacionada à dinâmica da parede celular durante o crescimento e à sua integridade estrutural, evidenciando que a resposta ao Gram não é fixa e pode variar de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo ou mesmo da cepa microbiana. Tais achados reforçam a necessidade de utilização de métodos complementares para a identificação bacteriana em casos de coloração variável.

#### 4.4 Unidade formadora de colônia (UFC/mL)

A quantificação da cepa de *B.subtillis* submetido a diferentes métodos de plaqueamento demonstrou variações significativas na contagem de unidades formadoras de colônias por volume de amostra (UFC/mL), em função da técnica empregada e da diluição analisada, conforme demonstrada na tabela 3.

Tabela 3. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da cepa *Bacillus subtilis* pelos métodos de plaqueamento Spread Plate e Streak Plate.

UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC/ML) - SPREAD PLATE									
DILUIÇÃO									
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
-	-	-	-	1,52 x 10 <sup>8</sup>	8,00 x 10 <sup>7</sup>	2,33 x 10 <sup>8</sup>	1,67 x 10 <sup>9</sup>	-	-
UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC/ML) - STREAK PLATE									
DILUIÇÃO									
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
-	-	-	2,40 x 10 <sup>5</sup>	1,10 x 10 <sup>5</sup>	4,67 x 10 <sup>5</sup>	1,00 x 10 <sup>6</sup>	6,67 x 10 <sup>6</sup>	-	-

(-) Resultado não encontrado

Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

Pelo método spread plate, as contagens apresentaram variação entre diluições, mas preservando a mesma ordem de grandeza, o que indica consistência na diluição seriada e no crescimento microbiano. A elevada sensibilidade observada, inclusive em diluições mais altas, corrobora seu uso como técnica quantitativa de referência, conforme Reasoner (2004). Quando o método streak plate foi adaptado para quantificação, os resultados mostraram valores sistematicamente menores que os obtidos pelo spread plate, ainda que internamente coerentes. Tal padrão está de acordo com Taylor *et al.* (1983), que apontam maior variabilidade e tendência a contagens iguais ou inferiores em comparação a outros métodos de plaqueamento.

A análise comparativa mostrou que as diferenças nas contagens entre spread plate e streak plate decorrem principalmente da forma de distribuição do inóculo: o espalhamento gera colônias mais homoganeamente distribuídas e facilmente quantificáveis, enquanto o estriamento concentra o crescimento em traços, favorecendo sobreposição em determinadas regiões da placa.

Embora a refrigeração não tenha impedido a recuperação de células viáveis em nenhum dos métodos, o spread plate demonstrou maior sensibilidade para captar variações de densidade celular em diluições sucessivas. Já o streak plate apresentou comportamento menos previsível, com contagens que aumentaram com a diluição,

indicando dificuldade em padronizar a distribuição do inóculo e em obter estimativas precisas de UFC/mL. De acordo com Sutton (2012), esses resultados reforçam a necessidade de empregar mais de um método de plaqueamento e réplicas experimentais para reduzir vieses e aprimorar a confiabilidade das análises microbiológicas.

#### 4.5 Análise dos metadados e Teste Wilcoxon

A análise quantitativa das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *Bacillus subtilis*, obtidas pelos métodos Spread Plate e Streak Plate, revelou diferenças significativas em suas contagens ao longo das diluições avaliadas ( $10^{-4}$  a  $10^{-8}$ ). Inicialmente, os valores brutos de UFC/mL evidenciaram que o método Spread Plate apresentou contagens significativamente superiores (na ordem de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/mL) em comparação ao método Streak Plate, cujos valores oscilaram entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL.

A adoção da transformação  $\log_{10}(x)$  para os dados de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), foi aplicada com intuito de normalizar a distribuição de dados assimétricos e dispersos, facilitando a análise estatística inferencial e a comparação entre os métodos Spread Plate e Streak Plate (Tabela 4). Devido à necessidade de atender aos requisitos dos testes estatísticos paramétricos, particularmente no que tange à normalidade dos dados, assim como aplicado no estudo de comparação de técnicas de plaqueamento de (Cao *et al.*, 2024), possibilitando melhor interpretação dos resultados dos métodos avaliados.

Tabela 4. Valores de escala logarítmica ( $\log_{10}$ ) para normalização de dados de contagem em unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *Bacillus subtilis* obtidos por dois métodos diferentes de plaqueamento: Spread Plate (espalhamento) e Streak Plate (estriamento) nas mesmas diluições seriais.

Diluição	Spread Plate ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Streak Plate ( $\log_{10}$ UFC/mL)
$10^{-5}$	$\log_{10}(1,52 \times 10^8) = 8,18$	$\log_{10}(2,40 \times 10^5) = 5,38$
$10^{-6}$	$\log_{10}(8,00 \times 10^7) = 7,90$	$\log_{10}(1,10 \times 10^5) = 5,04$
$10^{-7}$	$\log_{10}(2,33 \times 10^8) = 8,37$	$\log_{10}(4,67 \times 10^5) = 5,67$
$10^{-8}$	$\log_{10}(1,67 \times 10^9) = 9,22$	$\log_{10}(1,00 \times 10^6) = 6,00$

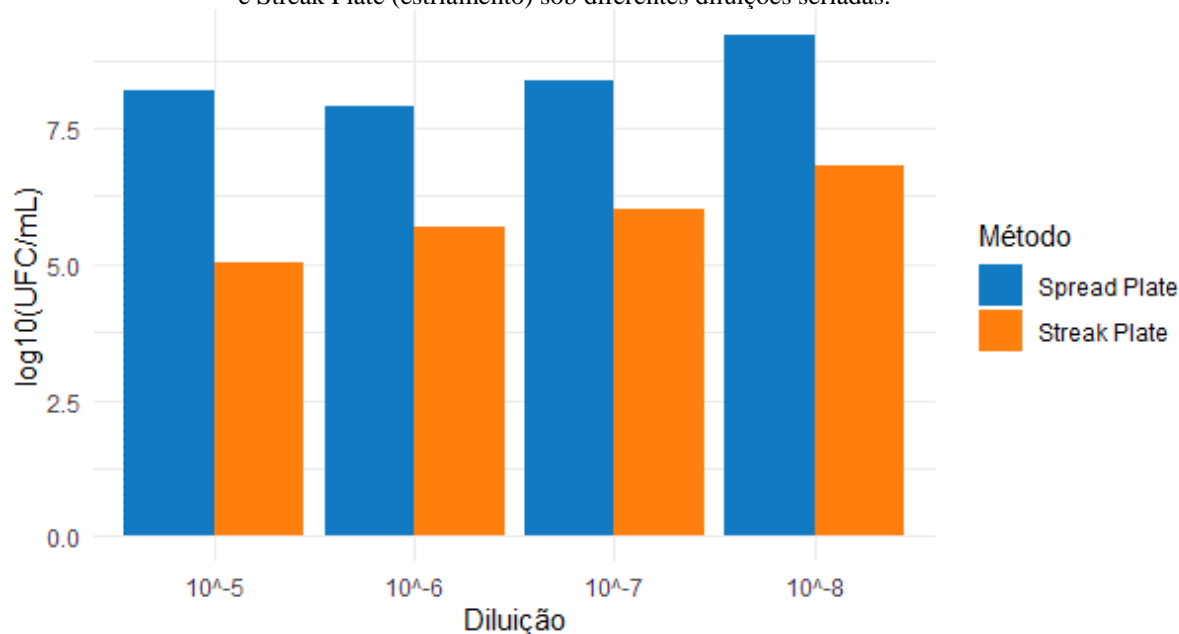
Transformação em  $\log_{10}(x)$ ;  
( $x$ ) = UFC/mL

Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

Dados de UFC/mL frequentemente exibem distribuição exponencial, com dispersão acentuada e valores extremos que podem influenciar negativamente a análise comparativa entre técnicas. Essa associação indica que, apesar das diferenças quantitativas apresentadas pelos métodos, ambos apresentam tendência linear na

quantificação da viabilidade bacteriana de *Bacillus subtilis* após armazenamento sob refrigeração conforme demonstrado na figura 9.

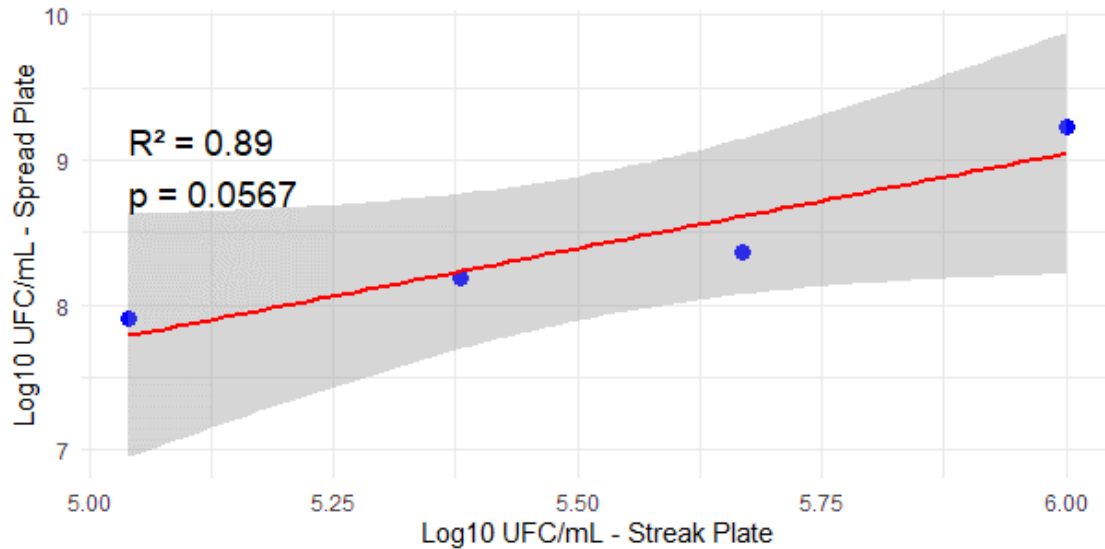
Figura 9. Gráfico comparativo de valores de log (x) de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da cepa *Bacillus subtilis* submetidas a métodos de plaqueamento Spread Plate (espalhamento) e Streak Plate (estriamento) sob diferentes diluições seriadas.



Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

A transformação logarítmica  $\log_{10}(x)$  dos dados foi aplicada para normalização e estabilização da variância entre os metadados, permitindo uma análise estatística mais robusta. A regressão linear entre os valores de log-transformados, demonstrou uma correlação positiva e significativa entre os métodos ( $R^2 = [0,89]$ ,  $p < 0,05$ ), conforme demonstrado na figura 10, indicando que, embora os métodos estejam relacionados, apresentam diferenças sistemáticas na quantificação da cepa bacteriana.

Figura 10. Análise de regressão linear de valores de log (x) de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da cepa de *Bacillus subtilis* submetidas a métodos de plaqueamento Spread Plate (espalhamento) e Streak Plate (estriamento),  $R^2 = [0,89]$  -  $p < 0,05$ .



Fonte: Elaborada pelos próprios autores, 2026

O teste não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados corroborou a existência de diferença estatisticamente significativa entre as contagens log-transformadas de UFC/mL obtidas pelos métodos ( $p = [0,0567]$ ), evidenciando que o método Streak Plate tende a continuamente subestimar as unidades viáveis de células bacterianas em relação ao método Spread Plate.

Considerando essas diferenças, a superioridade do Spread Plate se justifica pela natureza das técnicas que consiste no espalhamento uniforme do inóculo e homogeneidade na formação das colônias, enquanto que pelos aspectos limitados do método de estriamento pela técnica de distribuição, há uma adjacência na formação de colônias pelo método Streak Plate. Portanto, recomenda-se o uso do método Spread Plate para mensuração e viabilidade celular de *Bacillus subtilis* em amostras submetidas a diferentes condições de armazenamento, enquanto o Streak Plate permanece mais indicado para isolamento e análises qualitativas.

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se, que embora ambos os métodos empregados tenham possibilitado a detecção de células viáveis de *Bacillus subtilis* após armazenamento sob refrigeração, o método de espalhamento em superfície (Spread Plate) apresentou maior eficiência e consistência na quantificação das unidades formadoras de colônias em diferentes

diluições. O método de estriamento (Streak Plate), apesar de fornecer contagens coerentes, evidenciou valores significativamente inferiores, confirmando sua limitação como técnica quantitativa. Dessa forma, o presente estudo reforça a aplicabilidade do Spread Plate como método de referência para análises microbiológicas quantitativas, enquanto o Streak Plate deve ser preferencialmente empregado em abordagens qualitativas, como o isolamento de colônias.

Considerando que os dados oriundos da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) apresentam elevada variabilidade e extensão em escala crescente, a transformação  $\log_{10}(x)$  foi empregada para estabilizar variâncias e adequar a distribuição dos dados para análises comparativas. Essa transformação dos metadados permitiu que diferenças relativas menores e maiores sejam analisadas de forma proporcional, facilitando a detecção de tendências e relações lineares entre métodos distintos de plaqueamento. Neste estudo, a transformação foi crucial para possibilitar um confronto justo entre o Spread Plate e o Streak Plate, sem prejudicar a natureza dos dados para validade estatística da comparação.

Como perspectiva futura, recomenda-se a replicação deste estudo com diferentes espécies bacterianas e sob distintas condições de armazenamento, a fim de avaliar a robustez metodológica frente a diferentes contextos microbiológicos. Além disso, comparação com métodos alternativos, como Pour plate ou técnicas baseadas em contagem automatizada, podem fornecer maior embasamento sobre a acurácia e reprodutibilidade de cada técnica. Tais investigações poderão contribuir para a padronização de protocolos laboratoriais, ampliando a confiabilidade dos resultados obtidos em pesquisas aplicadas e industriais.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelo fomento financeiro concedido através de bolsas de estudo para o Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca (PREP), que possibilitou a aquisição de materiais e a realização do trabalho da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- AKINSEMOLU, Adenike A. *et al.* Exploring *Bacillus subtilis* : Ecology, biotechnological applications, and future prospects. **Journal of Basic Microbiology**, v. 64, n. 6, 20 jun. 2024.
- ALVES, Kessia Caroline Souza *et al.* *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 15–23, 2018.
- AMORIM, Carolina Ferreira; OLIVEIRA, Ana Carolina Santana de; COSTA, Emanuela Avelar Silva. Construção de bacterioteca em instituição de ensino superior para fins didáticos e de pesquisa. **Research, Society and Development**, 16 ago. 2020.
- BEVERIDGE, T. J. Mechanism of gram variability in select bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 3, p. 1609–1620, mar. 1990.
- BEVERIDGE, TJ. Use of the Gram stain in microbiology. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 76, n. 3, p. 111–118, 12 jan. 2001.
- CAO, Xiongjing *et al.* Comparing the Effects of Two Culture Methods to Determine the Total Heterotrophic Bacterial Colony Count in Hospital Purified Water. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 14, n. 1, p. 184–192, 15 fev. 2024.
- CARRETA, Jorge Augusto. **O micróbio é o inimigo” : debates sobre a microbiologia no Brasil (1885-1904)**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- CHECINSKA, Aleksandra; PASZCZYNSKI, Andrzej; BURBANK, Malcolm. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 351–369, 10 abr. 2015.
- COICO, Richard. Gram Staining. **Current Protocols in Immunology**, v. 23, n. 1, set. 1997.
- COSTA, Renata Garcia; ESTEVES, Wagner Thadeu Cardoso; NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha. Principais métodos clássicos de coloração em bacteriologia: aplicações, técnicas, fundamentos e limitações. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 56, n. 3, p. 183–196, 2024.
- COTA, Ana Lúcia Soares; ALVIM, Ronaldo Gomes. Effect of storage temperature on *Streptococcus mutans* viability. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, n. 2, p. 74–78, 23 abr. 2018.
- DE OLIVEIRA, Valéria Maia; SETTE, Lara Durães; FANTINATTI-GARBOGGINI, Fabiana. Preservação e prospecção de recursos microbianos. 2006.
- GREEN, Lorrence H. Culturing and preserving microorganisms. In: *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 2021. p. 37–40.
- HELLANY, Heba *et al.* Isolation and Characterization of *Bacillus Subtilis* BSP1 from Soil: Antimicrobial Activity and Optimization of Fermentation Conditions. **Processes**, v. 12, n. 8, p. 1621, 2 ago. 2024.

HUGENHOLTZ, Philip; GOEBEL, Brett M.; PACE, Norman R. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765–4774, 15 set. 1998.

KATZ, D. Sue. The streak plate protocol. **Microbe Library**, p. 1–14, 2008.

KIM, Junehyung; SCHUMANN, Wolfgang. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 19, p. 3127–3136, 25 out. 2009.

LEMOS, Michelle Andrade; GHISLENI, Daniela Dal Molim; DE JESUS ANDREOLI PINTO, Terezinha. Validation of Alternative Microbiological Method in Non-sterile Pharmaceutical Product Through the Reference Strains and Productive Environment Bioburden. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 15, n. 4, p. 641–650, 6 dez. 2020.

LU, Zhenxiang; GUO, Weina; LIU, Chang. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*; **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 3, p. 427–433, 2018.

LUO, X. Z. *et al.* Physical and chemical properties and antimicrobial spectrum of subtilin from *Bacillus subtilis* FB123. **J. Microbiol**, v. 28, p. 64–67, 2008.

MENDES, Janaina dos Santos. Análise microbiológica de coliformes em água de torneira em praça pública, Santarém/PA. *In: III COBICET*, 29 ago. 2022.

MING, H.; LINA, D. O. U.; QING, TIAN. Advances in application research of *Bacillus subtilis*. **J Anhui Agric Sci**, v. 36, p. 11622–11623, 2008.

MONNERAT, Rose *et al.* Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. Documento 369. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1122563>

NICHOLSON, W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 3, p. 410–416, mar. 2002.

NICHOLSON, Wayne L. *et al.* Bacterial endospores and their significance in stress resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1–4, p. 27–32, dez. 2002.

NICHOLSON, Wayne L. *et al.* Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548–572, set. 2000.

OGODO, Alloysius Chibuike *et al.* Microbial techniques and methods: basic techniques and microscopy. *In: Analytical Techniques in Biosciences*. Elsevier, 2022. p. 201–220.

OKEREKE, H. C.; KANU, I. J. Cultural methods. *Laboratory Guide for Microbiology*, p. 54–69, 2004.

OWUAMA, C. I. *Microbiology laboratory manual*. Micro Trend Digital Press–Nig. Ltd. Yola, Nigeria, 2015.

PARAY, Ansar Ahmad; SINGH, Manju; AMIN MIR, Mohsin. Gram Staining: A Brief Review. **International Journal of Research and Review**, v. 10, n. 9, p. 336–341, 22 set. 2023.

PRICE, Chester W. General Stress Response in *Bacillus subtilis* and Related Gram-Positive Bacteria. In: **Bacterial Stress Responses**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 301–318.

REASONER, Donald J. Heterotrophic plate count methodology in the United States. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 307–315, maio 2004.

RIEDEL, Stefan *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-28**. 28. ed. Porto Alegre: AMGH, 2022.

SÁ, Magali Romero; SILVA, Manuela Da. Coleções vivas: as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz. **Museologia & Interdisciplinaridade**, v. 5, n. 9, p. 175–187, 30 abr. 2017.

SALFINGER, Yvonne; TORTORELLO, Mary Lou. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, 2015.

SANDERS, Erin R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, 11 maio 2012.

SARTORI, Maristela Aparecida. A microbiologia no âmbito das ciências ambientais: segundo o livro didático e os documentos norteadores do componente curricular biologia do ensino médio no estado do Paraná. 2023. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/6764>

SETLOW, Peter. Germination of Spores of Bacillus Species: What We Know and Do Not Know. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 7, p. 1297–1305, abr. 2014.

SILVA, Daniel Queiroz Hese da; SÁ, Lauro Chagas e; De Farias, Carine Coneglian. Experiência interdisciplinar com metodologias ativas envolvendo matemática e microbiologia no curso superior de biomedicina. **Revista Eletrônica Sala de Aula em Foco**, v. 12, n. 1, p. 6–22, 23 out. 2023.

SILVA, Marcelo Teixeira *et al.* *Bacillus subtilis* como recurso biotecnológico para produção de enzimas e suas aplicações: uma revisão. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 22, n. 7, p. e5628, 3 jul. 2024.

SIMIONE, Frank P. Cryopreservation: storage and documentation systems. In: **Biotechnology**. CRC Press, 2020. p. 7–31.

SIMIONE, Frank P.; CYPESS, Raymond H. Managing a Global Biological Resource of Cells and Cellular Derivatives. In: **Management of Chemical and Biological Samples for Screening Applications**. Wiley, 2012. p. 143–164.

SIMIONE, Frank; SHARP, Tim. Best practices for storing and shipping cryopreserved cells. In: **Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 53, n. 10, p. 888–895, 13 dez. 2017.

SOLA, Marília Cristina *et al.* MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS: CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1398–1418, 2012.

STÜLKE, Jörg *et al.* *Bacillus subtilis*, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology. **Journal of Bacteriology**, v. 205, n. 5, 25 maio 2023.

SUTTON, Scott. The limitations of CFU: compliance to CGMP requires good science. **Journal of GXP Compliance**, v. 16, n. 1, p. 74, 2012.

SWARGE, Bhagyashree *et al.* Investigating Synthesis of the MalS Malic Enzyme during *Bacillus subtilis* Spore Germination and Outgrowth and the Influence of Spore Maturation and Sporulation Conditions. **mSphere**, v. 5, n. 4, 26 ago. 2020.

TAYLOR, Raymond H.; ALLEN, Martin J.; GELDREICH, Edwin E. Standard plate count: A comparison of pour plate and spread plate methods. **Journal AWWA**, v. 75, n. 1, p. 35–37, jan. 1983.

TRIPATHI, Nishant; SAPRA, Amit. Gram staining. 2020.

UGBOGU, O. C. Measurements and dilutions. *Laboratory Guide for Microbiology*, Azu Onyeagba (Ed.), Crystal Publishers, Okigwe, Imo State-Nigeria, p. 30–33, 2004.

WILLEY, Joanne M.; SHERWOOD, Linda; WOOLVERTON. Christopher J. Prescott's microbiology. McGraw-Hill New York, 2011. v. 7

ZIPKES, Marilyn R.; GILCHRIST, James E.; PEELER, James T. Comparison of Yeast and Mold Counts by Spiral, Pour, and Streak Plate Methods. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 64, n. 6, p. 1465–1469, 1 nov. 1981.