



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária



CATAA
CENTRO DE APOIO
TECNOLÓGICO AGRO ALIMENTAR

Estudo de parâmetros microbiológicos em amostras de leite cru destinado ao fabrico de queijo

Ana Rita da Silva Henriques

Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Engenheira Ana Lúcia Colaço Silveira

Engenheira Ana Isabel Teixeira Riscado

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à conclusão do Curso Técnico Superior Profissional em Análises Químicas e Biológicas, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e da Engenheira Ana Silveira e Engenheira Ana Riscado, do Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar.

Julho 2023

Agradecimentos

Na concretização deste trabalho contei com o apoio de várias pessoas e instituições às quais estou verdadeiramente agradecida.

Agradeço à Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, minha orientadora, pelo seu apoio, dedicação, motivação, conhecimento e amizade que sempre demonstrou ao longo do curso.

À Engenheira Manuela Goulão, técnica do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela ajuda na realização da parte do trabalho que foi realizada no Laboratório de Microbiologia da ESACB.

Ao Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar (CATAA), especialmente às Engenheiras Ana Silveira e Ana Riscado por toda a ajuda, disponibilidade, paciência e por todo o carinho que sempre demonstraram.

A minha coordenadora de curso Doutora Maria da Conceição Mesquita dos Santos por toda a dedicação, disponibilidade, conhecimento e por toda a amizade que me deu ao longo do curso.

Agradeço também aos meus pais e amigos e colegas de estágio por estarem sempre presentes e disponíveis para ajudar.

Quero demonstrar o meu agradecimento, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização do presente relatório!

A todos o meu sincero e profundo Muito Obrigada!

Resumo

O trabalho teve como principal objetivo a integração nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar (CATAA) no decurso das atividades de rotina. Para além disso, foi também estabelecido um objetivo mais específico, relacionado com a execução de análises microbiológicas em amostras de leite cru destinadas à produção de queijo, como parte de um estudo sobre o acastanhamento do queijo a decorrer ao mesmo tempo no CATAA e na ESACB. Estas análises tiveram o intuito de avaliar a qualidade microbiológica do leite cru e identificar possíveis causas para o acastanhamento indesejado durante a produção de queijo.

Foram recolhidas diversas amostras de leite cru em diferentes produtores na região da Beira Baixa, às quais foram realizadas nas quais, foram realizadas análises microbiológicas para determinar a contagem de estafilococos coagulase positiva de microrganismos a 30 °C. Além disso, a um conjunto selecionado de isolados de estafilococos coagulase positiva, foi feita a pesquisa por PCR Multiplex de genes enterotoxigénicos e do gene femA.

Os resultados mostraram que algumas amostras apresentaram contagens elevadas de estafilococos coagulase positiva, o que pode indicar uma possível falta de higiene durante ou após a ordenha ou casos de mamites nos animais. Também foram identificados genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas em algumas amostras, o que aumenta as preocupações com a segurança alimentar. No caso dos microrganismos a 30 °C, algumas amostras apresentaram contagens acima do valor legal.

Palavras chave

Estafilococos coagulase positiva; Enterotoxina estafilocócica; Microrganismos a 30°C; Leite cru; Segurança alimentar.

Abstract

The main objective of the work was the integration in the activities developed in the Microbiology laboratory of the Agri-Food Technological Support Center (CATAA) in the course of routine activities and a more specific objective was also established, related to the execution of microbiological analyses in samples of raw milk intended for cheese production, as part of a study on cheese browning. These analyses were intended to assess the microbiological quality of raw milk and to identify possible causes for unwanted browning during cheese production.

Several samples of raw milk were collected from different producers in the Beira Baixa region, on which, microbiological analyses were performed to determine the count of coagulase positive staphylococci and microorganisms at 30 °C. In addition, a selected set of coagulase positive staphylococci isolates were tested by Multiplex PCR for enterotoxigenic genes and the femA gene.

The results identified that some samples showed high coagulase positive staphylococci counts, which may indicate a possible lack of hygiene during milking and cases of mastitis in the animals. Genes encoding staphylococcal enterotoxins were also identified in some samples, which increases food safety concerns. For microorganisms at 30 °C, some samples showed counts above the indicated value.

Keywords

Coagulase positive staphylococci; Staphylococcal enterotoxin; Microorganisms at 30 °C; Raw milk; Food safety.

Índice geral

Agradecimentos	III
Resumo	V
Palavras chave	V
Abstract	VII
Keywords	VII
Índice geral	IX
Índice de figuras	XI
Lista de Tabelas	XII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	XIII
I. Introdução	1
II. Revisão bibliográfica	2
1. Queijo	2
1.1. Produção de queijos em Portugal	2
1.2. Matéria-prima	5
2. Microrganismos associados ao leite cru de ovelha e cabra	6
2.1. Microrganismos a 30 °C	6
2.2. Bolores e leveduras	6
2.3. <i>Pseudomonas</i> spp.	7
2.4. Estafilococos coagulase positiva	7
2.4.1. Enterotoxinas estafilocócicas	8
III. Materiais e Métodos	9
1. Local de estágio (CATAA)	9
2. Laboratório de Microbiologia e atividades desenvolvidas	10
2.1. Atividades desenvolvidas	10
2.1.1 Organização de material de laboratório	10
2.1.2 Monitorização da qualidade do ar e da eficácia da limpeza das superfícies	11
2.1.3. Preparação de meios de cultura	11
3. Qualidade microbiológica de leite cru e de queijo	13
3.1. Recolha de amostras de leite cru	13
3.2. Preparação das amostras e das diluições decimais	14
3.3. Análises microbiológicas às amostras de leite cru	15
a) Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C	15
b) Cálculo do número de unidades formadoras de colónias (UFC)	16

c) Registo fotográfico das placas de PCA inoculadas com os leites dos diferentes produtores nas três datas de colheita.....	16
d) Contagem de estafilococos coagulase positiva	16
e) Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas por PCR multiplex.....	17
IV. Resultados e Discussão	21
1. Resultados das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C	21
2. Resultados das contagens de estafilococos coagulase positiva.....	23
3. Resultados do PCR Multiplex.....	24
V. Considerações finais.....	25
VI. Referências bibliográficas.....	26
Anexos I.....	29
Anexos II.....	29
Formulário de Identificação de amostras de leite cru de diversos produtores	29
Registo fotográfico das placas PCA inoculadas com os leites dos diferentes produtores na 1ª colheita.....	29
Registo fotográfico das placas PCA inoculadas com os diferentes produtores na 2ª Recolha de colheita	31
Registo fotográfico das placas PCA inoculadas com os diferentes produtores na 3ª colheita.....	33

Índice de figuras

Figura 1- Representação das regiões demarcadas de produção de queijo DOP	4
Figura 2 - Estrutura orgânica do CATAA	9
Figura 3- Preparação de meios de cultura no Laboratório do CATAA	11
Figura 4- Recolha da amostra de um dos produtores de leite	13
Figura 5- Preparação das diluições sucessivas Figura 6- Tubos com o pellet para inoculação da em BP+RPF.....	15
Figura 7- Exemplo de colónias de microrganismos aeróbios totais a 30 °C em PCA, nas placas inoculadas com as diluições 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ e 10 ⁻⁴ do leite do produtor L da 1 ^a colheita	16
Figura 8- Exemplos de colónias caraterísticas de estafilococos coagulase positiva em BP+RPF.....	17
Figura 9- Termociclador da ESACB.....	19
Figura 10- Esquema com a posição das amostras de DNA no gel de agarose M- marcador C- controlo negativo.....	19
Figura 11- (I.) Carregamento das amostras no gel: (II.) Tina de eletroforese ligada à fonte de alimentação	20
Figura 12- Gel com agarose preparado com 2,5% com TBE 1X. M- Marcador 50bp. C- Controlo da reação	25
Figura 13- Registo fotográfico das placas PCA inoculadas com os diferentes produtores na 1 ^a Recolha de colheita (17/04).....	31
Figura 14- Registo fotográfico das placas PCA inoculadas com os diferentes produtores na 2 ^a Recolha de colheita (24/04).....	33
Figura 15- Registo fotográfico das placas PCA inoculadas com os diferentes produtores na 3 ^a Recolha de colheita (29/05).....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1- Constituição e finalidades dos meios de cultura e suplementos	12
Tabela 2- Código atribuído pelo laboratório aos 18 produtores de leite, tipo de leite produzido e datas de colheita.....	14
Tabela 3- Parâmetros microbiológicos e metodologias usadas na análise das amostras de leite cru	15
Tabela 4- Isolados de estafilococos coagulase positiva selecionados para PCR Multiplex.	18
Tabela 5- Sequência de nucleotídeos e concentrações de trabalho dos produtos de amplificação para os genes usados.....	18
Tabela 6- Resumo das etapas que ocorrem no termociclador	19
Tabela 7- Dados das contagens de UFC/mL, média e desvio padrão de microrganismos aeróbios totais a 30 °C	21
Tabela 8- Dados das contagens de UFC/mL, média e desvio padrão de estafilococos coagulase positiva.....	23

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

CATAA - Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar

DOP – Denominação de Origem Protegida

IGP - Indicação Geográfica Protegida

BPHF - Boas Práticas de Higiene no Fabrico

UFC/mL – Unidades formadoras de colónias/mililitro

SEs - Enterotoxinas estafilocócicas

HEPA - *Highly Effective Particle Arrest*

UP – Unidades piloto

DRBC - *Dichloran rose bengal chloramphenicol Agar*

PPA - *Penicillin and Pimaricin Agar*

PP - *Pseudomonas Selective Supplement*

PCA - *Plate Count Agar*

BP - *Baird Parker Agar*

DG18 -

RPF - *Baird-Parker Agar* – RPF (*rabbit plasma fibrinogen*)

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

APT – Água Peptonada Tamponada

DSS - Dodecil Sulfato de Sódio

µg – Micrograma

µL – Microlitros

M – Marcador

C - Controlo

UV – Ultravioleta

Bp – Pare de bases

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

a_w - Atividade da água

NaOH - Hidróxido de sódio

