



# **Estudo de potenciais agentes microbianos responsáveis pelo acastanhamento em queijos**

Licenciatura em Biotecnologia Alimentar  
Guilherme Luís Ameixa da Silva Martins

Orientadores:

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado  
Engenheira Ana Isabel Teixeira Riscado

Relatório de atividades apresentado à Escola Superior Agrária de Castelo Branco do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à conclusão da Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Engenheira Ana Isabel Teixeira Riscado do Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar

Outubro, 2023



## **Agradecimentos**

Com o término deste trabalho, termina mais uma etapa. É com enorme alegria, que agradeço a todos os que me apoiaram direta ou indiretamente para que fosse possível a concretização deste momento.

À Professora Doutora Cristina Santos Pintado, minha orientadora na ESACB, pela atenção, conhecimentos e ajuda prestada, para a realização deste trabalho.

À Engenheira Ana Riscado, minha orientadora no CATAA, pela ajuda e conhecimentos fornecidos durante o estágio.

À Engenheira Ana Silveira, que acompanhou e ajudou durante toda a estadia no CATAA.

Agradeço também à equipa do CATAA, pela oportunidade fornecida e pela simpatia.

À Engenheira Manuela, pela ajuda e conhecimentos fornecidos na fase final do trabalho.

Um agradecimento especial à minha família e amigos, em especial à minha mãe que me acompanhou durante esta fase e me deu todo o suporte que eu precisei e aos meus amigos José e Bruno, pela companhia fornecida e à minha colega de estágio Rita pela companhia e ajuda no estágio.



## Resumo

O escurecimento indesejado dos queijos é um problema que tem surgido continuamente na região da Beira Baixa, o que leva a prejuízos económicos nas queijarias, já que estas alterações de cor são consideradas defeitos, embora não causem danos à saúde dos consumidores.

O objetivo deste trabalho foi analisar microbiologicamente amostras de leite cru, obtidas de produtores da região da Beira Baixa que fornecem uma queijaria produtora de queijo feito com leite cru, com vista ao estudo de possíveis fontes microbianas do acastanhamento da casca dos queijos.

Foram analisadas amostras de leite cru maioritariamente de pequenos ruminantes de dezoito produtores, em três datas diferentes (17 e 24 de abril e 29 de maio de 2023). Foi feita a contagem (UFC / ml) de *Pseudomonas* spp. e de bolores e leveduras, de acordo com as normas recomendadas. Foram igualmente selecionados isolados de *Pseudomonas* spp. para posterior identificação por API 20NE e para avaliar a capacidade para produzirem pigmentos nos meios de cultura King B, Müeller-Hinton Agar, Agar nutritivo e Agar de queijo com tirosina.

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar fortes colorações nos isolados selecionados, quer fossem estas, causadoras de escurecimento dos meios ou pigmentações maioritariamente azuladas. Ao realizar os testes de API 20NE, observou-se uma predominância de *Pseudomonas fluorescens* (52,6%), sendo que também se observou a mesma quantidade de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* (ambas 23,7%). No entanto não foi possível definir a causa responsável pelo escurecimento da casca do queijo, ainda que tudo aponte que as *Pseudomonas* sejam responsáveis por este problema.

## Palavras-chave

Escurecimento do queijo; *Pseudomonas*; Pigmento de origem bacteriana; Bolores e leveduras



## Abstract

Undesirable darkening of cheeses is a problem that has been continuously in the Beira Baixa region, which leads to economic losses in the cheese factories, as these color changes are considered defects, although they do not cause harm to consumers' health.

The aim of this study was to analyze microbiologically raw milk samples obtained from producers in the Beira Baixa region who supply a cheese factory producing raw milk cheese, in order to study possible microbial sources of browning on the cheese rind.

Samples of raw milk predominantly from small ruminants from eighteen producers were analyzed on three different dates (April 17th and 24th, and May 29th, 2023). The count (CFU/ml) of *Pseudomonas* spp. and molds and yeasts was performed according to recommended standards. Isolates of *Pseudomonas* spp. were also selected for further identification using API 20NE and to assess their ability to produce pigments on King B, Müeller-Hinton Agar, Nutrient Agar, and Cheese Agar with tyrosine culture media.

Based on the results obtained, strong colorations were observed in the selected isolates, whether they caused darkening of the media or predominantly bluish pigments. It was also found that the majority of pigments observed by the isolates exhibited fluorescence. By conducting the API 20NE tests, a predominance of *Pseudomonas fluorescens* (52,6%) was observed, with an equal amount of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* (both 23,7 %) also being observed. However, it was not possible to define the cause responsible for the darkening of the cheese rind, although everything points to *Pseudomonas* being responsible for this problem.

## Keywords

Cheese discoloration; *Pseudomonas*; Bacterial-origin pigment; Molds and Yeasts.



# Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Índice de figuras.....	XI
Índice de tabelas.....	XIII
<b>I- Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>II- Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>2</b>
1- Leite cru de pequenos ruminantes.....	2
2- Queijos feitos com leite cru.....	3
3- Microrganismos associados ao leite cru de pequenos ruminantes.....	4
3.1- Microrganismos aeróbios totais a 30°C.....	4
3.2- Bolores e leveduras.....	5
3.3- <i>Pseudomonas</i> .....	6
3.4- <i>Staphylococcus</i> .....	7
4- Produção de pigmentos associada ao escurecimento da casca do queijo.....	7
<b>III- Materiais e Métodos.....</b>	<b>9</b>
1- Local de estágio e fornecimento das amostras.....	9
2- Meios de cultura.....	11
3- Preparação das amostras e análises microbiológicas.....	13
3.1- Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.....	13
3.2- Contagem de bolores e leveduras.....	15
4- Caracterização de isolados selecionados para a produção de pigmentos.....	15
5- Identificação de <i>Pseudomonas</i> spp. com recurso ao API 20NE.....	16
<b>IV- Resultados e Discussão.....</b>	<b>18</b>
1- Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL) nas amostras de leite.....	18
2- Contagem de bolores e leveduras (UFC/mL) nas amostras de leite.....	21
3- Produção de pigmentos pelos isolados selecionados.....	25
4- Identificação de <i>Pseudomonas</i> spp. com recurso ao API 20NE.....	27
<b>V- Conclusão.....</b>	<b>29</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>30</b>

<b>Anexos</b> .....	34
---------------------	----

<b>Anexo I</b> - Caracterização dos presumidos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes dos 16 produtores de leite, nas três datas de recolha de amostras.....	35
--	----

Tabela 9- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor A .....	35
Tabela 10- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor B .....	36
Tabela 11- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor C .....	37
Tabela 12- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor D .....	38
Tabela 13- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor E .....	39
Tabela 14- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor F .....	40
Tabela 15- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor G .....	41
Tabela 16- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor H .....	42
Tabela 17- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor I .....	43
Tabela 18- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor J .....	44
Tabela 19- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor K .....	45
Tabela 20- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor L .....	46
Tabela 21- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor M .....	47
Tabela 22- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor N .....	48
Tabela 23- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor O .....	49
Tabela 24- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor P .....	50
Tabela 25- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor Q .....	51
Tabela 26- Caracterização de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas a partir do produtor R .....	52

<b>Anexo II</b> – Identificação de <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes dos 16 produtores de leite, nas três datas de colheita, com recurso a galerias bioquímicas API 20NE .....	53
---	----

Tabela 27- Identificação dos isolados do produtor A .....	53
Tabela 28- Identificação dos isolados do produtor B .....	53
Tabela 29- Identificação dos isolados do produtor C .....	53
Tabela 30- Identificação dos isolados do produtor D .....	54
Tabela 31- Identificação dos isolados do produtor E .....	54
Tabela 32- Identificação dos isolados do produtor F .....	55
Tabela 33- Identificação dos isolados do produtor G .....	55
Tabela 34- Identificação dos isolados do produtor H .....	56
Tabela 35- Identificação dos isolados do produtor I .....	56
Tabela 36- Identificação dos isolados do produtor J .....	56
Tabela 37- Identificação dos isolados do produtor K .....	57
Tabela 38- Identificação dos isolados do produto L.....	57
Tabela 39- Identificação dos isolados do produtor M .....	58
Tabela 40- Identificação dos isolados do produtor N .....	58
Tabela 41- Identificação dos isolados do produtor O .....	59
Tabela 42- Identificação dos isolados do produtor P .....	59
Tabela 43- Identificação dos isolados do produtor Q .....	60
Tabela 44- Identificação dos isolados do produtor R .....	60

## Índice de Figuras

Figura 1- Contagem de <i>Pseudomonas</i> (Log UFC/ml) de leite para os 16 produtores (de A a P).....	19
Figura 2- Contagem de leveduras (Log UFC/ml) de leite para os 16 produtores (de A a P).....	22
Figura 3- Contagem de bolores (Log UFC/ml) de leite para os 16 produtores (de A a P).....	24



## Índice de tabelas

Tabela 1- Colorações de isolados de produtos lácteos e respetiva identificação .....	8
Tabela 2- Tipo de leite correspondente a cada produtor.....	10
Tabela 3- Meios de cultura e suplementos usados.....	11
Tabela 4- Contagem do número de UFC/ml de <i>Pseudomonas</i> .....	18
Tabela 5- Contagem do número de UFC/ml de leveduras.....	21
Tabela 6- Contagem do número de UFC/ml de bolores.....	23
Tabela 7- Isolados de <i>Pseudomonas</i> com forte potencial de escurecimento para os 16 produtores de leite.....	26
Tabela 8- Isolados de <i>Pseudomonas</i> com forte potencial de escurecimento e identificação API para as amostras Q e R.....	26
Tabela 9- % do tipo de <i>Pseudomonas</i> identificadas para as 38 colónias analisadas.....	27