



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Relatório de Estágio

Análise de dados microbiológicos relativos a produtos lácteos e caracterização fenotípica de isolados de *Listeria monocytogenes*

Jessica de Jesus dos Santos Marques
Engenharia Biológica e Alimentar

Orientador interno: Prof^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Orientador externo: Eng^o Vítor Manuel Amaro Lopes

Castelo Branco, Novembro 2010



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Relatório de Estágio

**Análise de dados microbiológicos relativos a
produtos lácteos e caracterização fenotípica de
isolados de *Listeria monocytogenes***

**Jessica de Jesus dos Santos Marques
Engenharia Biológica Alimentar**

Orientador Interno: Prof.^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Orientador Externo: Eng.º Vítor Manuel Amaro Lopes

Castelo Branco, Novembro 2010

*As doutrinas expressas neste trabalho são da
inteira responsabilidade do seu autor*

Titulo: Análise de dados microbiológicos relativos a produtos lácteos e caracterização fenotípica de isolados de *Listeria monocytogenes*

Local da Realização do Estágio: Aquimisa Consultores Agro-Industriais Lda.
de Castelo Branco

Orientador Interno: Prof.^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Orientador Externo: Eng.^o Vítor Manuel Amaro Lopes

Índice:

Índice de figuras	i
Índice de tabelas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
2. Apresentação da Aquimisa, Lda	2
3. Microbiologia do queijo	3
3.1. O leite	3
3.2. O queijo	4
3.2.1. Diagrama de fabrico	4
3.2.2. Factores que afectam o crescimento microbiano	5
3.2.3. Fontes de contaminação	6
4. Características dos microrganismos em estudo	7
4.1. <i>Escherichia coli</i>	7
4.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	8
4.3. <i>Salmonella</i> spp.	9
4.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	9
5. Trabalho laboratorial	14
5.1. Acompanhamento da rotina laboratorial	14
5.1.1. Transporte e armazenamento das amostras	14
5.1.2. Recepção e registo das amostras	15
5.1.3. Meios de cultura	15
5.1.4. Análises microbiológicas	15
5.1.4.1. Contagem de <i>Escherichia coli</i>	16
5.1.4.2. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	16
5.1.4.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	16
5.1.4.4. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
5.1.5. Apreciação dos resultados	18
5.2. Análise dos dados microbiológicos	20
5.3. Caracterização fenotípica de isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
5.3.1. Coloração de Gram	21

5.3.2. Hemólise	22
5.3.3. Teste da catalase	22
5.3.4. Mobilidade	22
5.3.5. Iluminação de Henry	23
5.3.6. API- Listeria	23
6. Resultados e discussão	23
6.1. Análise dos dados microbiológicos das queijarias	23
6.2. Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Listeria</i> spp. da Aquimisa	28
7. Considerações finais	30
Referências bibliográficas	32
Agradecimentos	
Anexos	
Anexo I – Tabelas com a marca e a referência dos meios de cultura e dos corantes usados.	
Anexo II - Resultados das análises realizadas ao longo de um ano em 37 queijarias.	
Anexo III – Gráfico de % de casos satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios das queijarias.	

Índice de Figuras

Figura 1 - Factores que afectam o crescimento microbiano em alimentos	6
Figura 2 - Colónias de <i>E.coli</i> em TBX (azuis)	8
Figura 3 - Colónias de <i>Staphylococcus aureus</i> em RFP (pretas com halo branco)	9
Figura 4 - Colónias de <i>Salmonella</i> spp. em XLD (vermelhas com centro negro)	9
Figura 5 - Colónias de <i>L.monocytogenes</i> em ALOA (azuis com halo)	10
Figura 6 - Hemólise da <i>L.monocytogenes</i> em Agar sangue de carneiro	12
Figura 7 – Reacção da catalase: negativo à esquerda e positivo à direita	12
Figura 8 - À direita mobilidade característica de <i>Listeria</i> spp.	13
Figura 9 - Iluminação de Henry	13
Figura 10 - O teste DIM do API-Listeria permite distinguir entre a <i>Listeria monocytogenes</i> (a) e a <i>Listeria innocua</i> (b)	14
Figura 11 – Esquema da coloração de Gram	22
Figura 12 – Percentagem de amostras com resultados satisfatórios e insatisfatórios na pesquisa de <i>L.monocytogenes</i>	24
Figura 13 – Número de queijarias com resultados satisfatórios e insatisfatórios na contagem de <i>E.coli</i>	25
Figura 14 – Resultados insatisfatórios (%) considerando as contagens de <i>E.coli</i>	26
Figura 15 – Número de queijarias com resultados satisfatórios, aceitáveis e insatisfatórios na contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	27
Figura 16 – Resultados aceitáveis (%) considerando a contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	28

Índice de Tabelas

Tabela.1 - Fases do fabrico tecnológico para o queijo tradicional e aspectos tecnológicos relevantes para a qualidade do queijo	5
Tabela. 2 - Efeito diferenciador do álcool nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	11
Tabela.3- Valores segundo o Reg.(CE) N.º1441/2007	19
Tabela.4- Isolados de <i>Listeria</i> spp. da Aquimisa usados na caracterização fenotípica	29
Tabela.5 - Diferenciação bioquímica para os diferentes tipos de isolados no API- <i>Listeria</i>	30

Resumo

O estágio curricular foi realizado na empresa Aquimisa, Lda. situada em Castelo Branco, onde se procedeu ao acompanhamento de toda a rotina laboratorial e à recolha de dados de um ano de 37 queijarias para a avaliação de quatro parâmetros microbiológicos. Efectuou-se ainda a caracterização fenotípica de isolados de *L.monocytogenes* provenientes de diferentes produtos alimentares.

Após uma pesquisa bibliográfica relativamente à área em estudo, seguiu-se a análise dos registos. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. verificou-se que nenhuma das 420 amostras provenientes das 37 queijarias apresentava a presença deste microrganismo. Já na pesquisa de *L.monocytogenes*, verificou-se que 98% dos 400 produtos lácteos analisados apresentaram uma pesquisa negativa e 2% pesquisa positiva. Relativamente às amostras analisadas para a contagem de *E.coli*, num total de 222 amostras, 79% apresentaram resultados satisfatórios e 10% insatisfatórios. Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram resultados satisfatórios 94% das amostras e 6% aceitáveis.

A caracterização fenotípica de 9 isolados de *L.monocytogenes*, obtidos no Laboratório da Aquimisa durante o período de estágio, foi realizada no Laboratório de Microbiologia da ESACB, tendo-se concluído que 8 dos 9 isolados apresentava o mesmo perfil bioquímico e um dos isolados apresentava uma reacção atípica quanto à utilização de D-xilose.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli*, produtos lácteos, caracterização fenotípica.

Abstract

The training was performed at the Aquimisa, Lda., located in Castelo Branco, aiming to tracking all the routine laboratory practices and to collect data from one year and from 37 dairies, to evaluate four microbiological parameters. Was also done a phenotypic characterization of nine isolates of *L.monocytogenes*.

After a literature review on the study area was done the data examination. Concerning the *Salmonella* spp. data, it was found that none of 420 samples from 37 dairies had the presence of this microorganism. Concerning the detection of *L. monocytogenes*, it was found that 98% of 400 dairy products analyzed had a negative detection, and 2% tested positive. Between the 222 samples analyzed for the enumeration of *E. coli*, 79% had satisfactory results and 10% unsatisfactory. The enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus* showed 94% of the samples with satisfactory results and 6% of the samples with acceptable results.

The phenotypic characterization of the nine isolates of *L.monocytogenes*, supplied by the Aquimisa Laboratory during the training period, was carry out in the ESACB Microbiology Laboratory. Was found that eight of the nine isolates had the same biochemical profile and one isolate showed an atypic positive reaction of D-xylose.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., coagulase-positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, dairy products, phenotypic characterization.