

EIXO TEMÁTICO: INDUSTRIALIZAÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS

SOBREVIVÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. COAGULASE-POSITIVO, *ESCHERICHIA COLI* E COLIFORMES TOTAIS EM QUEIJOS ARTESANAIS NO PERÍODO DE MATURAÇÃO

¹Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito

²Letícia Caldas Mendonça

¹Nívea Maria Vicentini

¹Carla Christine Lange

³Nara Ladeira de Carvalho

⁴Selda Loase Salustiano Marques

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a sobrevivência de patógenos em queijos artesanais no período de maturação. Foram adquiridos cinco queijos de duas queijarias (A e D) e examinados para a presença de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos (SCP), *Escherichia coli* e coliformes totais. Posteriormente foram adquiridos mais três queijos recém-fabricados das mesmas queijarias e avaliou-se a sobrevivência de patógenos, por meio de análises microbiológicas durante cinco semanas. As análises microbiológicas evidenciaram ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., e presença de SCP, *Escherichia coli* e coliformes totais. A contagem de SCP dos queijos da queijaria A foi negativa na quinta semana, enquanto a de coliformes totais e *E. coli* foi de $6,0 \times 10^4$ ufc/g e $1,8 \times 10^2$ ufc/g, respectivamente. Nos queijos da queijaria D as contagens de *E. coli* foram negativas a partir da terceira semana. Na quinta semana as contagens de coliformes totais e SCP foram, respectivamente, $1,4 \times 10^1$ ufc/g e $8,4 \times 10^4$ ufc/g. Os resultados sugerem a necessidade de medidas para reduzir a contaminação microbiana e prevenir a presença de patógenos nos queijos artesanais.

Palavras chave: Queijos artesanais, *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo, coliformes, *Escherichia coli*, maturação.

INTRODUÇÃO

A contaminação de derivados de leite com patógenos pode ocorrer em qualquer momento das várias etapas do processamento do queijo, pelo contato com superfícies não higienizadas e manipulação de forma inadequada (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

Em Minas Gerais, a fabricação de queijos artesanais utilizando leite não pasteurizado como matéria-prima é uma prática habitual nas propriedades rurais (BOARI et al. 2002). O leite cru pode ser contaminado por bactérias oriundas dos bovinos, dos humanos e do ambiente (ARCURI et al. 2006). Patógenos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e coliformes podem contaminar o leite utilizado para a fabricação de queijos, o que torna o produto não seguro para o consumo da população (PINTO et al. 2004).

A legislação brasileira permite a fabricação de queijos com leite não pasteurizado desde que ocorra um período de maturação de, no mínimo, 60 dias (BRASIL, 1996). A maturação pode interferir no crescimento de microrganismos patogênicos, uma vez que

¹ Pesquisadora – Embrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, Juiz de Fora, MG. CEP: 36038-330. Tel: 55 32 3249-4885. mavpaiva@cnpqgl.embrapa.br

² Analista – Embrapa Gado de Leite

³ Bolsista CNPq DTI III

⁴ Bolsista CNPq PIBIC

alterações bioquímicas ocorrem e o pH do meio é reduzido pelas bactérias lácteas (ZÁRATE et al. 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de microrganismos patogênicos em queijos maturados provenientes de duas queijarias artesanais da Região Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira, foram adquiridos cinco queijos de cada uma de duas queijarias artesanais (A e D) da Região Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais. Os queijos foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e transportados para o laboratório para pesquisa de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., coagulase-positivo (SCP), *Escherichia coli* e coliformes totais.

Na segunda etapa foram adquiridos três queijos recém-preparados de cada uma das queijarias, para avaliação da sobrevivência dos patógenos identificados na primeira etapa. A avaliação foi feita no período de cinco semanas, correspondendo ao período de maturação de aproximadamente um mês. Para esse estudo, os queijos foram divididos em porções de aproximadamente 60 g, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas a 21°C. Foram feitas cinco avaliações microbiológicas no período. Nas duas primeiras pesquisou-se *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, SCP, *E. coli* e coliformes totais. Nas três seguintes, somente *S. aureus*, *E. coli* e coliformes totais. Para as análises microbiológicas, porções de 25 g de cada queijo foram pesadas, diluídas em 225 mL do meio específico para cada microrganismo, e trituradas em homogeneizador de amostras tipo *stomacher*.

Para a pesquisa de *L. monocytogenes* a amostra foi diluída e triturada em caldo Half-Fraser contendo suplemento com agentes seletivos (acriflavina, ácido nalidíxico e citrato férrico amoniacal) em metade da concentração. Após incubação a 30°C por 24 horas, 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento foi transferida para tubos contendo 9,9 mL de caldo Fraser (contendo suplemento na concentração completa). Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Alíquotas desta cultura foram semeadas em duas placas de ágar Oxford, para seleção e identificação de colônias típicas, de acordo com WEHR & FRANK (2004).

Para a pesquisa de SCP, *E. coli* e coliformes totais empregou-se água peptonada tamponada (APT) para diluição e trituração da amostra. Para a detecção de SCP, volumes de 1,0 mL de cada diluição foram inoculados em três placas de ágar Baird Parker (divididos em 0,3, 0,3 e 0,4 mL). Colônias típicas presentes foram contadas e selecionadas para identificação. Até oito colônias típicas e até quatro colônias atípicas foram selecionadas para o teste de coagulase (WEHR & FRANK, 2004). A pesquisa de *E. coli* e coliformes totais foi feita inoculando-se 1,0 mL de cada diluição em placas Petrifilm® para contagem de *E. coli* e coliformes, de acordo com a recomendação do fabricante.

Para a detecção de *Salmonella* as amostras foram diluídas e trituradas em caldo lactosado. Após incubação por 24 horas a 35°C, transferiu-se 1,0 mL da cultura pré-enriquecida para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio selenito cistina e 10 mL de tetracionato, separadamente. As culturas foram incubadas por 24 horas a 35°C e depois semeadas em ágar XLD (agar base Xilose Lisina Desoxicolato) e agar entérico Hektoen (HE), e avaliadas para seleção e identificação de colônias típicas (Wehr & Frank, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos da queijaria A, na primeira etapa do trabalho, foram: ausência de *L. monocytogenes* e de *Salmonella* spp., presença de SCP ($3,6$ a $7,2 \times 10^1$ ufc/g), *E. coli* ($5,0$ ufc/g) e coliformes totais ($6,0 \times 10^2$ ufc/g). Os queijos

da queijaria D apresentaram: ausência de *L. monocytogenes* e de *Salmonella*, presença de SCP ($2,8 \times 10^2$ ufc/g), *E. coli* ($1,2 \times 10^2$ ufc/g) e coliformes totais ($8,8 \times 10^1$ ufc/g).

Os resultados da sobrevivência dos patógenos no período de cinco semanas são apresentados nas Tabelas 1 (queijaria A) e 2 (queijaria D). São apresentadas as médias das contagens, por grama, dos três queijos analisados. Na primeira e na segunda avaliação microbiológica foram pesquisados: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, SCP, *E. coli* e coliformes totais. Como não se detectou, em nenhum dos três queijos, a presença de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., nas avaliações seguintes foram repetidas somente as pesquisas de SCP, *E. coli* e coliformes totais.

Como mostrado na Tabela 1, os queijos da queijaria A apresentaram contaminação elevada de *E. coli* e coliformes totais. Ao término do experimento estas foram de $6,0 \times 10^4$ ufc/g e $1,8 \times 10^2$ ufc/g, para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. As contagens de SCP variaram de $1,4 \times 10^2$ ufc/g a $6,4 \times 10^3$ ufc/g entre a primeira e quarta semana. O resultado da quinta semana foi negativo, indicando que a população destes microrganismos estava em declínio. Nestes queijos as colônias atípicas de *Staphylococcus* spp. no ágar Baird Parker, aumentaram a cada análise seguinte, mas o teste de coagulase destas colônias foram negativos.

Nos queijos provenientes da queijaria D, as contagens de coliformes totais e *E. coli* foram menores em relação aos da queijaria A. Na quinta análise, a contagem total de coliformes foi de $1,4 \times 10^1$ ufc/g, e a de *E. coli* foi negativa a partir da terceira avaliação. O número de SCP permaneceu elevado durante todo período de avaliação. Na quinta semana a contagem foi de $8,4 \times 10^4$ ufc/g.

A presença de SCP em 16 queijos maturados após o período de 90 dias de maturação foi relatada por BOARI et al. (2002), em estudo realizado no município de Lavras-MG. NESPOLO et al. (2009) realizaram análises microbiológicas mensais de queijos de leite de ovelhas no Rio Grande do Sul, durante um período de 90 dias de maturação. A contagem de SCP foi acima do máximo permitido pela legislação até a terceira análise microbiológica, feita no 60º dia. Os valores desse microrganismo só se tornaram aceitáveis quando o queijo atingiu 90 dias de maturação.

CONCLUSÃO

Ao final do período de armazenamento, observou-se redução de *E. coli* nos queijos da queijaria D e de SCP nos da queijaria A. A contagem de coliformes totais permaneceu elevada, enquanto as contagens de SCP não foram reduzidas nos queijos da queijaria D. Os resultados evidenciam a necessidade de se implementarem medidas para reduzir a contaminação microbiana e prevenir a presença de patógenos nos queijos artesanais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro (Projeto APQ 7898 – 507/07) e ao CNPq pelas bolsas de DTI III e IC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

BOARI, C. A.; PICCOLI-VALLE, R. H.; NASCIMENTO, A. R.; ALCÂNTARA, E. M. C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar Baird Parker em queijos maturados. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 347-354, 2002.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, p.162-165, 2003.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na Região Serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Disponível em: <
<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

NESPOLO C. R.; TAFFARELI J. A. S.; BRANDELLI, A. 2009. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, 2009.

PINTO, M. S.; MARTINS, J. M.; ARAÚJO, R. A. B. M.; PIRES, A. C. S.; DUARTE, G. K.; CUNHA, L.R.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Programa de apoio ao queijo minas artesanal produzido no Estado de Minas Gerais. Diagnóstico sócio-econômico e cultural dos produtores e avaliação microbiológica do queijo minas artesanal da região do Serro-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 86-92, 2004.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17 ed. Washington, D.C.:American Public Health Association. 2004. 570p.

ZÁRATE, V.; BELDA, C.; PÉREZ, C.; CARDELL, E. Changes in the microbial flora of tenerife goats' milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 635-641, 1997.

Tabela 1: Resultados das médias das análises microbiológicas por grama de queijo (UFC/g) durante o período de maturação de cinco semanas de queijos artesanais adquiridos da queijaria A.

Microorganismos	1 ^a Semana	2 ^a Semana	3 ^a Semana	4 ^a Semana	5 ^a Semana
Coliformes totais	$2,0 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$2,6 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	$6,0 \times 10^4$
<i>Escherichia coli</i>	$2,9 \times 10^2$	$5,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase (+)	$1,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	$6,4 \times 10^3$	Ausente
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente	Ausente	NF ¹	NF	NF
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente	Ausente	NF	NF	NF

¹ NF: Análise não realizada.

Tabela 2: Resultados das médias das análises microbiológicas por grama de queijo (UFC/g) durante o período de maturação de cinco semanas de queijos artesanais adquiridos da queijaria D.

Microorganismos	1 ^a Semana	2 ^a Semana	3 ^a Semana	4 ^a Semana	5 ^a Semana
Coliformes totais	$2,2 \times 10^2$	$3,8 \times 10^1$	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^1$
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	> 1	> 1	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase (+)	$4,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^2$	$6,4 \times 10^3$	$5,2 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente	Ausente	NF ¹	NF	NF
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente	Ausente	NF	NF	NF

¹ NF: Análise não realizada.