

TRABALHO  
DE  
INVESTIGAÇÃO

Evolução da população bacteriana aeróbia mesófila no leite  
pasteurizado quando submetido a diferentes temperaturas  
de armazenagem

Maria Elisabete Lopes Fernandes

Curso de Ciências da Nutrição da Universidade do Porto  
Porto 1993

## Índice



1 - Introdução	5
2 - Objectivos	8
3 - Material e métodos	9
3.1 - Matéria prima	9
3.1.1 - Amostragem	9
3.1.2 - Método de colheita da amostra	9
3.1.3 - Parâmetros	11
3.2 - Método de análise	12
3.2.1 - Material	12
3.2.2 - Meios de cultura	13
3.2.3 - Preparação dos meios de cultura	13
3.2.4 - Técnica	14
- Preparação da amostra	14

	Páginas
- Diluição	15
- Sementeira	16
- Incubação	17
3.2.5 - Leitura	18
3.2.6 - Cálculos	18
4 - Resultados	20
5 - Discussão	27
6 - Conclusões	28
Bibliografia	29

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Freitas da Fonseca, o meu agradecimento especial por me ter facultado o Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto e pelo apoio constante durante este trabalho.

Ao Dr. Passos Gonçalves, grata pelo apoio, preciosa ajuda e disponibilidade dispensados durante a realização deste trabalho.

À AGROS - União das Cooperativas de Produtores de Leite de Entre Douro e Minho e Trás-os-Montes, especialmente à Eng. Regina Camisão Brito e ao Eng. Óscar Brandão pela valiosa colaboração dispensada.

# 1 - INTRODUÇÃO

Este trabalho de investigação foi desenvolvido no Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto, sendo o leite pasteurizado o produto escolhido para análise.

A decisão por este produto alimentar, foi baseada no facto de ser um bem de "primeira necessidade" consumido pela maior parte dos portugueses, e de contribuir grandemente para uma alimentação saudável: em termos de quantidade (suficiente); em termos de qualidade (equilibrado) e em termos de custos (razoável).

Nutricionalmente, o leite é o alimento que mais próximo se encontra da perfeição. Constitui uma fonte excelente de proteínas de alto valor biológico, de vitaminas do complexo B, de vitamina A, de sais minerais e oligoelementos, tendo no entanto, algumas limitações, principalmente no que se refere à quantidade de ferro e de vitamina C (1).

A sua composição varia com a espécie, raça, idade e estado de saúde do animal, assim como, com as estações do ano e com a temperatura ambiente.

No entanto, a constituição média, por 100g do leite de vaca completo e pasteurizado, é a seguinte: água, 88,2g; proteínas, 3,0g; gordura, 3,0g; hidratos de carbono, 4,6g; cálcio, 126mg; ferro, 0,1mg; vitamina A, 230 UI; vitamina B1, 54µg; vitamina B2, 138µg; vitamina PP, 0,2mg e finalmente vitamina C, 1,2mg (2).

Outra das razões, que me levou a optar por este alimento, é que, pela sua composição, o leite, é um potencial meio de cultura para as bactérias. Desde o momento da recolha do leite, até ao momento de ser consumido, é susceptível de ser contaminado por microrganismos

(através do próprio animal, do manipulador e dos utensílios de recolha do leite).

Os microrganismos veiculados pelo leite, apesar de não serem normalmente patogénicos - habitualmente, trata-se de uma população saprófita - alteram a composição e as características do leite, constituindo perigo.

O leite proveniente de animais doentes, pode conter microrganismos patogénicos (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnetti*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, entre outros) e o seu consumo sem o devido tratamento térmico causa doença: Tuberculose, Brucelose, Febre Q, Escarlatina, Disenteria (3).

Sendo assim, deve haver um grande cuidado para assegurar a isenção destes microrganismos patogénicos, no momento do seu consumo. São efectuados alguns tratamentos térmicos ao leite, com o intuito de eliminar este tipo de população microbiana, como por exemplo a pasteurização.

Segundo as Normas Portuguesas, o " leite pasteurizado é leite de consumo directo, submetido a tratamento térmico adequado, depois do circuito de recolha, de modo a desvitalizar a flora patogénica não esporulada e quase totalmente a flora banal, sem alteração sensível do equilíbrio físico e bioquímico, bem como dos caracteres organolépticos"(4).

Durante a pasteurização, os microrganismos patogénicos são destruídos, assim como, cerca de 99% das bactérias não patogénicas (5).

As condições a que o leite foi submetido durante a realização do trabalho, foram seleccionadas em função das condições de

armazenagem a que este produto pode ser sujeito no dia-a-dia dos portugueses.

Hoje em dia, o frigorífico tem um papel enorme na vida das famílias, pois sem ele, não se conseguia manter o valor nutritivo dos alimentos, entre a aquisição destes no comércio até ao momento do seu consumo.

No entanto, não é invulgar acontecer que o leite, após ter sido adquirido permaneça muitas horas à temperatura ambiente (por exemplo, dentro do porta-bagagens do automóvel ), tempo suficiente para haver crescimento da população microbiana.

Para além disso, existem pessoas que, por diversas razões, não possuem meios de refrigeração, e conseqüentemente armazenam os produtos alimentares facilmente perecíveis à temperatura ambiente.

## 2 - OBJECTIVOS

Foi objectivo deste trabalho de investigação, avaliar a evolução da população bacteriana do leite pasteurizado, quando submetido a várias temperaturas de armazenagem, e não verificar se a qualidade microbiológica do leite se encontra ou não dentro dos limites de aceitação fixados.



## 3 - MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 - Matéria prima

#### 3.1.1 - Amostragem

Foram analisados 50 pacotes de leite pasteurizado, cedidos gentilmente pela AGROS.

O leite foi empacotado em embalagens de saco plástico, originais de 200 ml, especialmente adaptadas para o efeito, evitando assim desperdício de produto.

Tendo assistido ao processo de fabrico deste leite, pude constatar que todas as amostras saíram directamente da linha de produção em curso.

#### 3.1.2 - Método de colheita da amostra

O transporte das amostras desde a AGROS até ao Serviço de Microbiologia, foi feito em malas térmicas refrigeradas, por intermédio de sacos de gelo, estabilizando assim, a população bacteriana inicial.

Após a sua chegada ao laboratório, retiraram-se do lote transportado 5 amostras de leite. Estas foram submetidas a análise microbiológica com o fim de verificar qual a população bacteriana à saída da fábrica ( dia "0" ).

As restantes foram divididas em 3 lotes e imediatamente armazenadas nos locais pretendidos para o estudo: 15 amostras foram

colocadas no frigorífico à temperatura de 4 °C, 15 na estufa a 30 °C e 15 à "temperatura ambiente".



Figura 1 - Amostras de leite armazenadas no frigorífico a 4 °C.

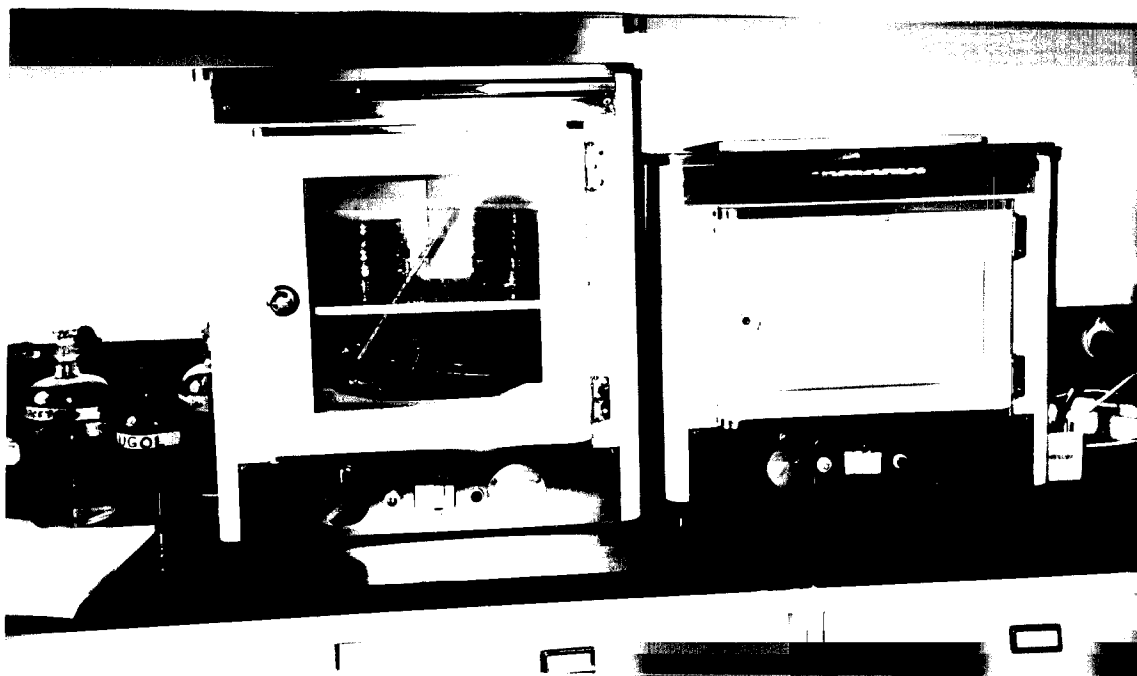


Figura 2 - Amostras de leite armazenadas na estufa de 30 °C.

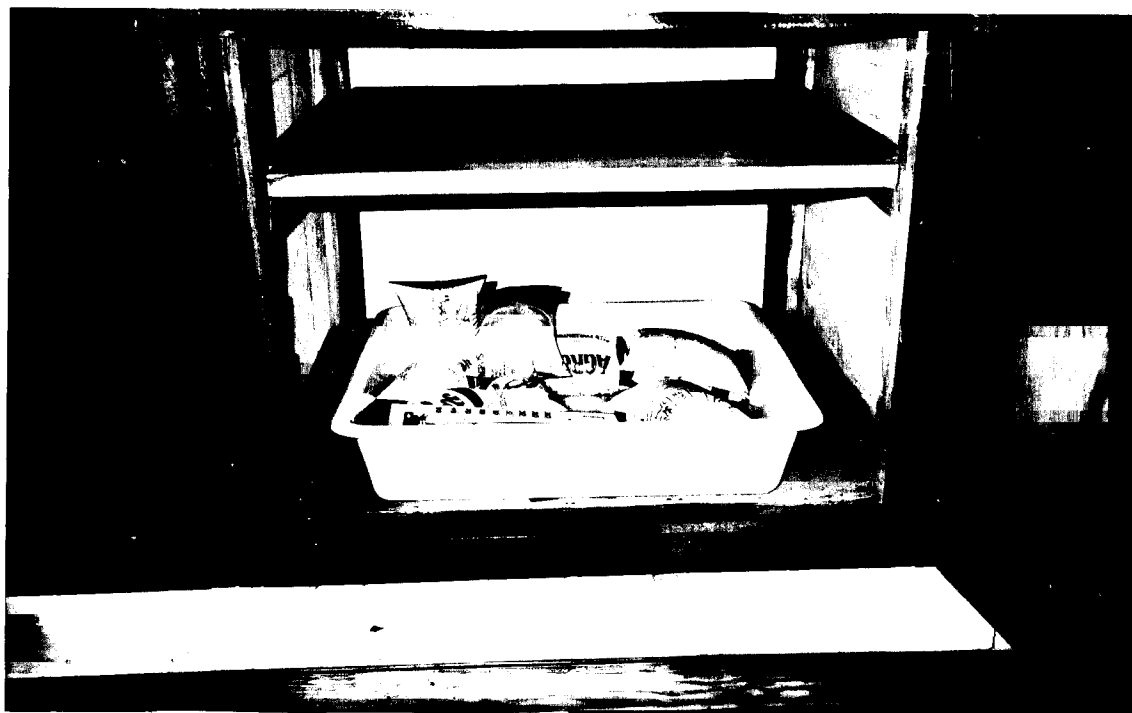


Figura 3 - Amostras de leite armazenadas à "temperatura ambiente".

### 3.1.3 - Parâmetros

O parâmetro estudado foi a evolução da população bacteriana aeróbia mesófila.

A contagem destes microrganismos constitui um dos mais úteis indicadores do estado microbiológico dos alimentos. Contagens elevadas destes, reflectem frequentemente condições incorrectas de armazenagem em termos de tempo/temperatura, assim como de condições higio-sanitárias insatisfatórias (6).

A escolha deste parâmetro, também se deve ao facto desta análise ser um dos critérios utilizados no controlo microbiológico na indústria agro-alimentar.

## 3.2 - Método de análise

### 3.2.1 -Material

Uma das dificuldades sentidas durante a execução deste trabalho, foi a necessidade de muito material de laboratório (especialmente de placas, pipetas e balões de Erlenmeyer ), o que obrigou a lavagens e esterilizações repetidas e recuperações do material que se ia utilizando.

Na realização deste trabalho, foi necessário o seguinte material:

- Placas de Petri, com 12 cm de diâmetro, de vidro
- Pipetas de 1 e de 5ml, graduadas, de escoamento total
- Balões de Erlenmeyer com 200 cm<sup>3</sup>
- Banho Maria, regulado para 45 - 50 °C
- Estufa de 30 ± 1 °C
- Frigorífico, regulado para 4 °C
- Contador de colónias
- Termómetro de registo de temperatura máxima e mínima

### 3.2.2 - Meios de cultura

O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (P.C.A.).

A composição deste meio, conforme o rótulo da própria embalagem da "Difco Laboratories", é a seguinte:

Bacto tryptone	5g
Bacto yeast extract	2,5g
Bacto dextrose (glucose)	1g
Bacto agar	15g

### Diluyente

Como solução diluyente utilizou-se "Bacto peptona" da "Difco Laboratories" a 1%.

### 3.2.3 - Preparação dos meios

Os meios foram preparados seguindo as instruções do fabricante.

### 3.2.4 - Técnica

#### - Preparação da amostra

Em cada um dos 5 dias de duração deste trabalho, foram retiradas 3 amostras de leite de cada local de armazenagem.

Todos os pacotes foram abertos com os devidos cuidados de assépcia.



Figura 4 - Preparação da amostra, abertura dos pacotes de leite.

- Diluição

Fizeram-se diluições decimais sucessivas até se obter as diluições pretendidas.

As diluições utilizadas neste trabalho foram escolhidas em função de um ensaio piloto, propositadamente efectuado na semana anterior.

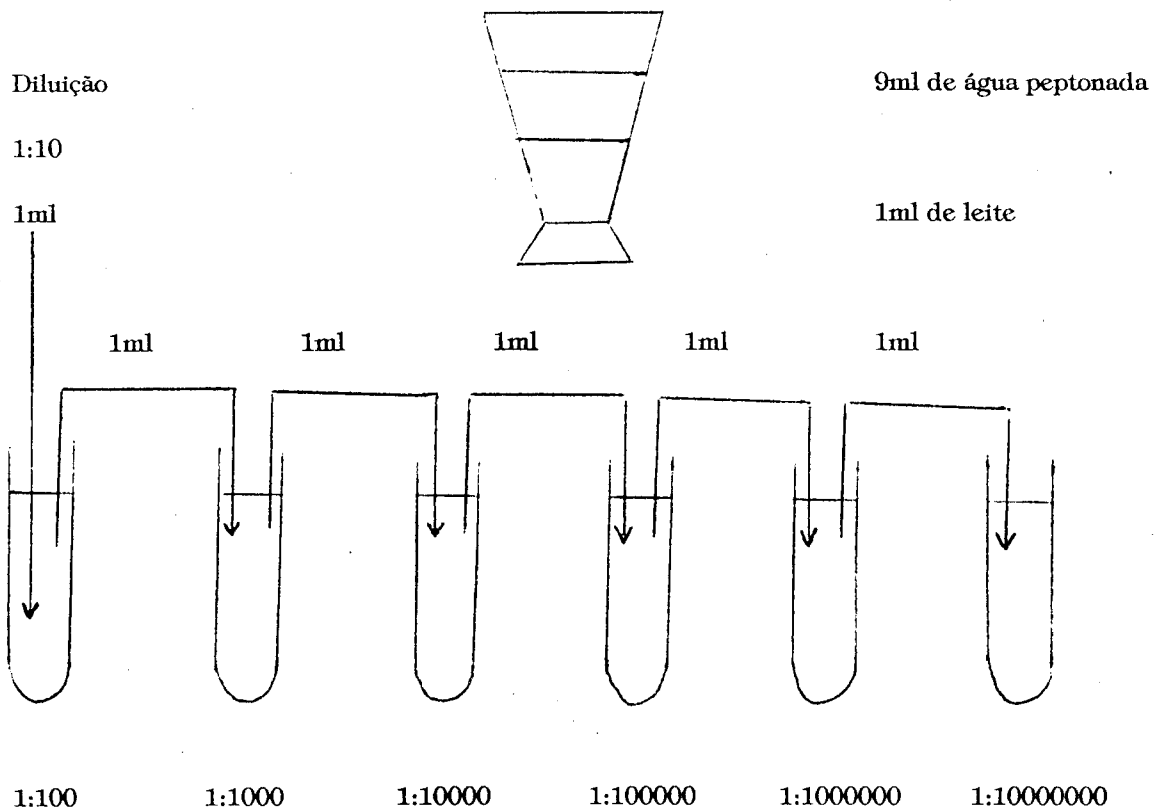


Figura 5 - Esquema seguido na obtenção das diluições pretendidas.



Figura 6 - Uma das fases da diluição.

*- Sementeira*

A sementeira foi feita por *shake*, retirando 1,0 ml das diluições a analisar, para um tubo de ensaio contendo 10 ml de Plate Count Agar, devidamente fundido e mantido à temperatura de 45 - 50 °C.

Depois de bem homogeneizado, verteu-se para placa de Petri.





Figura 7 - Banho - Maria regulado para  $45 - 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantendo o P.C.A. fundido.

*- Incubação*

As placas de Petri foram incubadas em aerobiose, numa estufa de  $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na "posição de incubação", durante  $72 \pm 3$  horas.



Figura 8 - Estufa de incubação regulada para  $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6 - Leitura

Após  $72 \pm 3$  horas de incubação, procedeu-se à leitura das colónias, utilizando o contador de colónias electrónico.



Figura 9 - Contagem das colónias.

### 3.2.7 - Cálculos

Os resultados finais foram obtidos multiplicando o número de colónias contadas pelo factor de diluição.

Exemplo:

Placa 1:	diluição 1/100	50 colónias
Placa 2:	diluição 1/100	200 colónias
Placa 3:	diluição 1/100	50 colónias

Cálculo:  $50 + 200 + 50 = 300$

$300 \div 3 = 75$  (média encontrada)

$75 \times 100 = 7\ 500$

Resultado:  $7,5 \times 10^3$  u.f.c./ml (unidades formadoras de colónias)

#### 4 - RESULTADOS

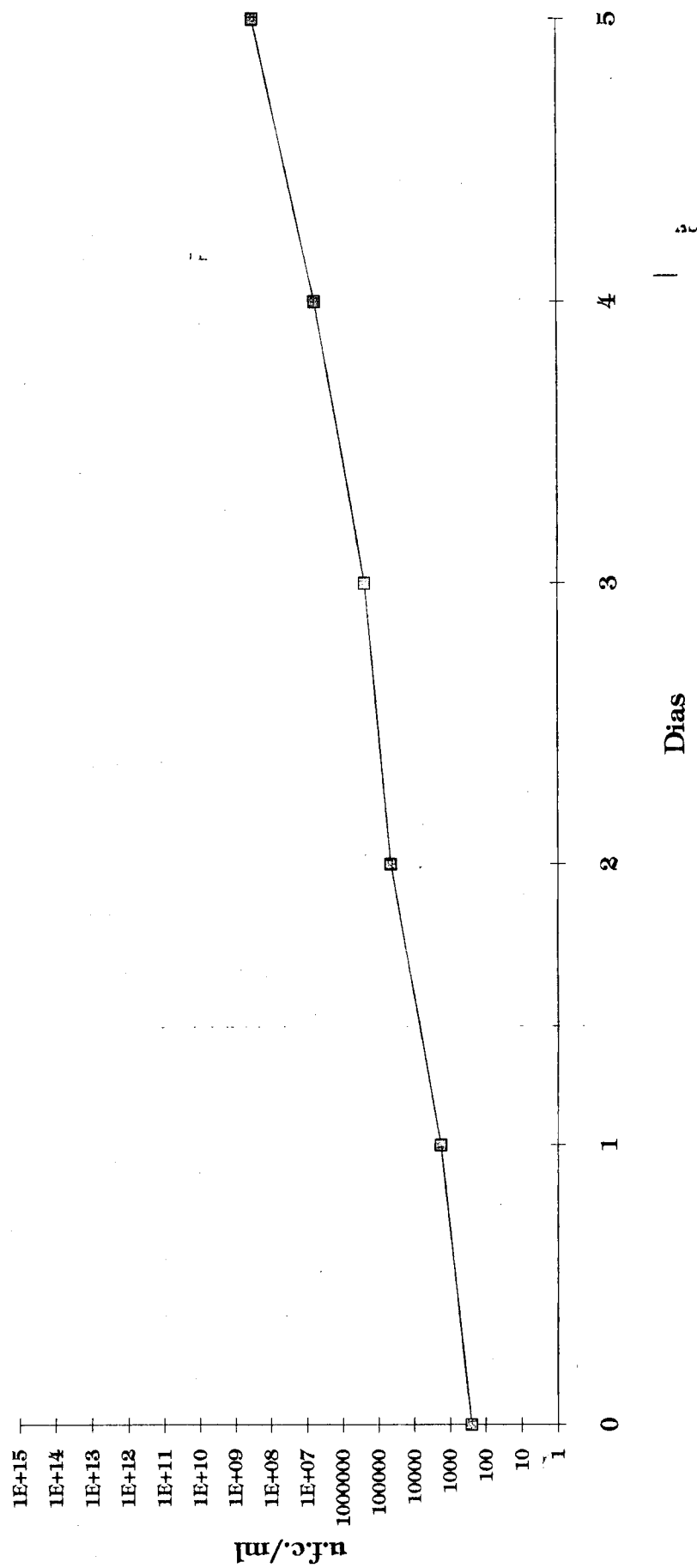
##### CONTAGEM DA POPULAÇÃO BACTERIANA À SAÍDA DA FÁBRICA (DIA "0")

Bactérias Aeróbias Mesófilas
248,5 u.f.c./ml

##### EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO BACTERIANA AERÓBIA MESÓFILA NO LEITE PASTEURIZADO ARMAZENADO NO FRIGORÍFICO ( 4 °C )

Temperatura ( °C )	Tempo ( dias )	Microrganismos Aeróbios Mesófilos após incubação a $30 \pm 1$ °C ( u.f.c./ml )
4 °C	1	1 800
	2	440 000
	3	233 300
	4	5 667 000
	5	> 300 000 000

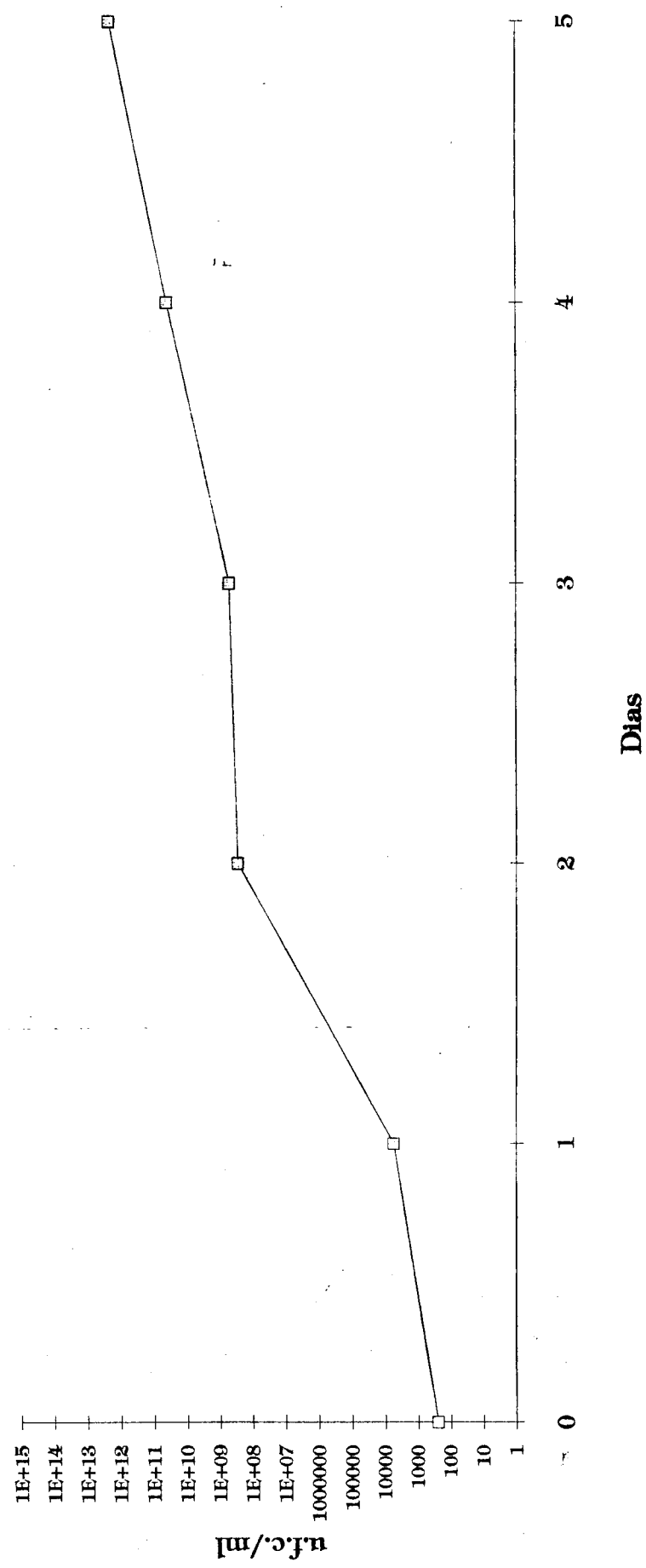
*Evolução Gráfica da População Bacteriana Aeróbia Mesófila no Leite  
Pasteurizado Armazenado no Frigorífico (4 °C)*



EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO BACTERIANA AERÓBIA MESÓFILA NO  
LEITE PASTEURIZADO ARMAZENADO À TEMPERATURA AMBIENTE  
( 15 -18 °C )

Temperatura ( °C )	Tempo ( dias )	Microrganismos Aeróbios Mesófilos após incubação a 30 ± 1 °C ( u.f.c./ml )
Min. 15 °C Máx. 18 °C	1	5 600
	2	290 300 000
	3	520 000 000
	4	40 660 000 000
	5	2 153 000 000 000

*Evolução Gráfica da População Bacteriana Aeróbia Mesófila no Leite Pasteurizado Armazenado à "Temperatura Ambiente" (15 - 18 °C)*

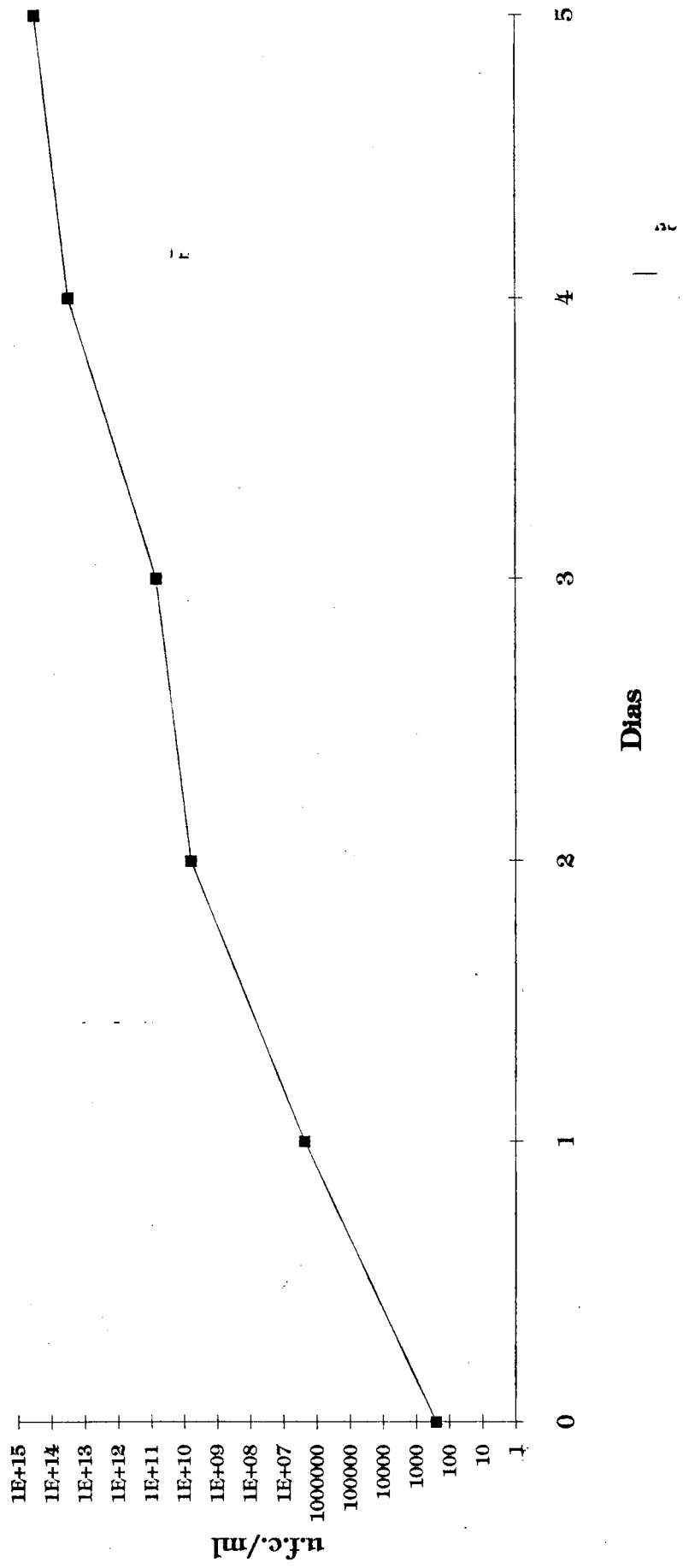


EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO BACTERIANA AERÓBIA MESÓFILA NO  
LEITE PASTEURIZADO ARMAZENADO NA ESTUFA  
DE 30 °C

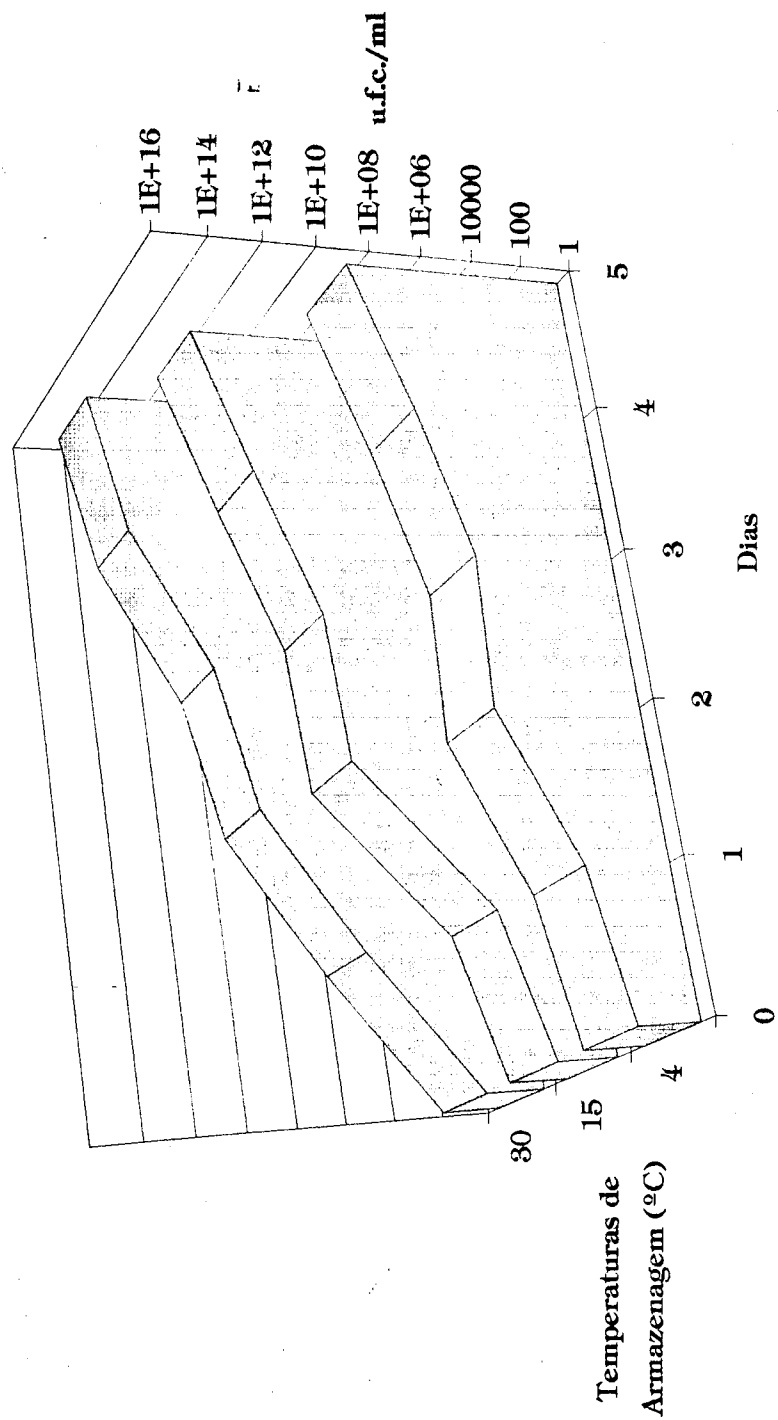
Temperatura (°C)	Tempo ( dias )	Microrganismos Aeróbios Mesófilos após incubação a 30 ± 1 °C (u.f.c./ml)
30 °C	<b>1</b>	2 333 000
	<b>2</b>	5 967 000 000
	<b>3</b>	68 670 000 000
	<b>4</b>	> 30 000 000 000 000
	<b>5</b>	> 300 000 000 000 000



*Evolução Gráfica da População Bacteriana Aeróbia Mesófila no Leite  
Pasteurizado Armazenado na Estufa (30 ± 1 °C)*



**Gráfico Comparativo da Evolução da População Bacteriana Aeróbia Mésófila em Leite Pasteurizado Armazenado a Diferentes Temperaturas**



## 5 - DISCUSSÃO

Como era de esperar, verifiquei que, o crescimento microbiano do leite submetido à temperatura de 4 °C, ao longo dos 5 dias de estudo, foi inferior ao obtido para as outras temperaturas.

Isto deve-se ao facto das bactérias que constituem a população normal do leite, retardarem o seu crescimento, quando este produto é colocado no frio. Por esta razão, estas temperaturas são frequentemente recomendadas para a armazenagem de géneros alimentares facilmente perecíveis, como o leite.

Em relação à contagem das Bactérias Aeróbias Mesófilas no leite mantido à temperatura ambiente (que oscilou entre 15-18 °C durante a semana de trabalhos), houve uma evolução mais marcada, do primeiro para o segundo dia e a partir do terceiro dia.

É importante salientar o facto daquelas pessoas que deixam o leite sujeito à temperatura ambiente, contribuindo para o aumento da sua população bacteriana.

Nas contagens do leite mantido a 30 °C, verifica-se que o número de unidades formadoras de colónias, aumenta com extrema rapidez ao longo dos dias.

## 6 - CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho, pude concluir que a população Bacteriana Aeróbia Mesófila do leite pasteurizado, aumentou ao longo dos dias.

Quanto mais elevada foi a temperatura de armazenagem, mais rápido foi o crescimento das bactérias. Estes resultados demonstram que o leite pasteurizado deve ser conservado a baixas temperaturas, caso contrário, degrada-se rapidamente.

Apesar do período de durabilidade máxima deste produto ser de cinco dias, enquanto conservado no frio, não posso afirmar que o leite não pode ser ingerido dentro deste prazo, dado que, com o tratamento térmico a que é submetido na pasteurização, a maioria dos microrganismos patogénicos são destruídos. Além disso, devido ao número reduzido de amostras analisadas por dia (devido à indisponibilidade de material), não posso fazer comparação com dados conhecidos.

## Bibliografia:

1 - Ferreira Gonçalves F.A., Nutrição Humana, Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.

2 - Ferreira Gonçalves F.A., Tabela da Composição dos Alimentos Portugueses, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Lisboa e Porto), 1985.

3 - Bourgeois C.M., Mescle J. F., Zucca J., Microbiologie Alimentaire, Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires, tome 1.

4 - Norma Portuguesa n<sup>a</sup> 574 de 1974.

5 - Brock Thomas D., Brock Katherine M., Ward David M., Basic Microbiology with Applications, 3<sup>a</sup> edição, 1986.

6 - Harrigan W.F. e Park, R.W.A. Making safe food: A management guide for microbiological Quality. Editora Academic Press, 1991.