



## CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PRESENTES NO LEITE DE PRODUTORES DO REQUEIJÃO MORENO

OLIVEIRA, H.M.<sup>1</sup>; GOMES, D.G.A.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, JESUS, G.P.<sup>1</sup>; N.E.R.<sup>1</sup>; CARVALHO, B.C.P.M<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Discente do curso superior em Engenharia de Alimentos do IFNMG – Campus Salinas; <sup>2</sup>Docente do IFNMG – Campus Salinas.

### Introdução

Leite, na ausência de qualquer outra especificação, é definido como o produto resultante da ordenha integral e contínua, conduzida sob rigorosas condições de higiene, proveniente de vacas saudáveis, que estejam em um estado adequado de nutrição e repouso. Leite obtido de outras espécies animais deve ser rotulado de acordo com a espécie da qual foi extraído (BRASIL, 2002).

O leite possui uma microbiota benéfica constituída pelas bactérias ácido-láticas (BAL) que participam da etapa de fermentação de produtos lácteos fermentados como queijos. Essa fermentação pode ocorrer de forma natural, como no requeijão moreno, ou de modo induzido. Essas bactérias exibem morfologias que variam entre as formas de bacilos, cocos e cocobacilos. São microrganismos Gram positivos não esporulados, predominantemente anaeróbios facultativos, ausentes de enzima catalase (SILVA *et al.*, 2018).

O requeijão moreno é um queijo artesanal oriundo do norte de Minas Gerais, obtido a partir da fermentação láctica natural do leite *in natura*. O objetivo do presente estudo foi obter a concentração de BAL presente no leite de produtores de requeijão moreno de dois municípios do norte de Minas Gerais, Fruta de Leite e Salinas.

### Material e Métodos

#### Material

Três amostras de 150 mL de leite de dois produtores provenientes dos municípios de Fruta de Leite – MG e Salinas – MG, totalizando 6 amostras, foram coletadas em sacos estéreis. As amostras foram congeladas no próprio estabelecimento e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia do IFNMG – Campus Salinas, onde permaneceram a aproximadamente -18 °C até o momento da análise. Para o descongelamento, as amostras foram mantidas sob refrigeração (8 °C) por 24 h.

#### Métodos

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do IFNMG – Campus Salinas de acordo com metodologia descrita por Brasil (2004), Silva *et al.* (2018) e Frank; Yousef (2004).

Para realizar a contagem de BAL, cada amostra foi homogeneizada e 25 mL foram adicionados em 225 mL de água peptonada 0,1% (H<sub>2</sub>O<sub>P</sub>) para obtenção da diluição 10<sup>-1</sup>. Em seguida, a amostra diluída foi homogeneizada vertendo o frasco 25 x. Para elaboração das diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>, 1 mL das

<sup>1</sup> Discente; Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, *campus* Salinas

<sup>2</sup> Docente; Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, *campus* Salinas.

\*E-mail: hmdo1@aluno.ifnmg.edu.br



diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foi inoculado em tubo contendo 9 mL de  $H_2O_p$  0,1%, respectivamente. As diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram homogeneizadas em vortex (Biomixer<sup>®</sup>, Brasil) por 10 s. Posteriormente, por meio do método de profundidade, 1 mL de cada diluição foi inoculado em duas placas de Petri (duplicata) e ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Tm media<sup>®</sup>, Índia) foi adicionado sobre a amostra. A amostra foi misturada ao meio de cultura com movimentos em forma de oito das placas em uma superfície plana com 8 repetições. Esperou-se o endurecimento do meio e adicionou-se mais ágar MRS às placas, quantidade suficiente para cobrir toda a superfície. Após endurecimento do meio adicionado, as placas foram incubadas invertidas a  $37 \pm 1$  °C por 48 h. Para a contagem das BAL, foram selecionadas placas contendo de 25 a 250 colônias, selecionadas 5 colônias e realizados os testes de coloração de Gram e catalase (FRANK; YOUSEF, 2004).

Para a coloração de Gram, utilizou-se o método de Hucker, em que uma gota de solução salina (NaCl 0,85%) (Nuclear<sup>®</sup>, Brasil) foi colocada em uma lâmina de vidro estéril e sobre esta foi emulsionada parte da colônia selecionada. Com auxílio de um bico de Bunsen, realizou-se a fixação do esfregaço. Em seguida, o esfregaço foi coberto com solução cristal violeta (Êxodo Científica<sup>®</sup>, Brasil) 1% (m/v) por 1 min., lavado com água destilada, coberto com solução de iodo (Dinâmica<sup>®</sup>, Brasil) 1% (v/v) por 1 min., lavado novamente sequencialmente com água destilada, etanol 95% por 30 s e água destilada, coberto com solução de safranina (Brasil) 0,5% (m/v) por 10 s e lavado com água destilada. Por fim, pingou-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina que foi visualizada em microscópio óptico (Euromex<sup>®</sup>, Holanda) com aumento de 100 x para observação da cor (SILVA *et al.*, 2018).

Para o teste de catalase, uma gota de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 3% e outra parte da colônia foi adicionada à lâmina. Observou-se se houve (catalase positiva) ou não (catalase negativa) a formação de bolhas (BRASIL, 2004). Foram consideradas BAL as colônias que se apresentaram como Gram positivas e catalase negativas. A contagem de BAL foi expressa em notação científica através da Equação 1.

$$BAL = \frac{P1 + P2}{2} \times \text{inverso do } f_{\text{diluição}} \times f_{\text{colônias confirmadas como BAL}} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde, BAL é a contagem de bactérias ácido-láticas; P1 e P2 são a quantidade de colônias presentes na placa 1 e placa 2 da diluição selecionada, respectivamente;  $f_{\text{diluição}}$  é o fator de diluição selecionado para contagem;  $f_{\text{colônias confirmadas como BAL}}$  é o fator gerado a partir da porcentagem do número de colônias confirmadas como BAL 0 a 100% (0 – 1, respectivamente).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação das médias aritméticas, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey utilizando o programa estatístico Minitab<sup>®</sup> 19.1 (2019). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Os dados da pesquisa são resultados parciais do projeto de extensão intitulado “Criação de um banco de cultura láctica para o requeijão moreno produzido em Salinas – MG” do EDITAL N° 84/2023 - PROEXC/IFNMG, DE 14 DE MARÇO DE 2023.

O leite do produtor de Fruta de Leite – MG apresentou concentração de BAL ( $6,8 \pm 1,8 \times 10^4$  UFC/mL) superior ao de Salinas – MG ( $1,4 \pm 0,3 \times 10^4$  UFC/mL) ( $p < 0,05$ ). Essa diferenciação pode estar relacionada à alimentação dos animais ordenhados, ambiente de ordenha, condições climáticas da cidade, condições de armazenamento da matéria-prima, dentre outros.

Silveira *et al.* (2019) observaram que 55% das amostras de leite cru provenientes de Bom Jesus do Itabapoana – RJ apresentaram contagem de  $10^4$  UFC/mL. Bettera *et al.* (2023) observaram uma



concentração de  $1,9 \times 10^6$  UFC/mL em leite cru para produção do queijo *Camembert de Normandie*. Teye *et al.* (2021) observaram uma concentração de  $4,5 \times 10^7$  UFC/mL no leite coletado na região de Bahir Dar na Etiópia. Sendo assim, observa-se uma variação na concentração de BAL em relação à região de coleta.

### Considerações finais

O leite cru obtido de produtores do requeijão moreno dos municípios de Fruta de Leite - MG e Salinas - MG apresentou uma concentração de  $6,8 \pm 1,8 \times 10^4$  UFC/mL e  $1,4 \pm 0,3 \times 10^4$  UFC/mL ( $p < 0,05$ ), respectivamente. A concentração de BAL se diferencia de acordo com os locais de obtenção do leite.

### Agradecimentos

Ao Instituto Federal do Norte Minas Gerais (IFNMG) – *Campus Salinas* pelo apoio financeiro da bolsa de extensão concedida. Aos produtores que contribuíram com a doação das amostras e à Emater pela parceria

### Referências

- BRASIL. ANVISA, CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR, IX., 2004, Salvador. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde** [...]. [S. l.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 381 p. v. 1. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf). Acesso em: 6 fev. 2023.
- BETTERA, Luca et al. Lactic acid bacteria in cow raw milk for cheese production: Which and how many?. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1092224, 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002.
- FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Tests for groups of microorganisms. In: WHER, H. M.; FRANK, J. F. (eds), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2004. Chapter 8, p. 227-248
- SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2018. 535 p
- TAYE, Yeshambel et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. **The Scientific World Journal**, v. 2021, 2021.
- Silveira, L. P. M., Dias, N. D. O. S., de Almeida, P. S., de Paula Silva, L. A., & Bastos, P. A. M. B. (2019). Contagem, isolamento e atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas autóctones obtidas de leite cru. *Confict*, 11.