

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Natália Lima Myazaki

**Identificação e quantificação de bactérias em queijo colonial utilizando as
regiões V3-V4 do gene 16S rRNA**

Florianópolis

2021

Natália Lima Myazaki

Identificação e quantificação de bactérias em queijo colonial utilizando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Orientador: Profa. Dra. Silvani Verruck

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Myazaki, Natália

Identificação e quantificação de bactérias em queijo colonial utilizando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA / Natália Myazaki ; orientador, Silvani Verruck, 2021. 82 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Bactérias . 3. Queijos artesanais. 4. Metagenômica. I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Natália Lima Myazaki

Identificação e quantificação de bactérias em queijo colonial utilizando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso Ciência e Tecnologia de Alimentos

Florianópolis, 04 de maio de 2021.

Prof.^a Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Silvani Verruck
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Carlise Beddin Fritzen Freire
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Marília Miotto
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe, aos meus queridos pais e familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora por toda a paciência, apoio e carinho nesse momento tão especial de encerramento de um ciclo.

Ao meu avô que tão pouco tempo infelizmente não pode compartilhar com a minha família o meu egresso em uma Universidade Pública.

Aos meus pais, ao meu irmão, minha avó Yolanda, a minha prima Mariana e colegas de classe por todo incentivo. Em especial a Michelly, a Cássia e a Bruna que me auxiliaram, me apoiaram e me ensinaram muito ao longo de todo o curso.

Aos meus amigos fiéis de Rio Preto, Rosalha, João Paulo e João Victor que compartilharam comigo mesmo a distância essa fase tão conturbada e difícil que foi estar fora.

A todos os professores da Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, por todo aporte na minha formação.

RESUMO

Os queijos artesanais de leite cru são tradicionalmente produzidos e consumidos no mundo todo, sendo que suas propriedades sensoriais variam de acordo com a região na qual são fabricados, por conta da microbiota características de cada região além do saber-fazer específicos. No Brasil, o Estado de Santa Catarina nos últimos anos tem se destacado na elaboração deste tipo de produto por conta da alta produtividade leiteria e apoios jurídicos na comercialização de queijos artesanais, principalmente os denominados queijos Coloniais. Apesar dos surtos de doenças transmitidas por alimentos terem apresentados resultados menores nos últimos anos, dados epidemiológicos de DTAs relacionadas ao consumo de queijos são escassos, por conta disso o mapeamento microbiológico desses alimentos é extremamente importante para assegurar a saúde do consumidor. Visando a melhor especificidade e identificação de bactérias em alimentos, as ferramentas microbiológicas clássicas que dependem de cultivo estão dando espaço ao uso de ferramentas avançadas de identificação bacteriana, como o sequenciamento do genoma bacteriano. Essas por sua vez, permitem a compreensão completa da ecologia bacteriana destes produtos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a microbiota predominante no Queijo Colonial de leite cru, através do uso de sequenciamento genético. Para isso, a identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho de segunda geração (MiSeq Sequencing System) das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA usando os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG), e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. Foram encontrados 4 filós, 30 gêneros e 57 espécies na amostra. Sendo as espécies *Lactococcus lactis* (30,63%), *Corynebacterium variabile* (17,91%), *Enterococcus sp.* (17,4%), *Bifidobacterium psychraerophilum* (7,24%) e *Enterobacteriaceae bacterium* (6,81%) as mais abundantes, uma vez que essas são bactérias naturalmente encontradas na matéria prima. Os resultados em relação ao microbioma estão de acordo com os apresentados em outros estudos com queijos de leite cru produzidos no mundo todo, uma vez que os microrganismos identificados na amostra fazem parte das bactérias lácticas derivadas tanto da matéria prima, quanto do ambiente de fabricação. Além disso, apresentam expressiva importância nas características que os queijos irão adquirir ao decorrer do processo de maturação, podendo contribuir com funcionalidades probióticas e/ou antimicrobianas.

Palavras-chave: Queijo artesanal. Bactérias. Metagenômica.

ABSTRACT

Artisanal raw milk cheese is traditionally produced and consumed all over the world, with its sensory properties varying depending on the differences in the microbiota and the production methods used in each region. In the last few years, the state of Santa Catarina, Brazil, has shown great potential of production of raw milk cheese, due to its intensive dairy farming activities and, the support from legal entities, and the market of artisanal dairy products. Despite the drop in cases of food transmitted diseases the last few years, epidemiological data on cheese related diseases is still short, therefore the microbiological analysis of these aliments is crucial to insure the consumer's health. Looking to improve the ability to identify bacteria in food, classical microbiology techniques depending on colony culture are getting out of use, and giving room to more advanced tools, like bacterial genome sequencing, allowing full comprehension of the bacterial ecology of those products. Consequently, the goal of this research is to evaluate the microbiota present in raw milk Colonial Cheese through the use of genetic sequencing, using the high-performance system MiSeq Sequencing System, from the regions V3/V4 of the 16S rRNA using the 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primers, running on 300 cycles and single-end sequencing. The results showed that there were 4 phyllos, 30 genera and 57 species in the sample, among them *Lactococcus lactis* (30,63%), *Corynebacterium variable* (17,91%), *Enterococcus* sp. (17,4%), *Bifidobacterium psychraerophilum* (7,24%), *Enterobacteriaceae* bacterium (6,81%), all naturally found in milk. The results obtained on the microbiome are in line with other studies on raw milk cheese across the globe, considering that the microorganisms are naturally found in both the raw material and the production environment. Furthermore, the microorganisms also play an important role on the characteristics obtained in the ripening process, the probiotic and antimicrobial functions.

Keywords: Artisanal cheese 1. Bacteria 2. Metagenomics 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapeamento Slow Food Brasil (2014) dos principais tipos de queijos artesanais produzidos no sul do Brasil.....	18
Figura 2- Fluxograma de produção do queijo colonial.....	19
Figura 3- Fluxograma de produção do queijo Serrano.....	20
Figura 4- Abundância relativa de filos presentes no queijo artesanal.....	39
Figura 5- Abundância relativa de gêneros presentes no queijo artesanal.....	41
Figura 6- Abundância relativa das espécies de bactérias lácticas no queijo artesanal.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diversidade microbiana em queijos artesanais brasileiro.....	29
Tabela 2- Diversidade microbiana em queijos utilizando ferramentas metagenômicas.....	33
Tabela 3- Quantidade de sequências identificadas das espécies mais abundantes.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NSLAB- Bactéria láctea não iniciadora

PAB- Bactéria de ácido propiônico

BL- Bactérias lácticas

SLST- Tipagem por Sequenciamento de Único Locus

MLST- Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci

WGST- Tipagem por Sequenciamento Completo do Genoma

PCR- Reação em Cadeia Polimerase

DTA- Doença Transmitida por Alimento

BPA- Boas Práticas Agropecuárias

GRAS- Geralmente Reconhecido como Seguro

RTIQ- Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

UFC- Unidade Formadora de Colônia

ADGI- Agmatina disiminase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	OBJETIVOGERAL.....	16
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	QUEIJOS ARTESANAIS.....	17
2.2	A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA PARA QUEIJOS ARTESANAIS.....	21
2.3	IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM QUEIJOS ARTESANAIS USANDO FERRAMENTAS MICROBIOLÓGICAS CLÁSSICAS.....	26
2.4	IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM QUEIJOS ARTESANAIS USANDO FERRAMENTAS GENÔMICAS OU METAGENÔMICA.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	AMOSTRA.....	37
3.2	ANÁLISE METAGENÔMICA.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5	CONCLUSÃO.....	56
6	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Queijo é o produto obtido pela separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído através da ação de agentes coagulantes físicos, bactérias ou enzimas específicas ou ácidos orgânicos, podendo ser consumido fresco ou maturado acrescido ou não de especiarias, aditivos, aromatizantes e corantes (BRASIL, 1996). Além de estarem entre os produtos lácteos mais exportados pelo Brasil, os queijos são os que apresentam maior taxa de crescimento de vendas nos últimos anos no mercado externo (CARVALHO; ROCHA, 2019). Sendo que além da produção industrial, há também a produção de forma artesanal que, por sua vez, pode apresentar-se como a principal fonte de renda principalmente de pequenos produtores rurais (CORREIA; ASSIS, 2017). Os queijos artesanais brasileiros são aqueles elaborados por métodos tradicionais que possuem vinculação e valorização territorial, regional ou cultural e que respeitam os protocolos de elaboração estabelecidos para cada variedade (BRASIL, 2019).

Minas Gerais é responsável por cerca de 50% da produção de queijos industrializados e artesanais no território nacional (PIMENTEL; OLIVEIRA; CRUZ, 2017), tendo destaque as regiões do Serro e da Canastra com a produção de queijos artesanais (CORREIA; ASSIS, 2017). Porém o Sul do Brasil está ganhando destaque com esses tipos de produtos e são exemplos os queijos Serrano e Colonial (KAMIMURA *et al.*, 2019). No Estado de Santa Catarina em 2019, o Decreto nº362 regulamentou a Lei nº 17486 de 2018 que dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru no Estado (SANTA CATARINA, 2018, 2019). Foi computada em 2017 uma produção de 8.210 toneladas de queijos artesanais nesta região, conforme o censo agrícola brasileiro (CARVALHO; ROCHA, 2019). O leite cru para elaboração do queijo deve ser recém-ordenhado da própria fazenda ou de outras propriedades próximas, desde que atendam todos as normas técnicas sanitárias, para depois ser beneficiado por meio de métodos tradicionais que mantenham as características histórico-culturais e regionais, utilizando mão de obra predominantemente familiar e respeitando as boas práticas de fabricação com a garantia da segurança alimentar (SANTA CATARINA, 2019).

Sabe-se que somente microrganismos facilmente cultiváveis podem ser detectados por metodologias convencionais (SHARMA; LEE; PARK, 2020). Por conta disso, os estudos da composição microbiana de produtos fermentados já foram realizados por métodos tradicionais de contagem de bactérias em placas, isolamento e identificação bioquímica dos

microrganismos (SHARMA; LEE; PARK, 2020).

A utilização de ferramentas mais avançadas está sendo aplicadas para a identificação e caracterização da microbiota presente em produtos artesanais, como por exemplo o sequenciamento genético de amplo espectro dos microrganismos. Com o desenvolvimento da microbiologia molecular e a descoberta de que o DNA carrega informações hereditárias, indicando que todas as propriedades dos microrganismos estão criptografadas no genoma (MARDANOV; KADNIKOV; RAVIN, 2018), tornou-se possível o uso de métodos moleculares para identificação dos microrganismos presentes em alimentos, entre estes os produtos fermentados (FRANCIOSA *et al.*, 2018).

Neste sentido, a metagenômica destaca-se por executar o sequenciamento para a identificação de toda a microbiota de uma amostra através de genes marcadores como o gene 16S para as bactérias, sendo que nessa parte do DNA existem regiões conservadas que permitem a comparação dos pares de bases entre as espécies (COCOLIN; RANTSIOU, 2007; ERCOLINI, 2004). Além disso, a particularidade bacteriana é ampliada com a identificação taxonômica de regiões hiper sensíveis como, V3 e V4 (ZHANG *et al.*, 2018). Esta metodologia apresenta resultados a nível taxonômico do filo até a espécie do microrganismo identificado, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos como o GreenGene e RibosomalDatabase (DE CESARE, 2019; FRANCIOSA *et al.*, 2018). A partir dessas metodologias é possível identificar a microbiota de qualquer alimento, entre eles os queijos artesanais. Desta forma é possível entender a relação entre os microrganismos, suas atividades e funcionalidades no alimento (FRANCIOSA *et al.*, 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é avaliar a microbiota bacteriana presente em queijo artesanal colonial produzido na cidade de Seara (SC), através do uso de sequenciamento genético das populações presentes neste produto.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar o microbioma bacteriano presente em amostras de queijo artesanal utilizando como base as regiões V3-V4 do gene 16S;
- Sequenciar as amostras utilizando o sistema Diagnóstico Microbiológico Digital;
- Analisar o metagenoma através da plataforma Miseq da Illumina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJOS ARTESANAIS

Mundialmente o leite está entre os cinco produtos mais comercializados e no cenário nacional o setor é o segundo mais importante das indústrias de alimentos (SIQUEIRA, 2019). A produção de leite na região sul do Brasil em 2018 foi de 12 bilhões de litros, e o estado de Santa Catarina respondeu por 24,9% desta produção, sendo a região oeste a mais produtiva (EMBRAPA, 2019). Durante a pandemia mesmo com o panorama econômico mundial prejudicado, uma pesquisa realizada pela Embrapa Gado de Leite/Centro de Inteligência do Leite constatou que o consumo de derivados lácteos no Brasil se manteve, sendo o queijo o produto que continuou aparecendo com frequência nas listas de compras (SIQUEIRA,2020).

Em Santa Catarina, além de apresentar números atraentes em relação a produtividade leiteira que incentivam o beneficiamento do leite, foi promulgada a Lei 17.486 de 16 de janeiro de 2018, que permite a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru no Estado. Esta lei define como queijo artesanal “aquele elaborado com leite cru da própria fazenda com métodos tradicionais, com vinculação ao território de origem, conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) estabelecido para cada tipo e variedade, sendo permitida a aquisição de leite de propriedades rurais próximas desde que atendam todas as normas sanitárias pertinentes e com a queijaria localizada na propriedade rural” (BRASIL, 2018).

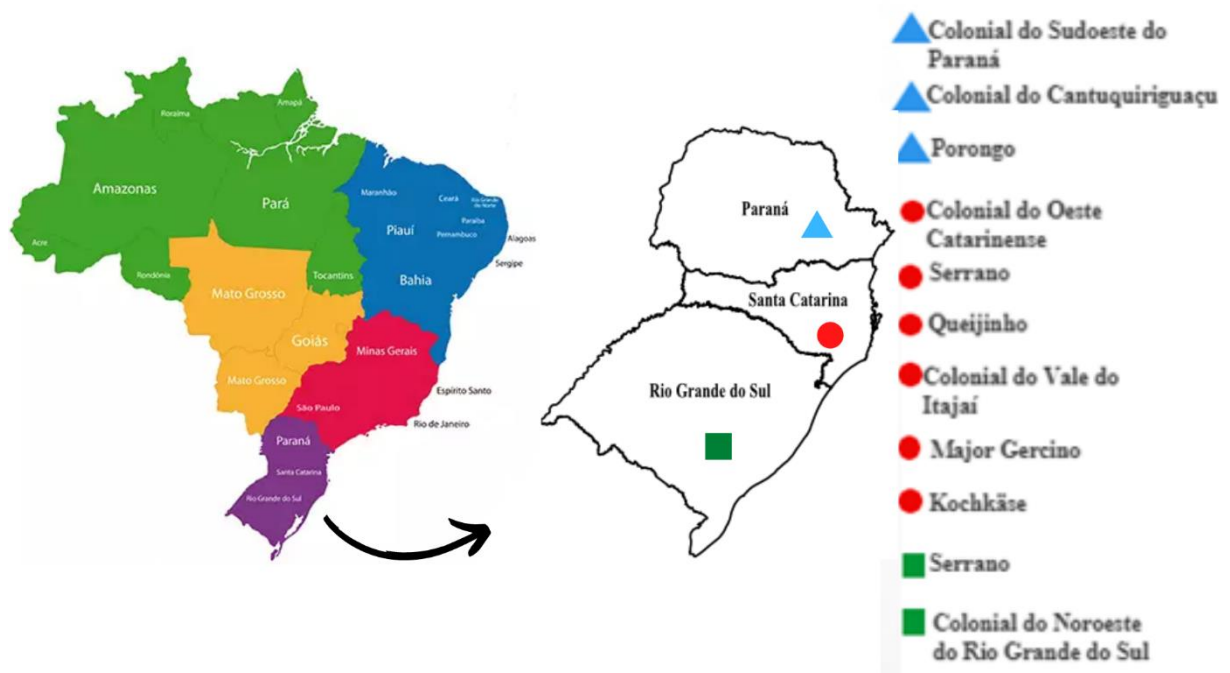
Outra instrução normativa extremamente importante referente a comercialização de queijos artesanais de leite cru é a IN nº 30, de 7 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013). Nesta é definido um novo período de maturação dos queijos artesanais (inferior a 60 dias) antes da sua venda, desde que estudos realizados por órgãos estaduais, federais ou municipais reconhecidos pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal- SISBI/POA comprovem a qualidade e a inocuidade do produto (BRASIL, 2013).

Por poderem ser elaborados a partir do leite cru, ou seja, leites que não passaram por tratamentos térmicos superiores a 40°C, os queijos artesanais de diferentes regiões apresentam derivações em relação a textura, sabor e aroma (CARVALHO *et al.*, 2016; EPAMIG, 2019), fatores esses que os diferenciam dos queijos industriais que são padronizados. Isso por que, além de ocorrerem variações microbianas nas localidades que os leites foram produzidos,

existirem diferentes enzimas naturalmente presentes na matéria prima (EPAMIG, 2019) e há ainda a variação do “saber-fazer” de cada região (SILVA, 2007).

Em 2011, implementou-se no Brasil um grupo internacional denominado de Slow Food, que incentiva a apreciação da comida tradicional, apoiando inclusive a produção de queijos feitos de leite cru, promovendo a valorização, o conhecimento e o aumento no consumo de queijos artesanais (SLOW FOOD, 2014). Por existir uma enorme gama de tipos de queijos artesanais, o grupo fez um mapeamento dessas variedades produzidas em território nacional, incluindo no sul do Brasil (Figura 1). Como proposto pelo movimento, os queijos produzidos artesanalmente estão ganhando cada dia mais mercado, uma vez que os consumidores mais modernos valorizam a produção artesanal, além de acreditarem que são alternativas que auxiliarão na recuperação econômica de produtores rurais (BORELLI *et al.*, 2011).

Figura 1. Mapeamento Slow Food Brasil (2014) dos principais tipos de queijos artesanais produzidos no sul do Brasil



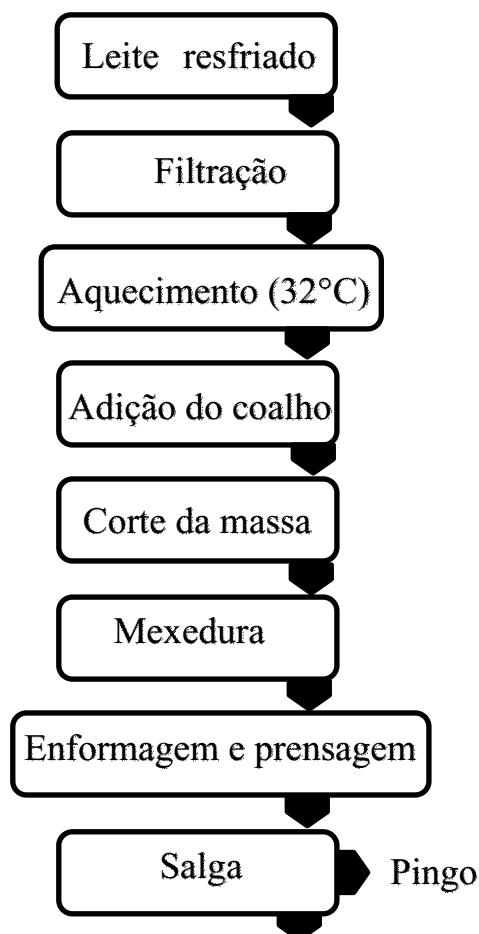
Adaptado de: Slow Food (2014)

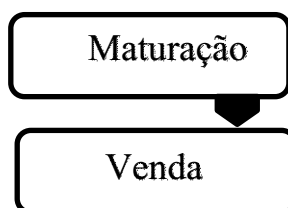
A colonização do sul do Brasil principalmente por italianos e alemães está diretamente relacionada com a produção dos conhecidos queijos coloniais, sendo que naquela época a produção era destinada para o autoconsumo, assim como as massas, as geleias e os vinhos (DORIGON, 2008). Atualmente o cenário da produção do queijo colonial tem mudado, apesar

disso, há indicações de que esse tipo de queijo é o mais produzido nos estados do Sul do país (CARVALHO, 2015). Tais mudanças são influenciadas principalmente pelo êxodo rural e por conta de a produção informal estar sendo substituída por agroindústrias familiares (DORIGON, 2010; DORIGON; RENK, 2011).

O queijo Colonial é produzido com leite cru (CARVALHO *et al.*, 2019; SOUZA; ROSA; AYUB, 2003;), de qualidade com coagulação por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias específicas (SOUZA; ROSA; AYUB, 2003). Deve apresentar coloração amarelada, casca lisa, olhaduras internas distribuídas de forma não uniforme, ser maturado e pode ser ainda, caracterizado como um queijo gordo (45% a 59,9%) e de média umidade (36% a 45,9%) (SANTA CATARINA, 2018). Além disso técnicas higiênico-sanitárias foram implementadas, afim de se evitar falhas durante o processo, intoxicações aos consumidores e comprometimento da qualidade do produto (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007). A Figura 2 apresenta o fluxograma de produção do queijo colonial.

Figura 2. Fluxograma de produção do queijo colonial





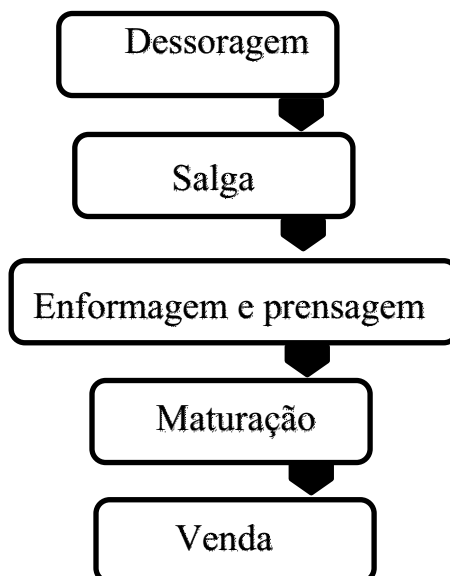
Fonte: Adaptado Foguesatto *et al.* (2014) e Stella *et al.* (2018)

Outro queijo artesanal de grande importância no Sul do Brasil é o queijo Serrano e se mistura com a tradição do queijo colonial. A secular tradição do Queijo Serrano tem forte vínculo com a atividade tropeira na região do Vale do Tubarão (SC), porém naquela época a produção de queijo era uma consequência da comercialização dos animais (SLOW FOOD, 2008). Este queijo apresenta características sensoriais específicas influenciadas por fatores extrínsecos como, ambiente, clima, solo, vegetação, etnia e tradição, bem como pelos fatores humanos, como o saber fazer tradicional e origem histórica (CÓRDOVA *et al.*, 2016) e fatores intrínsecos relacionados com o leite cru que é utilizado na elaboração do queijo como, microrganismos iniciadores que se encontram naturalmente no leite (IDE; BENEDET, 2001).

A lei nº17.003, de 1º de setembro de 2016, dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal Serrano, no Estado de Santa Catarina. A lei considera o queijo artesanal Serrano o produto elaborado, na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, integral e recém-ordenhado, que se obtém por coagulação enzimática do leite, por meio da utilização de coalhos industriais e, no ato da prensagem, utilizando somente o processo manual e cujo produto final apresente massa uniforme e consistência firme, cor e sabor próprios, isento de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição na Região Serrana de Santa Catarina. O fluxograma de processamento do queijo Serrano pode ser observado na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma de produção do queijo Serrano





Fonte: Adaptado Ries; Luz; Wagner (2012)

O mercado de produtos alimentícios *premium*, *gourmet* e artesanais de uns anos para cá são responsáveis por provocarem uma movimentação financeira significativa no mundo todo, influenciada principalmente pelo aumento da facilidade na obtenção de informações que indiretamente incentivam os consumidores a valorizarem mais a culinária e experimentarem novas experiências sensoriais (BARBOSA *et al.*, 2020). Com a ascensão da tendência de produtos artesanais, influenciada pela implementação do selo ARTE (BRASIL, 2019) que permite a venda interestadual de produtos alimentícios artesanais, incentivou em 2020 o investimento de mais de 700 mil reais na formalização da produção de queijos artesanais no estado de Santa Catarina. Esse investimento envolveu a construção de queijarias, a capacitação dos produtores, melhorias na qualidade sensoriais e sanitárias do produto e conseqüentemente o fortalecimento dessa cadeia que é responsável pela renda de inúmeras famílias (EPAGRI, 2020).

2.2 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA PARA QUEIJOS ARTESANAIS

A fermentação de forma geral é definida como um processo que envolve trocas químicas entre os substratos por atividades enzimáticas produzidas por microrganismos vivos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). Dentre os processos bioquímicos que ocorrem durante a fermentação há a formação de energia decorrente da metabolização dos carboidratos, sendo essa energia gerada a responsável pela atividade dos microrganismos. As técnicas fermentativas lácticas são

utilizadas há centenas de anos, inicialmente o principal objetivo era a conservação de alimentos, mas atualmente com o aumento dos conhecimentos sobre a técnica passou a ser utilizada também com o intuito de diversificar os alimentos fermentados, criando novos aromas, sabores e texturas (CHAVES *et al.*, 2019).

O leite é uma matéria de composição complexa e completa (proteínas, gorduras, carboidratos, minerais e vitaminas), o que o torna um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos (O’SULLIVAN; COTTER, 2017). Essas culturas que naturalmente podem estar presentes no leite advêm de várias fontes (saúde do animal, maquinário utilizado na ordenha, contato homem-animal, higienização dos tetos, período de armazenamento pré beneficiamento entre outros) e interferem no processo produtivo (KAMIMURA, 2018; O’SULLIVAN; COTTER, 2017;). Apesar da utilização do leite cru, uma série de condições são impostas durante toda a elaboração de queijos artesanais a fim de garantir a segurança do produto que será comercializado e evitar contaminações durante o processo, como: qualidade do leite, técnicas e locais de fabricação, boas práticas de fabricação e condições de maturação (CARVALHO *et al.*, 2016; EPAMIG, 2019; PEREIRA, 2006).

Na fabricação dos queijos artesanais são dois os principais grupos de microrganismos encontrados: os iniciadores, que podem ser compostos por uma única cultura ou misturas de culturas, sendo esta mistura conhecida como “pingo” no processo artesanal de fabricação de queijos, e o outro grupo são os microrganismos secundários (O’SULLIVAN; COTTER, 2017). Ambos os grupos são responsáveis pelo sabor e aroma dos queijos artesanais, uma vez que estão envolvidos nas reações de proteólise e lipólise que ocorrem durante a maturação. Porém, os microrganismos iniciadores estão relacionados com o desenvolvimento da acidez dos queijos principalmente daqueles com longos períodos de maturação (RESENDE, 2010), enquanto que o segundo grupo está relacionado com as características sensoriais (BERESFORD *et al.*, 2001).

O pingo, considerado o *starter* nativo de soro de leite, é obtido a partir do soro da batelada anterior que é extraído do queijo durante a etapa de prensagem (PERIN *et al.*, 2017; KAMIMURA *et al.*, 2019), sendo que suas características físico-químicas variam conforme a derivação da microbiota que é influenciada pela região de fabricação do queijo artesanal (RAFAEL, 2017). Além disso, tem influência na acidez, no aroma e no sabor dos queijos feitos de leite cru, uma vez que a microbiota do leite sem tratamento térmico é transladada para o queijo (KAMIMURA *et al.*, 2019).

As culturas *starters* para queijos em sua maioria são constituídas por bactérias lácticas (BL). Estas culturas são compostas por microrganismos conhecidos ou não, não formadores de esporos, se apresentam na forma de bastonetes, são imóveis e produzem ácido láctico como principal produto do metabolismo de carboidratos (BACHMANN *et al.*, 2011; GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). Podem ser adicionadas no início do processo ou estarem naturalmente presentes no leite cru; podem ser utilizadas de forma individual ou em *blends* na fabricação dos queijos artesanais e são de extrema relevância, pois a principal função destas é a redução do pH do queijo através da produção de lactato (BACHMANN *et al.*, 2011) por meio da degradação enzimática (lactato desidrogenase) da lactose, como citado anteriormente (O'SULLIVAN; COTTER, 2017). Além de tal capacidade de reduzir o pH também afetam o desfavorecimento do desenvolvimento de bactérias patogênicas e deteriorantes (CHAVES *et al.*, 2019).

As BL podem ser classificadas de duas formas, de acordo com a faixa de temperatura de multiplicação ou de acordo com a via metabólica. Em relação a temperatura, as BL mais usada em culturas starter mesofílicas (22°C e 27°C) é o gênero *Lactococcus lactis*, incluindo as subespécies *L. lactis ssp. lactis* e *L. lactis ssp. cremoris* (PINTO *et al.*, 2019). Por conta da temperatura ótima de crescimento microbiano as culturas mesofílicas são utilizadas principalmente na produção de queijos frescos com massa crua ou semi-cozida (COSTA *et al.*, 2017). Esses iniciadores mesofílicos podem ser compostos por uma única ou por uma mistura de cepas acidificantes e bactérias lácticas que fermentam o citrato (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018).

Já as culturas termofílicas (30°C e 42°C) que apesar de possuírem esporos não produzem toxinas e conseqüentemente não provocam danos à saúde dos consumidores, incluem linhagens do gênero *Streptococcus thermophilus* (PEREIRA; SANTANA; SANTOS, 2020; PINTO *et al.*, 2019), podendo ser termofílicas facultativas (50°C a 66°C) ou termofílicas obrigatórias nas quais os esporos germinam e crescem em temperaturas superiores a 50°C (PINTO *et al.*, 2019). Pelo grupo desses microrganismos resistirem a tratamentos com temperatura mais elevadas, são utilizados principalmente em queijos de massas cozidas (COSTA *et al.*, 2017).

Além dessas duas categorias há ainda as bactérias psicrotróficas (14°C e 20°C), que são originárias principalmente quando ocorre deficiências em relação a falta de boas práticas no momento da ordenha (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009; PINTO *et al.*, 2019). Estas por sua vez são capazes de se multiplicar no leite cru mesmo quando refrigerado em temperaturas inferiores a 7°C por apresentarem um sistema metabólico específico para isso.

Por conta disso, podem provocar problemas relacionados a proteólise e lipólise do leite, como consequências dessas reações enzimáticas tem-se o desenvolvimento de substâncias indesejáveis no queijo de leite cru e redução no rendimento das indústrias queijeiras (PINTO *et al.*, 2019). Outro problema causado por essas bactérias é em relação as taxas de fermentação na fabricação de derivados lácteos, uma vez que as lipases podem interferir de forma negativa na atividade das bactérias lácticas (PINTO *et al.*, 2019). Deste grupo os principais representantes encontrados no leite cru são os gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009; PINTO *et al.*, 2019).

Na classificação de acordo com os metabólitos da fermentação, as BL são classificadas em dois subgrupos, sendo eles: homofermentativas, que tem como produto majoritário da fermentação o ácido láctico e os principais microrganismos homofermentativos são *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactiplantibacillus plantarum*. As bactérias heterofermentativas, além de produzirem ácido láctico produzem também álcool, ácido acético, dióxido de carbono e compostos flavorizantes, os principais microrganismos são *Levilactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* (CHAVES *et al.*, 2019). E por fim, as bifidobactérias, estas são muito aplicadas em produtos lácteos fermentados por estarem relacionadas com a diminuição de incidências de alergias (BJÖRKSTÉN *et al.*, 2001). Elas apresentam fermentação heterolática facultativa, ou seja, pode haver a formação de ácido láctico e acético sem produzir dióxido de carbono (CHAVES *et al.*, 2019).

Em relação a microflora secundária, quando adicionada intencionalmente no leite é definida como fermento láctico ou quando está presente no próprio ambiente é definida como microflora natural. São exemplos de fermentos secundários os bolores e as leveduras, sendo esse grupo de microrganismos os responsáveis pela distinção de cada tipo de queijo (CHAVES *et al.*, 2019; O'SULLIVAN; COTTER, 2017). A microflora secundária pode ser dividida basicamente em dois grupos, sendo eles: bactérias do ácido láctico não iniciadoras (NSLAB) e as bactérias do ácido propiônico (PAB).

As NSLAB são grupos de bactérias originárias do próprio leite ou do ambiente processador de queijos e derivados lácteos (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018). Isso porque apesar de não serem bactérias fermentadoras fazem parte da cultura inicial, uma vez que

permanecem no leite pasteurizado (COSTA *et al.*, 2017). Embora existam rigorosas leis de boas práticas de fabricação que devem ser aplicadas nas indústrias de laticínios, bactérias desse grupo já foram isoladas do chão, de ralos, de superfícies de equipamentos e de embalagens a vácuo, isso por que as NSLAB especialmente as mesofílicas possuem a capacidade de formar biofilmes e dessa forma resistir aos tratamentos de limpeza e desinfecção (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018).

Elas não se desenvolvem bem no leite, pois utilizam o substrato da lactose residual da acidificação que ocorre na fase inicial e não interferem na produção de ácido. Apesar disso estão diretamente relacionadas com o processo de maturação dos queijos de leite cru (BERESFORD *et al.*, 2001; COGAN *et al.*, 1997) uma vez que sua população tende a aumentar nos primeiros meses, podendo ser dominante durante um período desse processo (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; SOUSA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001). Além de contribuir positivamente com o sabor do queijo por liberarem aminoácidos livres decorrentes da degradação de caseínas e peptídeos. Por outro lado, contribuem de forma negativa na formação de aromas, pois os aminoácidos liberados podem dar origem a compostos voláteis como butano e cetona (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Dos lactobacilos dessa categoria, os mais frequentemente encontrados são os lactobacilos facultativamente heterofermentativos (BERESFORD *et al.*, 2001) das espécies *Lacticaseibacillus casei*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum* (COSTA *et al.*, 2017).

O grupo das bactérias do ácido propiônico (PAB) são naturalmente encontradas no leite cru e são responsáveis pela metabolização do lactato em ácido propiônico (BACHMANN *et al.*, 2011; BERESFORD *et al.*, 2001). A concentração desses microrganismos deve ser muito bem controlada, uma vez que causam problemas tecnológicos nos queijos artesanais durante o processo de maturação como, formação de manchas marrons, sabor doce atípico e estufamento tardio (BACHMANN *et al.*, 2011). Os principais gêneros de PAB são *Propionibacterium freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionic*, *P. cyclohexanicum* e *P. coccoidespropostos*, estas são responsáveis pelo sabor e aroma dos queijos artesanais através da produção de gás e álcool, além da formação de olhaduras características (BERESFORD *et al.*, 2001; O'SULLIVAN; COTTER, 2017).

Além da variação dos tipos de microrganismos que são empregados na fabricação dos queijos, a etapa de maturação também é um fator que contribui para variação das características específicas de cada tipo de queijo, uma vez que nesse momento ocorre a formação do sabor e

do aroma dos queijos artesanais (ORDÓÑEZ, 2005; ROCHA, 2004). Isso porque nesta etapa estão envolvidos processos bioquímicos, físicos e microbiológicos, com destaque para a degradação de açúcares, proteínas e lipídios por ação de microrganismos naturalmente presentes no leite sem tratamento térmico ou enzimas específicas, que alteram a composição química dos queijos (PERRY, 2003). Nesse período os aminoácidos são convertidos em compostos de sabor por reações enzimáticas de proteólise que convertem a caseína em aminoácidos livres; lipólise que convertem os triglicerídeos em ácidos graxos livres com subsequente formação de voláteis intensificadores de sabor (BACHMANN *et al.*, 2011; O'SULLIVAN; COTTER, 2017).

Além de na maturação ocorrer a construção sensorial dos queijos artesanais, ela influencia no desenvolvimento microbiológico das bactérias que estavam presentes no leite *in natura* e que conseqüentemente passarão para o queijo. Neste processo, quando as condições sanitárias são ideais, algumas espécies são favorecidas e se multiplicam mais rapidamente (*lactococos e lactobacilos*), enquanto outros terão seu crescimento inibido ao longo do período (deteriorantes e patogênicos). Com o avanço do tempo de maturação, o pH do queijo diminui e a atividade de água também, por conta disso a contagem de coliformes e possivelmente de bactérias patogênicas tendem a diminuir não causando danos à saúde do consumidor (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

2.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM QUEIJOS ARTESANAIS USANDO FERRAMENTAS MICROBIOLÓGICAS CLÁSSICAS

Dos produtos de origem animal o leite pode ser considerado o mais completo em termos nutricionais (RIBEIRO, 2005). Na elaboração de queijos em geral, a matéria prima principal, deve apresentar excelente qualidade microbiológica a fim de não prejudicar o processo fermentativo, não provocar alterações sensoriais e principalmente não causar danos à saúde do consumidor (SALINAS, 2002). Para que a inocuidade do leite seja mantida cuidados com a obtenção, armazenamento, processamento, controle da carga microbiológica e determinação dos tipos de microrganismos devem seguir as legislações evitando-se então infecções, intoxicações alimentares, prejuízos nutricionais e sensoriais (FREO; REOLON, 2006; IRKIN, 2010), principalmente quando se trata de queijos elaborados a partir do leite cru.

Existem várias técnicas microbiológicas para identificar e caracterizar a diversidade de bactérias que estão presentes nos queijos artesanais, sendo que os métodos que dependem do cultivo são os mais tradicionais (BERESFORD *et al.*, 2001). A determinação da carga microbiana do leite está paralelamente relacionada com a qualidade do queijo, sendo que a detecção de bactérias pode ser realizada utilizando métodos bioquímicos clássicos qualitativos e quantitativos, sendo eles: quantificação padrão em placas, citometria de fluxo, microscopia direta, teste da redutase, entre outros (CASSOLI, 2005; NUNES, 2017; SANT 'ANNA, 2019).

O método de contagem padrão em placas é uma técnica muito utilizada para se determinar o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de leite. Com essa técnica é possível a contagem de colônias, mas não o número de bactérias (BRITO 1999; HILLERTON, 2000). Porém com a aplicação de diluições seriadas em conjunto com a técnica de semeadura por espalhamento (*spread-plate*) e meio de cultura seletivo é possível a identificação fenotípica de colônias específicas. Mas a técnica possui limitações da própria natureza do alimento e também em relação aos fatores intrínsecos e extrínsecos como, atividade de água, pH, temperatura e umidade, respectivamente (SANT 'ANNA, 2019).

A citometria de fluxo é um método de análise mais rápido e automatizado da viabilidade celular por diferença de concentração de íons na membrana citoplasmática das células de microrganismos presentes no leite (CASSOLI *et al.*, 2007; SHAPIRO, 2000). De acordo com Gunasekera; Attfield; Veal (2000) e Holm; Mathiasen; Jespersen (2004), técnicas envolvendo o princípio da citometria de fluxo têm sido desenvolvidas para a enumeração e diferenciação de microrganismos, mas poucas estão relacionadas à diferenciação de bactérias em leite.

O método de contagem por microscopia direta é um dos métodos mais confiáveis e utilizados para a determinação do número de células somáticas em laticínios por ser rápido, simples e por permitir analisar a morfologia bactéria. Nesta técnica podem ser utilizados corantes específicos de DNA, como o verde de metil e pironina-Y, que diferencia as células somáticas dos corpúsculos citoplasmáticos. Apesar disso, as células viáveis e não-viáveis são contadas sem distinção entre elas e é difícil discernir as partículas de alimento das células bacterianas (MADUREIRA *et al.* 2010; SANT 'ANNA, 2019).

O teste redutase também conhecido como teste de redução de corantes, é um método simples e de baixo custo aplicado em leite *in natura*. Na técnica são utilizados dois corantes: o que utiliza azul-de-metileno, com a redução o meio torna-se branco, quanto maior a contaminação do leite mais rapidamente a solução irá descolorir (NERO; BELOTI; BARROS,

2000) ou o corante resazurina o meio que era azul torna-se rosa. Porém este método também apresenta implicações, uma vez que nem todas as espécies de bactérias possuem a mesma atividade redutora (SANT ‘ANNA, 2019).

A grande diversidade de queijos artesanais existentes é influenciada principalmente pela população bacteriana mesofílica, gram-positiva e não formadora de esporos, sobretudo as bactérias ácido lácticas (BAL) (BRUNO; CARVALHO, 2009; RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009). Bactérias identificadas por métodos tradicionais de identificação microbiana (contagem em placas e testes bioquímicos) estão descritas na Tabela 1. Estas apresentam dupla função quando aplicadas em alimentos, além de prolongarem a *shelf-life*, evitam que bactérias gram-positivas de gêneros diferentes de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* se desenvolvam (BRUNO; CARVALHO, 2009).

Tabela 1- Diversidade microbiana em queijos artesanais brasileiros

Tipo de queijo	Região	Microrganismos Identificados	Método	Referência
Queijo Serrano	Rio Grande do Sul- RS	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	IDF	Delamare <i>et al.</i> (2012)
Queijo Colonial	Seara- SC	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Klebsiella</i>	BAM	Carvalho <i>et al.</i> (2019)
Queijo Minas	Serra da Canastra- MG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> <i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Lactococcus spp</i>	IDF	Resende <i>et al.</i> (2011)
Queijo Colonial	Cascavel- PR	<i>Staphylococcus sp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>	FDA	Eckert; Webber (2016)

Queijo Coalho	Aracaju- SE	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Arizona hinshawii</i> , <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> e <i>Salmonella spp.</i>	MAPA	Santana <i>et al.</i> (2008)
------------------	-------------	---	------	------------------------------

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Apesar de algumas espécies dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* serem considerados patogênicos ao ser humano, a espécie *Streptococcus thermophilus* é amplamente utilizada em laticínios, uma vez que é tecnologicamente importante para a metabolização da lactose e desenvolvimento de propriedades sensoriais (GALIA *et al.*, 2009). Já a utilização do gênero *Enterococcus* é questionável, pois algumas espécies possuem genes relacionados com virulências (LANDETA *et al.*, 2013). Sendo assim, a identificação tanto das bactérias naturalmente presentes no leite cru quanto no queijo que será comercializado é relevante para assegurar a saúde dos consumidores, explorar o desempenho desses microrganismos durante o processo e melhorar as características do queijo (MOTTA; GOMES, 2015).

A identificação de cepas patogênicas e de bactérias é de extrema importância para o processo industrial (CUNHA, 2016), uma vez que além de poderem ser fontes de contaminação, cada microrganismo apresenta uma rota metabólica diferente, e quanto mais específica for a aplicação mais otimizado poderá ser o processo (VAN BELKUN *et al.*, 2007). Apesar dos métodos de identificação bacteriana que utilizam a caracterização fenotípica até hoje serem muito utilizados, testes clássicos não são muito eficientes para separar espécies fenotipicamente relacionadas, pois muitas vezes não permitem a separação genética de subespécies (DELGADO; MAYO, 2004). Com tais análises, a cultura como um todo é analisada e o metabolismo individual de cada célula acaba sendo ignorado, desta forma aquelas culturas que estão viáveis, porém não cultiváveis acabam não sendo reveladas (JEPRAS *et al.*, 1995; NEBEVON-CARON; BADLEY, 2000).

Além disso, na maioria das vezes essas técnicas clássicas devem ser utilizadas com objetivos precisos, uma vez que apresentam muitas retenções práticas como a sensibilidade do método, além de ser um trabalho exaustivo no laboratório requerendo muito tempo (VAN BELKUN *et al.*, 2007; WOLSKA; SZWEDA, 2012). Também há dificuldade em relação a cultivar as bactérias em placas, uma vez que são diversos os meios de cultura e o escolhido deve ser relacionado com características específicas do microrganismo de interesse (BRUNO;

CARVALHO, 2009) e a temperatura de incubação também interfere no crescimento das bactérias desejadas (CARVALHO, 2007).

Por conta disso o surgimento de técnicas que ampliassem o conhecimento sobre os microrganismos foi necessário como, por exemplo, o surgimento da técnica de sequenciamento genético em 1975 (SANGER; COULSON, 1975). Com a possibilidade de identificar o mapeamento genômico de microrganismos em alimentos fermentados há um crescente interesse na aplicação destas metodologias na área.

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM QUEIJOS ARTESANAIS USANDO FERRAMENTAS GENÔMICAS OU METAGENÔMICA

Os métodos de tipagem baseados em sequenciamento de DNA surgiram como alternativas para os métodos de identificação clássicos fenotípicos (KAZOU *et al.*, 2021). Essa nova forma de organizar e classificar os organismos com técnicas moleculares tornou-se mais rápido, com resultados mais fidedignos, além de ser de fácil reprodutividade. Isso porque, os métodos detectam as células nos seus mais diversos estados, desde as viáveis até aquelas lisadas ou danificadas (O'SULLIVAN *et al.*, 2013). Ademais os dados são compartilhados de forma on-line via plataformas digitais, facilitando dessa forma a interpretação dos dados obtidos pelas técnicas de tipagem por sequenciamento (CUNHA, 2016).

O sequenciamento do DNA é um método da biologia molecular que tem como finalidade determinar a ordem exata das bases nitrogenadas de uma parte ou do todo dessa molécula (FIETTO; MACIEL, 2015). Com os métodos de tipagem genotípicas é possível avaliar as variações que ocorrem em partes ou na totalidade dos genomas de microrganismos, sendo que qualquer um deles quando realizados com eficiência algumas informações são obtidas, como: expressão gênica diferencial, estrutura e função dos genes, diversidade genética, presença de elementos móveis no genoma, presença de genes adquiridos por transferência lateral, relações evolutivas e construção de mapas metabólicos (NIERMAN *et al.*, 2000).

O sequenciamento dito clássico, é a técnica de Sanger que com os anos passou por aprimoramentos como, por exemplo a incorporação de corantes emissores de fluorescência (FIETTO; MACIEL, 2015). Esta técnica baseia-se na replicação do DNA molde por ação de uma enzima (DNAPolimerase) pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tal replicação pode ser interrompida em diferentes regiões por interferência de nucleotídeos

(didesoxirribonucleotídeos). Exemplificando, com a desnaturação da dupla fita de DNA, ação da DNA polimerase e rompimento por ação dos nucleotídeos os *amplicons* são formados. Por fim esses *amplicons* são separados em fragmentos formando bandas numa chapa radiográfica permitindo determinar a sequência de nucleotídeos da fita de DNA recém-sintetizada e consequente visualização dos fragmentos que diferem entre si por apenas um nucleotídeo (FIETTO; MACIEL, 2015).

O poder discriminatório das cepas está diretamente relacionado com o tamanho do fragmento que é sequenciado e por conta disso existem três técnicas de sequenciamento, sendo elas: Tipagem por Sequenciamento de Único Locus (SLST), Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci (MLST) e Tipagem por Sequenciamento Completo do Genoma (WGST) (CUNHA, 2016). No método SLST, por sequenciar uma quantidade limitada de *locus* de DNA, a região selecionada deve apresentar bastante variação de sequenciamento gênico e deve-se utilizar um marcador específico para cada espécie bacteriana a ser identificada. Apesar disso os resultados encontrados em diversas análises são facilmente comparados pois, as informações são armazenadas em banco de dados *on-line* (HARMSEN *et al.*, 2003; VAN BELKUM *et al.*, 2007; WOLSKA; SZWEDA, 2012).

A técnica MLST que surgiu para suprir a lacuna existente no método citado anteriormente foi aplicada pela primeira vez em 1998 em estudos genéticos de bactérias patogênicas (MAIDEN *et al.*, 1998), por conta da sua eficiência em relacionar as espécies (DEVOS, 2011). Os métodos de análise dessa técnica podem ser baseados em duas estratégias: a primeira delas é dependente dos alelos, ignorando a diferença entre os nucleotídeos presentes e por conta disso os resultados não são tão acurados, uma vez que eles não podem distinguir uma única mudança de base em múltiplas loci das mutações do mesmo número de loci (MAIDEN, 2013; PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2013). Já a segunda estratégia, são métodos baseados nas sequências dos nucleotídeos (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2013), geralmente 450-500 pares de base são sequenciados de sete genes referência (CUNHA, 2016), ou seja, é com a determinação da sequência dos nucleotídeos que o grau de parentesco bacterianos são determinados (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2013).

Por ambas as técnicas citadas anteriormente apresentarem limitações quanto a abertura genômica que dificulta a especificação e diferenciação de tipagem de algumas espécies surgiu então a técnica WGST. Sinônimo de alta sensibilidade técnica, esse método é capaz de diferenciar cepas que apresentam diferenças em apenas um nucleotídeo (CUNHA, 2016).

Apesar dos dados dessa técnica estar disponível de forma *online*, a interpretação da enorme gama de dados e a determinação dos marcadores genéticos ainda são barreiras para essa tecnologia (LARSEN *et al.*, 2012; SABAT *et al.*, 2013; VAN BELKUM *et al.*, 2007).

Dentre os marcadores genéticos utilizados, a análise do gene 16S rRNA é amplamente utilizada para determinar a relação filogenética das bactérias (CLARRIDGE, 2004). O sequenciamento dessa região em específico é realizado pois, possibilitam a caracterização dos isolados de forma mais rápida e com maior segurança. Nesta parte do rRNA há regiões conservadas que permitem o desenvolvimento de *primers* direcionados a todas as bactérias e regiões de abrangência com sequências específicas de espécies (COCOLIN; RANTSIOU, 2007; ERCOLINI, 2004), ou seja, com a amplificação da região 16S rRNA é possível comparar quais os pares de bases nitrogenadas estão diferentes entre as espécies e que são responsáveis pela diferenciação das suas características (COCOLIN; RANTSIOU, 2007). Regiões diferentes desse gene geralmente apresentam número limitado de sequências (DOULGERAKI, 2012; MAUKONEN; SAARELA, 2009; NOCKER; BURR; CAMPER, 2007).

A especificidade da identificação bacteriana pode ser ainda mais ampliada pela identificação taxonômica de regiões hipervariáveis como, a V3 e a V4 (ZHANG *et al.*, 2018). Com o sequenciamento da região V3 é possível diferenciar a maioria das bactérias, isso por que ela apresenta o maior número de sítios variáveis. Já com a análise da região V4 é possível saber com mais eficácia a aproximação familiar dos microrganismos presentes na amostra. Desta forma, a análise simultânea de ambas as regiões citadas permite uma maior especificidade do microbioma presente na amostra, uma vez que fragmentos de tamanho mais apropriados são analisados (CHRISTOFF, 2016).

Atualmente o interesse por sequenciadores automáticos vem crescendo, pois assim é possível que a genotipagem ocorra de forma mais ampla. O sequenciamento de milhões de fragmentos de forma paralela em vez do sequenciamento ser de um único fragmento de DNA e maior velocidade de obtenção de informações com menor custo. Além disso, houve o acoplamento da técnica com tecnologias digitais como a plataforma Illumina Miseq que apresenta princípios semelhantes ao método Sanger (COLLINS; MORGAN; PATRINOS, 2003). No princípio da plataforma também há a síntese de uma fita complementar ao DNA alvo utilizando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados, porém são utilizados fluoróforos que são responsáveis pela decodificação das imagens de cada nucleotídeo e conseqüentemente o sequenciamento da região de interesse (FIETTO; MACIEL, 2015).

Na Tabela 2 são apresentados alguns estudos da diversidade microbiana em queijos utilizando sequenciamento genético de amplo espectro (metagenômica). O termo metagenômica que foi utilizado pela primeira vez no final do século XX definia a técnica como a avaliação dos materiais genéticos isolados diretamente das amostras, sem desta forma depender de meios de cultura (HANDELSMAN, 2004). Justamente por ser um método independente de cultivo que analisa as sequências de nucleotídeos, tornou-se uma das principais formas de estudo de microrganismos isolados (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008). Visto que naquela época já se sabia que todas as informações hereditárias dos organismos estavam presentes na molécula de DNA e desde então a ecologia microbiana ganhou um novo patamar com o sequenciamento do rRNA de organismos obtidos diretamente do ambiente (MARDANOV; KADNIKOV; RAVIN, 2018).

Tabela 2 - Diversidade microbiana em queijos utilizando ferramentas metagenômicas.

Queijo analisado	Metodologia	Principais Microrganismos	Referências
Queijo do tipo coalho	Illumina Hiseq2500	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>E. faecalis</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>S. luteciae</i> , <i>Vibrio rumoienses</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	De Lima (2017)
Queijo da Canastra	Greengenes	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acinetobacter</i>	Kamimura (2018)

Queijo Artesanal da Mantiqueira	Mothur	<i>Bifidobacterium, Riemerella, Soonwooa, Staphylococcus, Isobaculum, Jeotgalibaca, Lactigenium, Bavariicoccus, Catellicoccus, Enterococcus, Melissococcus, Pilibacter, Lactococcus, Streptococcus, Lactovum, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Kluyvera, Leclercia, Salmonella, Morganella, Obesumbacterium, Pluralibacter, Acinetobacter, Enhydrobacter</i>	Pehrson (2017)
Queijo colonial	BLAST	<i>Enterococcus faecium, E. durans, Lactiplantibacillus plantarum, Phyllobacterium catacumbae, P. myrsinacearum</i>	Hermanns (2013)
Queijo Mozzarella	Illumina Miseq	<i>Enterobacteriaceae, Flavobacteriacear, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus, L. helveticus, Corynebacterium, Flavobacterium, Chryseobacterium e Anoxybacillus flavithermu</i>	Marino <i>et al.</i> (2019)
Queijo do Cazaquistão	Grengenes	<i>Lactococcus lactis, Lactobacillus helveticus, Streptococcus thermophiles, Lactobacillus delbrueckii, Ochrobactrum tremoço, O. lupin, Acinetobacter Baumannii</i>	Li <i>et al.</i> (2017)

Queijo do Poro	MR DNA	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Macrococcus caseolyticus</i> , <i>Chryseobacterium hominis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Aldrete-Tapia <i>et al.</i> (2014)
Queijo Casizolu	PCR (TTGE)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus italicus</i> , <i>Enterococcus lactis</i> , <i>Streptococcus parauberis</i> e <i>Lactococcus raffinolactis</i>	Mangia; Fancello; Deiana (2016)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

De Lima *et al.* (2017), Kamimura (2018) e Hermanns (2013) realizaram o sequenciamento genômico (16S rRNA) da comunidade microbiana derivada do queijo coalho elaborados com leite cru e pasteurizado, queijo da Canastra e queijo Colonial, respectivamente. Todos analisaram como a comunidade influência nos sabores, texturas e aromas do produto

final, e concluíram que havia a presença tanto de bactérias patogênicas quanto de bactérias benéficas que fazem parte da microbiota de derivados lácteos. Pehrson (2017), avaliou a efetividade na aplicação de microrganismos probióticos em relação a melhor qualidade microbiológica e características fermentativas do queijo Artesanal das Terras Altas da Serra da Mantiqueira em diferentes estações do ano. Neste trabalho o autor concluiu que houveram diferenças significativas das comunidades microbianas do queijo conforme havia mudanças sazonais e na incorporação de culturas probióticas.

Marino *et al.* (2019), por análise metagenômica avaliaram as diferenças das culturas bacterianas do queijo mussarela de búfala e de vaca, além disso abordaram a relevância da metodologia em auxiliar a garantia da segurança alimentar quanto a diferenciação dos microrganismos e deterioração do produto. Li *et al.* (2017) avaliaram a pouco estudada diversidade bacteriana do queijo Cazaquistão e compararam os resultados com análises de outros países em bancos de dados, neste estudo concluíram que a região geográfica realmente é responsável pela diversidade da microbiota. Aldrete-Tapia *et al.* (2014) analisaram as influências do processo produtivo na elaboração do queijo Poro em relação a comunidade de bactérias. Os autores concluíram que um dos fatores que mais influenciaram nas características finais do queijo foram as diversidades que ocorrem nas comunidades bacterianas encontradas nos leites coletados em períodos de seca e em períodos chuvosos, sendo que esse fator acaba interferindo no processo produtivo e na etapa de maturação do queijo. Mangia; Fancello; Deiana (2016) foram pioneiros na avaliação das espécies de bactérias que estavam presentes no primeiro mês de maturação do queijo Casizolu e concluíram que as espécies *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactocaseibacillus paracasei* foram as principais espécies bacterianas envolvidas na fabricação e maturação do queijo italiano.

No que se tem registrado o primeiro estudo metagenômico envolvendo queijos foi realizado por Wolfe *et al* em 2014, neste trabalho os autores realizaram o sequenciamento de bactérias psicrotróficas e supuseram a influência destas no desenvolvimento de sabor de queijos de diferentes países. Em outro estudo, Marino *et al.* 2019 utilizaram a técnica para diferenciar queijo muçarela de leite de vaca do queijo muçarela de búfala pela microbiota distinta entre os dois produtos, sendo que o primeiro apresentou maior diversidade bacteriana. Com isso, pode-se concluir que saber informações taxonômicas e as características do microbioma do queijo por estudos da comunidade microbiana como um todo no que se refere aos termos filogenéticos e funcionais das comunidades microbianas envolvidas no processo de fabricação dos queijos

estão em ascensão, pois a investigação e identificação de um único ou somente de alguns organismos não são suficientes para a dinâmica da microbiota e para a garantia da biossegurança desses produtos (TILOCCA *et al.*, 2019).

A singularidade das variedades dos queijos é influenciada por fatores já conhecidos como, a região de produção, a composição do leite utilizado, umidade da localidade, altitude, temperatura e microrganismos iniciadores (CÓRDOVA *et al.*, 2016; IDE; BENEDET, 2001). Por conta disso os estudos das comunidades bacterianas desse tipo de alimento fermentado são extremamente relevantes, pois eles auxiliam tanto na otimização do processamento industrial quanto no entendimento das interações desses microrganismos com a matéria-prima (RIOS *et al.*, 2020). Porém além das análises serem de fácil replicabilidade a interpretação dos resultados também deve ser facilitada, facilidades essas que ocorreram com os avanços das técnicas que não necessitam da utilização de meios de cultura (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; ANDREOTE, 2007; HUGHES *et al.*, 2001).

A identificação mais precisa dos microrganismos pelas técnicas genômicas ou metagenômica que possibilitaram mais acurácia nas suposições das interações da microbiota com o produto, sendo esse um fator de extrema relevância para as indústrias uma vez que influencia na qualidade final do produto com o desenvolvimento de características sensoriais e reológicas e também na segurança dos mesmos com a deterioração quando há a presença de organismos não desejáveis (RIOS *et al.*, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Foi submetida a análise metagenômica uma peça de queijo Colonial de leite cru comercializada no município de Seara, elaborada por um produtor que faz parte da Cooperativa de Produção e Consumo dos Produtores e das Agroindústrias Familiares de Seara (COOPASE). O queijo foi fabricado em dezembro de 2020, sendo esse período considerado de verão no Brasil, no qual as temperaturas médias são de 23°C na região de Seara. O queijo Colonial passou por um período de maturação de 20 dias e a amostra foi transportada congelada em caixa térmica com gelo retornável em sua embalagem original até o momento da investigação da comunidade bacteriana presente no mesmo.

3.2 ANÁLISE METAGENÔMICA

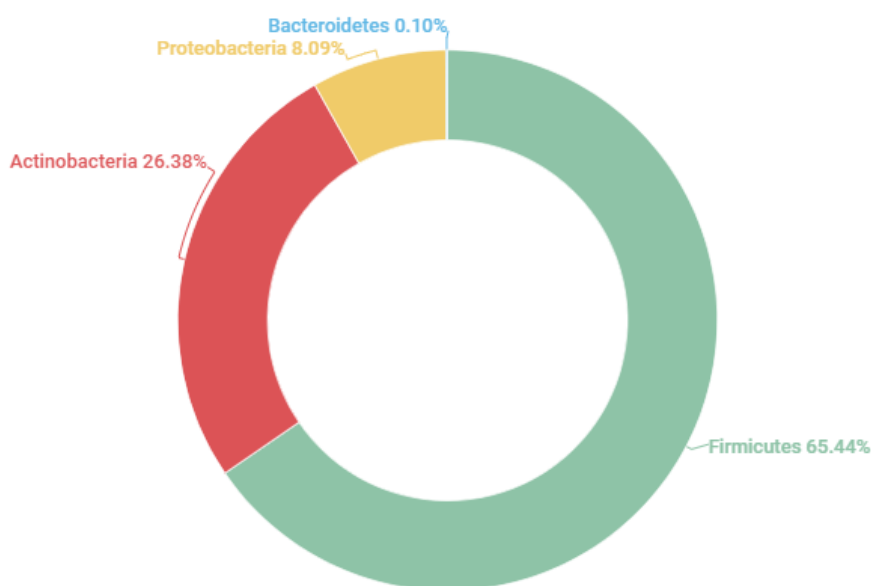
A diversidade microbiana foi estudada com base em bibliotecas sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. Para o sequenciamento de alto rendimento das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA, pesou-se uma alíquota de 25 g da amostra a qual foi homogeneizada com 225 mL de solução salina triptonada. Após essa etapa, foi realizada a extração do DNA com a técnica de *beads* magnéticas com um protocolo proprietário desenvolvido pela Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil. Em seguida foi realizada a reação de PCR em triplicata utilizando Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, EUA), nas condições: 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma extensão final de 72 °C por 2 minutos. As sequências foram analisadas por meio de um pipeline e bibliotecas preparadas, ambas seguindo um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). A amplificação foi realizada com os *primers* 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QUIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) universais para a região V3/V4 do gene 16S rRNA (CAPORASO *et al.*, 2012). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com o banco de dados proprietário ou públicos (QUAST *et al.*, 2013) e Greengenes (DeSANTIS *et al.*, 2006) contendo diversas sequências de DNA anteriormente caracterizadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise metagenômica foram encontrados um total de 76.695 *reads*, sendo que em relação a taxonomia foram encontrados: 4 filos (Figura 5) sendo eles, Firmicutes (65,44%), Actinobacteria (26,38%), Proteobacteria (8,09%) e Bacteroidetes (0,1%). Gill *et al.* (2006), identificaram os microrganismos do ambiente externo no canal do úbere e como resultado, os principais filos presentes eram Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. Já Delbès, Ali-Mandjee e Montel (2007) estudaram a diversidade microbiana no queijo Saint-Nectaire e Zhong *et al.* (2016) investigaram as variações microbianas em leites fermentados de diferentes regiões da China, Mongólia e Rússia. Ambos os grupos de pesquisadores constataram que os filos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes são encontrados em abundância tanto na matéria prima quanto nos produtos fermentados.

É fato que existem diferenças significativas em relação ao sabor, comunidade microbiana e características físico-químicas nos queijos elaborados com leite cru e pasteurizado (BUFFA *et al.*, 2001; LITTLE *et al.*, 2008; DELGADO *et al.*, 2013). Segundo Montel *et al.* (2014) a carga microbiana do leite é influenciada principalmente por contaminações externas por conta da falta de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) no momento da ordenha, uma vez que segundo os autores o leite enquanto está na parte superior do úbere é considerado estéril.

Figura 4 - Abundância relativa de filos bacterianos presentes no queijo colonial artesanal.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Em contradição Gill *et al.* (2006) afirmam que inicialmente a contaminação da matéria prima ocorre ainda no úbere por microrganismos presentes no ambiente, sendo o filo Firmicutes o mais frequente. Concomitantemente Derakhsani *et al.* (2018) afirmam que o leite mesmo antes da ordenha pode estar contaminado, uma vez que o canal do teto por dilatação do esfíncter após a ordenha facilita a entrada de microrganismos do meio externo que acabam proliferando no meio intramamário e provocando infecções como a mastite. Além disso, os autores citam que podem ocorrer translocações de bactérias intestinais para as glândulas mamárias por meio da circulação sanguínea e que afetam a microbiota do leite ainda dentro do animal.

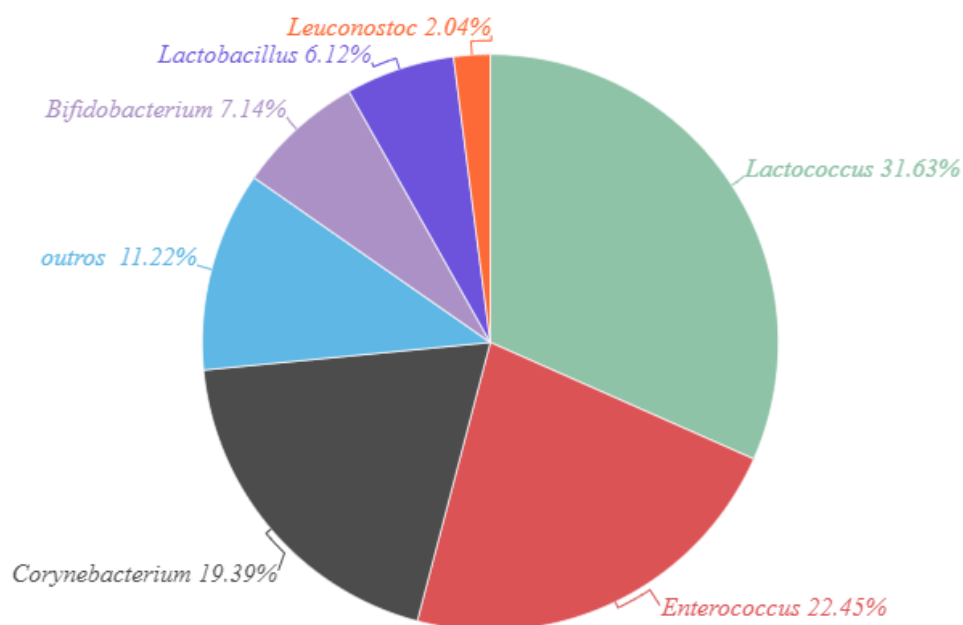
Além do enriquecimento microbiano do leite durante a ordenha, também ocorrem transferências da microbiota das indústrias processadoras que apresentam microrganismos do ambiente nos tanques de armazenamento, na água, nas prateleiras e nos equipamentos (MONTEL *et al.*, 2014). Por conta disso, o leite sem tratamento térmico apresenta maior carga microbiana (YOON; LEE; CHOI, 2016) o que acaba influenciando no desenvolvimento de um perfil sensorial característico nos queijos de leite cru em decorrência das atividades metabólicas desses microrganismos que permanecem no leite (ALBENZIO *et al.*, 2001; MONTEL *et al.*, 2014; WOUTERS *et al.*, 2002). Sendo o filo Actinobacteria, o que apresenta maior capacidade de hidrolisar a caseína, interferindo dessa forma na maturação dos queijos e nas reações de proteólise (COLLINS, 2006; OZTURKOGLU *et al.*, 2016) e conseqüentemente contribuindo para o sabor e cor dos queijos (ARFI *et al.*, 2005).

Tanto o filo Proteobacteria quanto o filo Bacteroidetes estão presentes nos mais diversos meios, desde ambientes naturais até em alimentos (GARRITY; BELL; LILBURN, 2015; IRLINGER *et al.*, 2014). O primeiro filo citado é composto por microrganismos halofílicos e psicrotolerantes, por conta disso mesmo após a etapa de salga essas bactérias conseguem se desenvolver (IRLINGER *et al.*, 2014) e mesmo com o leite sob refrigeração produzem a enzima metaloprotease alcalina que é capaz de alterar as propriedades sensoriais do leite cru e seus derivados (JUNIOR *et al.*, 2019). Enquanto isso, o filo Bacteroidete está relacionado com a degradação de proteínas e carboidratos (CONDÉ, 2018), uma vez que realizam reações proteolíticas. Além disso, são microrganismos sacarolíticos, ou seja, produzem ácidos acético, láctico e propiônico (RIOS-COVIAN *et al.*, 2013).

Em relação à abundância de gêneros de bactérias na amostra de queijo (Figura 6), foi possível observar que os mais abundantes foram *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*

e *Corynebacterium*. Tais gêneros podem contribuir de forma positiva no beneficiamento do leite ou auxiliar no processo de deterioração da matéria prima (QUIGLEY *et al.*, 2013). Os *Lactococcus* e os *Enterococcus* são encontrados naturalmente no leite cru e fazem parte da composição dos queijos produzidos de forma artesanal. Ambos os grupos são responsáveis pela produção de lactato e auxiliam nas características sensoriais dos queijos, uma vez que participam dos processos de proteólise e lipólise (CAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2015; QUIGLEY *et al.*, 2013). Além disso, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são espécies heterofermentativas, ou seja, são bactérias que produzem gases e juntamente com a ação de algumas leveduras formam olhaduras nos queijos (BERESFORD *et al.*, 2001), sendo essa uma característica desejada no queijos Colonial (SANTA CATARINA, 2018).

Figura 5. Abundância relativa de gêneros bacterianos presentes no queijo colonial artesanal.



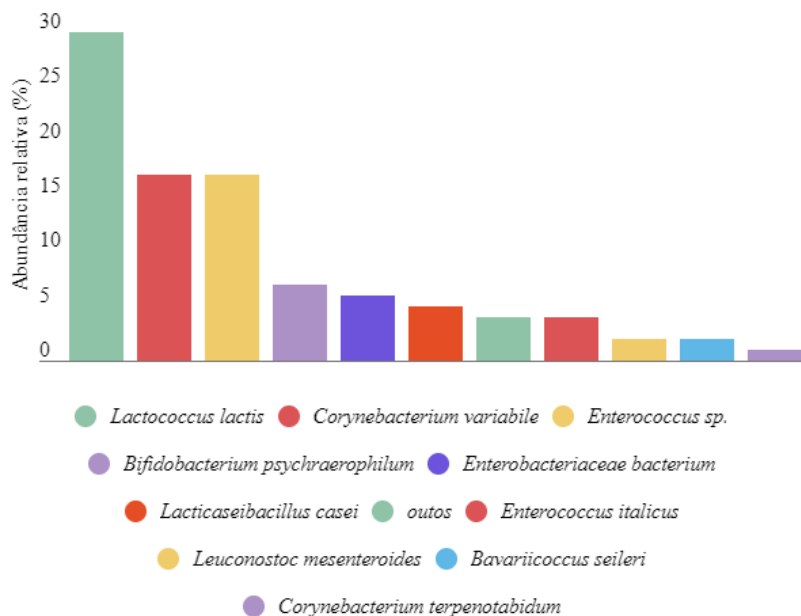
Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

São antigos os estudos e as comprovações a cerca de bifidobactérias em aplicações biotecnológicas e biomédicas (probióticos), nos queijos esses microrganismos além de exercem influencias nas características sensoriais por apresentarem a capacidade de hidrolisar ou metabolizar os carboidratos, também agem como antimicrobianos (YASMIN *et al.*, 2020). Apesar de *Bifidobacterium* spp. também estarem presentes com frequência no leite cru e em

produtos lácteos e resultarem em níveis aumentados de lactato e acetatos, estes não interferem nas características sensoriais do produto final (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2007). Isso provavelmente ocorre por que a produção de ácido acético é menor durante o período de maturação como averiguado no estudo de Dermers-Mathieu *et al.* (2016). Assim como ocorreu em nosso trabalho, outros estudos também encontraram corinebactérias em leite cru e derivados. Espécies de *Corynebacterium* não patogênicas como, *C. casei* e *C. variabile*, que apresentam funções benéficas no processamento de alimentos, são frequentemente isoladas de produtos lácteos de leite cru (FRICKER *et al.*, 2001; HAHNE *et al.*, 2018). Dolci *et al.* (2009) estudaram a microflora superficial de queijo de leite cru e detectaram bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Corynebacterium*. Os autores concluíram que houve um aumento na contagem de ambos os gêneros na superfície do queijo mesmo após o período de maturação.

No total foram identificadas 57 espécies de bactérias lácticas e não lácticas na amostra de queijo Colonial analisado. Dentre as espécies de bactérias lácticas que foram detectadas na amostra de queijo colonial analisada, a mais abundante foi *Lactococcus lactis* (Figura 7), assim como também ocorreu nos trabalhos de Alegría *et al.* (2009) e Lima *et al.* (2009). Tal abundância pode estar relacionada pela ampla distribuição dessa espécie nos mais diversos meios, uma vez que já foi isolada de águas da chuva, de plantas, do trato gastrointestinal humano e dos tetos das vacas (CAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2013). Passerini *et al.* (2010) sugeriram então separar as cepas de *L. lactis* de acordo com sua origem, sendo cepas domesticadas aquelas isoladas de produtos lácteos fermentados e cepas ambientais aquelas isoladas dos animais ou do leite sem tratamento térmico. Por ser comprovadamente segura (GRAS) (GAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2013) esta é uma cultura amplamente utilizada na fabricação de queijos (PICON; GARCÍA-CASADO; NUÑEZ, 2010), pois exercem efeitos importantes nas características sensoriais deste produto. Tais cepas degradam proteínas por ação da enzima lactocepina que hidrolisam a caseína; fermentam a lactose também por ação enzimática da fosfo- β -galactosidase, para produzir lactose-6-fosfato e glicose; e produzem ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico (CENTENO *et al.*, 2002; DE LIMA *et al.*, 2009; GAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2013). É em decorrência da degradação enzimática dos aminoácidos que são formados os compostos aromáticos relacionados aos sabores dos queijos (CENTENO *et al.*, 2002), sendo que nos artesanais essa característica é de extrema importância, uma vez que dá a singularidade do produto (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

Figura 6 - Abundância relativa das espécies de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias no queijo colonial artesanal.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

L. lactis também são aplicados em alimentos como sendo probióticos da nova geração com efeitos sob doenças inflamatórias intestinais, doença autoimune (diabetes tipo 1) e sensibilidade a alérgenos (BARROS *et al.*, 2020). Podem também ser usados com o intuito de inibir o crescimento de cepas patogênicas em alimentos, pois apresentam a capacidade de produzir compostos antimicrobianos denominados de bacteriocinas, sendo o principal representante utilizado em alimentos a nisina, que atua contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium spp.* (KHELISSA; CHIHIB; GHARSALLAOUI, 2020).

Apesar dos *L. lactis* serem amplamente utilizadas em laticínios e serem comprovadas como seguras, algumas cepas como, *L. lactis subsp. cremoris* CECT 8666, possuem a capacidade de produzir uma amina biogênica denominada de putrescina (LADERO *et al.*, 2011a). Tal amina biogênica é muito comum em indústrias lácticas (FERNANDEZ *et al.*, 2007), porém nos alimentos fermentados lácteos provocam sabores indesejáveis, além de poder apresentar efeitos tóxicos dependendo da sua concentração (LADERO *et al.*, 2010; LADERO *et al.*, 2011b). A produção de putrescina por esta espécie de BL ocorre via agmatina disiminase (LADERO *et al.*, 2011a).

Del Rio *et al.* (2014) isolaram cepas *L. lactis subsp. cremoris* CECT 8666 de queijo artesanal Genestoso e avaliaram o efeito da produção de putrescina no crescimento bacteriano

e na alcalinização da cultura. Os autores relataram que a produção de putrescina foi detectada após 6 horas do início da fermentação e perdurou até que toda agmatina fosse utilizada, juntamente com a produção de íons amônio. Com base nos resultados observados, os autores concluíram que, as culturas de *L. lactis subsp. cremoris* CECT 8666 cultivadas em meio com maiores concentrações de agmatina apresentaram duas fases de crescimento, enquanto aquelas culturas sem agmatina permaneceram em fase estacionária. Sugerindo dessa forma uma relação direta entre a via agmatina disiminase (ADGI) com o crescimento bacteriano em conjunto com outros produtos do catabolismo da agmatina (adenosina trifosfato e íons amônio). Em relação a alcalinização do meio, inicialmente acreditava-se que com a produção de amins biogênicas seria um sistema de resistência ao estresse ácido para as BL, porém segundo os autores o pH não influenciou no crescimento da bactéria. Portanto, é importante selecionar cepas que não tenham a capacidade de produzir amins biogênicas, visto que além do problema de segurança do alimento por conta da presença de putrescina e as interferências negativas que essas causam nas características sensoriais, as cepas de *L. lactis* produtoras de putrescina acabam tendo vantagem seletiva sobre outras cepas que não possuem atividade da via AGDI.

A detecção de quantidades significativas de reeds de *Corynebacterium variabile* na amostra indica que houve uma possível contaminação durante a ordenha ou na fabricação do queijo, visto que é uma espécie frequentemente encontrada na pele e no trato gastrointestinal de animais e de humanos (BRAEM *et al.*, 2012), apesar disso não é considerada uma espécie patogênica (SCHRÖDER *et al.*, 2011). No estudo realizado por Chombo-Morales *et al.* (2016), as amostras de queijo Cotija artesanal também estavam contaminadas com *C. variabile* e os autores associaram a presença desta espécie como sendo relevante no processo de maturação do queijo. Tal importância está associada a capacidade desta espécie em metabolizar o lactato, além disso elas apresentam a capacidade de produzir enzimas lipolíticas como lipases (*lipA1 - lipA3*) e hidrolases (SGNH-hidrolase) que provocam a liberação de compostos voláteis como, enxofre, ésteres, aldeídos e cetonas que derivam da degradação da lactose e do citrato que influenciam no sabor dos queijos (YVON; RIJNEN, 2001). Já as enzimas proteolíticas (serina protease, aminopeptidase e prolina iminopeptidase) estão relacionadas com a degradação de proteínas que contribuem para a textura e sabor dos queijos, uma vez que compostos aromáticos são derivados de aminoácidos (DEETAE *et al.*, 2007; SCHRÖDER *et al.*, 2011).

Outro membro do gênero *Corynebacterium* detectado neste estudo foi *Corynebacterium terpenotabidum*. Na comparação do sequenciamento genômico desta espécie com a citada anteriormente, a semelhança do gene 16S rRNA é de mais de 97% e também não apresenta patogenicidade. Apesar disso não se sabe ao certo de onde foi originalmente isolada, mas atualmente é encontrada em animais, humanos, solo e alimentos (RÜCKERT *et al.*, 2013).

A terceira espécie de bactéria láctica que apareceu com maior frequência em número de *reads* (Tabela 3) na análise metagenômica foram pertencentes ao gênero *Enterococcus spp.*. Apesar da sua presença em alimentos ser considerada preocupante por conta da patogenicidade relacionada a algumas cepas, principalmente *E. faecium* e *E. faecalis*, estes são frequentemente isolados em queijos de leite cru, pois são extremamente importantes nas características que o queijo adquire durante a etapa de maturação (BARROS *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2016; RENYE *et al.*, 2011). Isso por que este gênero está relacionado com as reações de lipólise, proteólise e produção de diacetil (MORAES *et al.*, 2012). Além disso podem inibir o crescimento de patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (SILVETTI; MORANDI; BRASCA, 2014). Isto porque algumas cepas como, *E. faecium* e *E. faecalis* que apresentam atividade antagonista, vem sendo reconhecidas e utilizadas como probióticos da nova geração. Apesar de alguns *Enterococcus* não serem declaradas com status seguro (GRAS), como *E. faecalis* que possuem a capacidade de transferir genes de resistência a antibióticos (CAMBRONEL *et al.*, 2020). Já as cepas *E. faecium* SF-68 e *E. faecium* M74 que são utilizadas na suplementação alimentar estão apresentando efeitos probióticos positivos (FRANZ *et al.*, 2011; WAHEED *et al.*, 2019). Tanto a espécie *E. faecium* quanto *E. faecalis*, estão apresentando respostas probióticas no que se refere a doenças estomacais, renais, circulatórias, normalização da microbiota intestinal, redução de colesterol e prevenção de câncer de cólon (BARROS *et al.*, 2020).

Tabela 3 - Quantidade de sequências identificadas das espécies mais abundantes.

Espécie	Quantidade de sequências
<i>Lactococcus lactis</i>	22576
<i>Corynebacterium variabile</i>	13199
<i>Enterococcus sp.</i>	12821
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	5333
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	5015
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	3886
<i>Enterococcus italicus</i>	2996

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1914
<i>Bavariicoccus seileri</i>	1743
<i>Corynebacterium terpenotabidum</i>	766
<i>Lactococcus garvieae</i>	507
<i>Enterobacter cloacae</i>	427
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	393
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	365
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	256
<i>Streptococcus thermophilus</i>	188
<i>Lactobacillus helveticus</i>	169
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	132
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	124
<i>Corynebacterium flavescens</i>	112
<i>Levilactobacillus brevis</i>	94
<i>Pantoea agglomerans</i>	88
<i>Citrobacter freundii</i>	70
<i>Enterobacter hormaechei</i>	65
<i>Vibrio furnissii</i>	48
<i>Enterococcus durans</i>	44
<i>Moraxella osloensis</i>	44
<i>Chryseobacterium bovis</i>	33
<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	27
<i>Cronobacter sakazakii</i>	23
<i>Companilactobacillus farciminis</i>	22
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	18
<i>Bacillus cereus</i> sp. group	16
<i>Weissella paramesenteroides</i>	16
<i>Empedobacter brevis</i>	15
<i>Enterococcus thailandicus</i>	13
<i>Staphylococcus xylosum</i>	12
<i>Acinetobacter ursingii</i>	10
<i>Brevibacterium iodinum</i>	9
<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	8
<i>Chryseobacterium anthropi</i>	8
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	8
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	7
<i>Kocuria kristinae</i>	7
<i>Lactobacillus rossiae</i>	7
<i>Shigella flexneri</i>	7
<i>Lactobacillus crispatus</i>	6
<i>Raoultella planticola</i>	6
<i>Chryseobacterium flavum</i>	5
<i>Corynebacterium casei</i>	5
<i>Empedobacter falsenii</i>	5

<i>Enterococcus casseliflavus</i>	5
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	5
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4
<i>Shigella dysenteriae</i>	4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A espécie *Enterococcus italicus*, também encontrada no nosso estudo, recebeu tal nomenclatura por que inicialmente foram isolados em dois queijos artesanais italianos (Toma piemontese e Robiola piemontês) (FORTINA *et al.*, 2004). Devido a sua ampla disposição em laticínios, estudos mais aprofundados acerca da espécie tornaram-se necessários, principalmente em relação a patogenicidade e virulência (MAIETTI *et al.*, 2007). Avaliar a segurança na aplicação de novas cepas de *Enterococcus* em alimentos é de extrema importância, uma vez que eles apresentam elevada capacidade de transferir genes de resistência a antibióticos e acabam desta forma enfraquecendo critérios de seleção (EATON; GASSON, 2001; MAIETTI *et al.*, 2007). GAALLOUL *et al.* (2014) isolaram *Enterococcus italicus* no leite cru da Tunísia e relataram que tal espécie pode exercer importante influência nas características sensoriais de queijos, pois apresentaram alta atividade enzimática proteolíticas (fosfatase ácida e de aminopeptidases). Estas enzimas hidrolisam fosfopeptídeos da caseína e liberam açúcares, que são utilizados como substratos energéticos para melhor atividade da microbiota durante a maturação do queijo. Por outro lado, os autores relataram que a atividade lipolítica foi ausente.

A presença de *Enterococcus durans* também foi observada na amostra de queijo colonial analisada. Apesar de *Enterococcus durans* serem comumente isolados em leite e produtos lácteos indicando que houve uma possível contaminação originária da má higienização dos equipamentos de ordenha. No entanto, durante a maturação de queijos, esta espécie desempenha importante papel por conta da liberação de compostos aromáticos como diacetil e acetoína, por ação de aminopeptidases que contribuem com o sabor, aroma e textura (CASTRO, 2015; ÇITAK; YUCEL; ORHAN, 2004). Nos trabalhos de Hussein, Xiaoli e Yousef (2020) e de Pieniz *et al.* (2014) foram isoladas cepas de *E. durans* do queijo artesanal Egípcio e do queijo Minas Frescal, respectivamente. Sendo que os autores comprovaram a atividade antimicrobiana deste microrganismo frente a *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*, com objetivo de garantir a segurança e a potencialidade de utilização em indústrias. Como

conclusão, a espécie apresentou-se segura em ambos os trabalhos. Hussein, Xiaoli e Yousef (2020) comprovaram que *E. durans* não apresentam atividade hemolítica, mas foram fenotipicamente susceptíveis à vancomicina, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e aminoglicosídeos. Em relação ao potencial probiótico deste gênero, ambos os grupos de pesquisadores na análise metagenômica detectaram genes associados a atividades antioxidantes, antimicrobiana, produção de aminoácidos essenciais e biossíntese de vitaminas.

Por estarem naturalmente em amplos nichos ecológicos conectados ou não ao trato gastrointestinal, as bifidobactérias evoluíram em conjunto com seus hospedeiros humanos e animais (DURANTI *et al.*, 2020). Espécies de bifidobactérias também já foram isoladas da cavidade oral e alimentos fermentados (LUGLI *et al.*, 2019; OKAMOTO *et al.*, 2008). Estudos baseados no sequenciamento do gene 16S rRNA de bifidobactérias isoladas de cecos de suínos propuseram novas espécies, sendo a *Bifidobacterium psychraerophilum* uma delas (SIMPSON *et al.*, 2003). Esta cepa foi encontrada durante o sequenciamento genético das populações bacterianas presentes na amostra de queijo colonial deste estudo. Por serem um dos primeiros organismos a colonizarem o intestino humano são diversos os estudos que investigam a presença destes com a produção de compostos bioativos que promovem saúde, por conta disso mais recentemente estão sendo exploradas como cepas probióticas (DURANTI *et al.*, 2020). Dentre os benefícios de promoção a saúde provocadas pelas bifidobactérias do trato gastrointestinal estão o desenvolvimento do sistema imunológico, proteção contra patógenos e produção de vitaminas do complexo B (ISHIKAWA *et al.*, 2013; O'CALLAGHAN; VAN SINDEREN, 2016; TURRONI *et al.*, 2012; WONG; ODAMAKI; XIAO, 2019).

São antigos os estudos com cepas dos gêneros *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. como ingrediente em leites fermentados, iogurte e em queijos com a finalidade probiótica e é comprovado que essas bifidobactérias provocam efeitos positivos na saúde do hospedeiro, por conta das suas atividades metabólicas e imunomoduladoras (GENESAN *et al.*, 2014; HELLER, 2001). Em relação aos novos grupos filogenéticos, *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov, *Bifidobacterium aerophilum* sp. nov, *Bifidobacterium lactis* sp. nov, *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov (SIMPSON *et al.*, 2003, WATANABE *et al.*, 2009) ainda são necessários que mais pesquisas sejam realizadas para que o mecanismo de respostas imunes, o modo de ação e a eficácia do potencial probiótico sejam oficializados para essas cepas (DURANTI *et al.*, 2020).

Outra espécie láctica que apresentou abundância relativa alta na análise metagenômica foi *Lacticaseibacillus casei*, possivelmente por estarem naturalmente presentes no leite cru e também por serem utilizadas como NSLAB (BOTTARI *et al.*, 2018). Tal espécie juntamente com a *Bifidobacterium animalis* são denominadas como alóctones ou bactérias transitórias, pois essas espécies quando ingeridas em alimentos fermentados, principalmente leites fermentados e iogurtes, possuem a capacidade de se incorporar e sobreviver na flora intestinal, proporcionando desta forma benefícios à saúde humana (BEZKOROVAINY, 2001; DERRIEN; VLIEG, 2015; RAUTER, 2001; KOK; HUTKINS, 2018). Apesar de se integrarem a flora, sua presença no intestino e nas fezes só são detectadas enquanto há a ingestão de produtos lácteos fermentados probióticos com regularidade, o consumo intermitente de tais produtos diminui a presença de ambas as espécies (MCNULTY *et al.*, 2011) e consequentemente a capacidade probiótica é diminuída (BEZKOROVAINY, 2001).

Apesar de serem antigos os estudos com potenciais probióticos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, caracterizar novas cepas com características únicas é extremamente importante (SHARMA *et al.*, 2014). Por exemplo, *Lacticaseibacillus casei* é uma espécie de bactéria láctica amplamente utilizada no processo fermentativo de alimentos, mas atualmente estudos estão focados em avaliar a sua capacidade em ser utilizado com o intuito de preservar os produtos contra bactérias, uma vez que são capazes de produzir bacteriocina (nisina) com potencial biopreservativo por serem eficientes, seguros (GRAS) e estáveis (DE SOUZA *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2020). Porém, por não apresentarem bons rendimentos de peptídeos antibacterianos quando isoladas sozinhas, comumente são feitas combinações com outras cepas, como realizado no trabalho de YU *et al.* (2020), que utilizaram *L. casei* KLDS1.0338 com *E. coli* BL21 para aumentar o rendimento da produção de bacteriocinas. Como resultado, as bacteriocinas apresentaram alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *E. coli* patogênicas, além de não ser observada atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus brevis*.

De Souza *et al.* (2018) selecionaram cepas de *L. casei* de queijo muçarela de búfala como possíveis potenciais probióticos, além de avaliarem a presença de genes que codificam a adesão, agregação e colonização ao trato gastrointestinal (FORTINA *et al.*, 2008; RAMIAH, REENEN; DICKS, 2007), virulência, resistência a antibióticos e atividades de descarboxilação de aminoácidos (RIVAS; MARCOBAL; MUNÕZ, 2005). O grau de agregação a mucosa intestinal de todas as cepas foi considerado elevado (60,97-96,18%), sendo melhorada ainda

mais com a coagregação com outras espécies. Em relação a resistência a antibióticos, os autores relataram que todas as cepas resistiram à vancomicina, não sendo esse um fator preocupante, pois é uma resistência intrínseca e não se transferida para patógenos. As cepas não resistiram a ampicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloranfenicol. A atividade enzimática da β -galactosidase produzida por esses microrganismos também é muito importante do ponto de vista tecnológico, pois com a hidrólise da lactose confere sabor e textura aos derivados lácteos (DE SOUZA *et al.* 2018) e na capacidade de promoção a saúde de pessoas com intolerância lactose (MEIRA *et al.*, 2012). Em resumo os autores concluíram que as cepas apresentam propriedades promissoras como probióticos.

Lactiplantibacillus plantarum é uma espécie heterofermentativa facultativa de BL amplamente utilizada no processo produtivo de queijos, azeitonas e bebidas lácteas fermentadas, por contribuírem com suas características sensoriais (GARCIA-GONZALES *et al.*, 2021). Também foi encontrado na amostra de queijo colonial neste estudo. Desta forma são comumente isoladas de alimentos, mas também já foram isoladas de carnes, do trato gastrointestinal, de fezes e de plantas (BEHERA; RAY; ZDOLEC, 2018). Por diversos estudos apontarem que as cepas de *L. plantarum* estão apresentando resultados semelhantes as cepas probióticas já conhecidas e por apresentarem atividade antioxidante contra radicais livres, as explorações das suas propriedades promotoras de saúde estão aumentando (CORSETTI; CIARROCCHI; PRETE, 2016; DAS; GOYAL, 2015; GARCIA-GONZALES *et al.*, 2021). Além disso, sabe-se que essas espécies são produtoras de plantaricinas, que são bacteriocinas com potencial papel biopreservativo (SETTANNI; CORSETTI, 2008; ZACHAROF; LOVITT, 2012) por terem a capacidade de degradar enzimas proteolíticas (MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020).

A eficiência probiótica de cepas encontradas em alimentos, incluindo algumas do nosso estudo, pode ser influenciada por diversos fatores. Garcia-Gonzales *et al.* (2018) avaliaram as propriedades de adesão de *L. plantarum* isoladas de azeitonas de mesa, massa fermentada e queijos de leite cru às células epiteliais do intestino. Como resultado os autores concluíram por ensaios microscópicos e por contagem em placas que as cepas apresentaram eficiência na adesão, colonização do epitélio e sobrevivência das condições do trato intestinal, devido a hidrolases e transglicosilases. Além disso, os pesquisadores confirmaram em ensaios *in vitro* que as cepas de *L. plantarum* não apresentam efeito citotóxico.

A capacidade antimicrobiana das cepas de *L. plantarum* frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *E. coli* ocorre por conta da produção de ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio que são antimicrobianos, pela competição por nutrientes e também pela produção de bacteriocinas (BONATSOU *et al.*, 2017; GARCIA-GONZALES *et al.*, 2021; TODOROV *et al.*, 2017). Por poderem ser utilizados como substituintes de conservantes químicos, contra bactérias deteriorantes e patogênicas do hospedeiro, cepas de *L. plantarum* são muito desejáveis e estudadas para serem aplicadas nas indústrias de alimentos (KUMAR *et al.*, 2016; MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020).

Outra espécie láctica homofermentativa reconhecidamente segura (GRAS), muito utilizada na fabricação de queijos artesanais e que é prevalentemente recuperada do “pingo” identificada na análise metagenômica, foi *Lactobacillus helveticus*. Assim como as culturas que foram citadas anteriormente, essa também está ganhando destaque nas suas multifunções como, ação antimicrobiana através da produção de bacteriocinas, capacidade de promoção a saúde com efeito probiótico, além de produzirem peptídeos bioativos (GIRAFFA, 2014). Na investigação da atividade antimicrobiana da espécie, Strahinic *et al.* (2013) concluíram que *L. helveticus* por conta da produção de ácido láctico e acético apresenta eficiente atividade contra *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus mucoides*, *Pseudomonas sp.* e *Clostridium sporogenes*.

Em relação a característica probiótica, Fontana *et al.* (2019) avaliaram a presença de elementos genéticos móveis, aderência epitelial, características de agregação, mecanismos de resposta ao estresse e genes relacionados à adaptação do hospedeiro de seis cepas naturais isoladas de soro do leite. No estudo foi concluído que as cepas UC1266 e UC1267 com maior biossíntese de folato apresentaram também maior resistência a sais biliares. Em relação ao perfil de segurança, as cepas UC3147 e UC1285 apresentaram maiores números de genes que expressam bacteriocinas. Em relação a presença de enzimas que degradam a maltose, devido a existência do gene da 6-fosfo- β -glucosidase, os autores concluíram que açúcares diferentes da lactose também podem ser metabolizados. Apesar disso, os autores indicam que mais estudos devem ser realizados para comprovar a eficiência probiótica *in vivo* de *Lactobacillus helveticus*.

No que diz respeito a atividade proteolítica de *L. helveticus*, é em decorrência da hidrólise das caseínas por ação de proteinases que ocorre a liberação de aminoácidos e peptídeos

em derivados lácteos. Sendo que na presença de tal espécie a hidrólise de α 1, β e k-caseínas são completas (LOZO *et al.*, 2011). Por conta de o sistema proteolítico desta espécie ser codificada por vários genes a capacidade de produzir peptídeos curtos e liberar aminoácidos de caseína é potencializado, corroborando desta forma na exigência dos 14 aminoácidos exógenos que a espécie apresenta (CALLANAN *et al.*, 2008). Em relação a produção de peptídeos bioativos, tradicionalmente as proteínas do leite são utilizadas para produzi-las por ser um método seguro e barato (FITZGERALD; MURRAY, 2006; JENSEN; VOGENSEN; ARDÖ, 2009; LECLERC *et al.*, 2002; LÓPEZ-EXPÓSITO; AMIGO; RECIO, 2012; RUIZ; RAMOS; RECIO, 2004), sendo que vários peptídeos com funções imunológicas, imunomoduladoras e antimicrobianas já foram isolados de produtos lácteos fermentados com *L. helveticus* (GRIFFITHS; TELLES, 2013).

Existem relatos na literatura de isolamento de *Levilactobacillus brevis* de queijos artesanais, assim como aconteceu no nosso trabalho. Silva *et al.* (2019) isolaram *Lactobacillus* com potencial probiótico de queijos artesanais produzidos em regiões de Araxá- MG. Neste trabalho as culturas também foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo que as cepas de *L. brevis* foram avaliadas *in vitro* sobre o potencial probiótico. Em relação a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados, *L. plantarum* E5 foi o que apresentou maior resistência a antimicrobianos (vancomicina, eritromicina, penicilina e tetraciclina), sendo preocupante do ponto de vista de segurança a saúde, uma vez que podem ocorrer transmissão de genes de resistência. Ao que se refere a tolerância ao ácido gástrico, *L. brevis* A6 além de ser a cepa que apresentou melhor resistência ainda cresceu no meio ácido. Essa capacidade também é interessante quando se refere a aplicação ou cepas selvagens de *L. plantarum* em matrizes alimentares ácidas. Essa BL assim como outras, além de inibirem o desenvolvimento de bactérias indesejáveis como, *E. coli*, *E. faecalis*, *Salmonella spp.* e *S. aureus* por conta da produção de peróxido de hidrogênio, também inibem o desenvolvimento de bactérias do mesmo grupo com foi relatado (SILVA *et al.*, 2019). Apesar dos bons resultados observados, principalmente em relação a cepa *L. brevis* A6 ensaios *in vivo* ainda devem ser realizados a fim de cumprir a triagem de testes para ser considerado probiótico.

Outra funcionalidade de *L. brevis* que vem sendo muito estudada é a alta capacidade de produção de ácido γ -aminobutírico (GABA), que é o produto final da descarboxilação do ácido glutâmico em BL (FOSTER; KEMP, 2006). Este produto está sendo utilizado como aditivo alimentar ou como suplemento alimentar funcional. Pela aplicação de GABA sintéticos

em alimentos ser proibida, a alternativa é a utilização de BL que produzam GABA via processos fermentativos, porém são necessárias estratégias que mantenham as cepas de *L. brevis* vivas durante e após a fermentação para que as concentrações de GABA em queijos e leites fermentados tenha efeito funcional (WU; SHAH, 2017). Além disso, sabe-se que *L. brevis* isolado não tem a capacidade de acidificar o leite na presença de açúcares (glicose, galactose, lactose e frutose) e devido à ausência de proteinases o crescimento de tal bactéria é prejudicado, uma vez que é pela hidrólise da caseína que são liberados nitrogênio, carbono e hidrogênio utilizados na atividade metabólica e desenvolvimento microbiológico (WU; SHAH, 2017). Para solucionar as implicações citadas anteriormente, é indicado a suplementação do meio com pequenos peptídeos, como com soro do leite, para que o desenvolvimento tanto dos microrganismos quanto de GABA seja eficiente (WU; SHAH, 2017).

Lentilactobacillus parabuchneri membro da microbiota não iniciadora em queijos, encontrada neste estudo em baixa quantidade (0,03 % de abundância relativa) pode causar riscos à saúde dos consumidores devido a capacidade de formação rápida e eficaz de histamina em alimentos fermentados ou mal armazenados (MONIENTE *et al.*, 2021). A histamina é uma amina biogênica formada pela descarboxilação da L-histidina por ação da enzima L-histidina descarboxilase. Apesar de estar envolvida nos processos de secreção de ácido gástrico e respostas neurotransmissoras, também podem causar náuseas, dor de cabeça e abdominal, diarreia e até intoxicação alimentar quando se acumula em alimentos (BENKERROUM, 2016 ; GARDINI *et al.*, 2016), principalmente queijos e peixes (COLLINS *et al.*, 2011) por serem alimentos que sofrem proteólise (TUCK *et al.*, 2019). Apesar do leite cru apresentar baixas concentrações de histamina, em derivados lácteos esta é habitualmente encontrada (BENKERROUM, 2016; COSTA *et al.*, 2018; LINARES *et al.*, 2011 ; SPANO *et al.*, 2010). Em queijos, por conta da alta complexidade do meio e as diversas transformações bioquímicas que ocorrem durante o processo de maturação, este se torna um alimento propício para o desenvolvimento de tal composto orgânico. Mesmo que os níveis de histamina não estão delimitados nas indústrias de laticínios (COST *et al.*, 2018 ; LINARES *et al.*, 2011), sua presença em queijos está se tornando uma preocupação cada vez maior (BENKERROUM, 2016). Para que sejam produzidos derivados lácteos com menores teores ou até mesmo isentos de histaminas procedimentos como, BPF, controle de temperatura de armazenamento e maturação, pH, concentração de sais (BENKERROUM, 2016 ; GARDINI *et*

al., 2016 ; LINARES *et al.*, 2012) ou com utilização de enzimas, diamina oxidase ou histamina N-metiltransferase devem ser realizados (MAINTZ; NOVAK, 2007).

Ariceaga *et al.* (2019) realizaram uma série de avaliações, dentre elas microbiológica, em queijo Poro, um típico queijo mexicano de leite cru. Assim como em nosso trabalho, também foi detectada a presença de *Companilactobacillus farciminis* e *Limosilactobacillus fermentum*. Ambas são pertencentes ao grupo de bactérias lácticas não iniciadoras (NSLAB), sendo a primeira obrigatoriamente homofermentativa e a segunda espécie obrigatoriamente heterofermentativa (SETTANI; MOSCHETTI, 2010). Embora algumas cepas de *C. farciminis* (CIP 103136) sejam reconhecidas como probióticas, com ações anti-inflamatórias (MAZMANIAN, 2008), redução de hipersensibilidade do colón provocada pela liberação de óxido nítrico por *C. farciminis* (BELGNAOUIU *et al.*, 2006) e capacidade de provocar alteração de glicosilação de mucina em pessoas com síndrome do intestino irritável (DA SILVA *et al.*, 2014), os mecanismos implícitos desses efeitos à saúde ainda não são totalmente esclarecidos (MAES *et al.*, 2019).

Outras espécies de BAL identificadas neste estudo em menor abundância relativa foram *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rossiae* e *Leuconostoc mesenteroides*. A hiperuricemia é uma doença que tende a crescer na população mundial (PAINI *et al.*, 2021). Um recente estudo *in vitro* realizado por WU *et al.* (2021) com cepa *Limosilactobacillus fermentum* JL-3 isolada de produto lácteo fermentado denominado de “Jiangshui”, demonstrou que foi eficiente a capacidade de tal bactéria em degradar o ácido úrico (UA) em camundongos. Uma forma de solucionar os crescentes casos de pessoas com elevados índices de UA no organismo é a introdução de probióticos na alimentação que possuem a capacidade de degradar o ácido via microbiota intestinal (NISHITA *et al.*, 2017; RHEE; LEE; LEE, 2006). Além disso, *Lactobacillus rossiae*, uma bactéria láctica obrigatoriamente heterofermentativa (ILSE *et al.*, 2009) e que por apresentar adaptabilidade ecológica, diversidade genotípica e fenotípica (DI CAGNO *et al.*, 2007) é encontrada em diversos ambientes como, carne fermentada, abacaxi, trato gastrointestinal humano e de animais (DE ANGELIS *et al.*, 2014). Algumas cepas de *L. rossiae* foram identificadas com base em sua atividade antifúngica devido a sua capacidade em produzir ácido fenilático (CROWLEY; MAHONY; DOUWE, 2013; VALERIO *et al.*, 2009). Por ser atóxico para animais e humanos e não apresentar cheiro o ácido fenilático possui um alto potencial para ser utilizado em controle contra fungos em alimentos (LAVERMICOCCA; VALERIO; VISCONTI, 2003). Garofalo *et*

al. (2013) avaliaram a capacidade da cepa *Lactobacillus rossiae* LD108 em inibir o crescimento de *Apostichopus japonicus*, *Penicillium roseopurpureum* e *Eurotium repens* em produtos de panificação (pão e panetone). Como conclusão, os autores afirmam que *L. rossiae* LD108 isolada ou em associação com outra BL conseguiu prolongar a *self-life* dos produtos, mesmo naqueles intencionalmente contaminados com *Apostichopus japonicus*.

Em conjunto com outras bactérias lácticas já citadas, *Leuconostoc mesenteroides* é uma espécie de BL presente nas culturas iniciadoras de queijos que podem ser utilizadas no combate de patógenos como a *L. monocytogenes*. Além disso, auxiliam no desenvolvimento de sabor e textura dos queijos (ERKUS *et al.*, 2013). Em indústrias de laticínios a probabilidade da presença de *L. monocytogenes* é elevado, por conta da sua presença no próprio ambiente e devido a sua capacidade de sobreviver e crescer em produtos lácteos mesmo sob refrigeração (LOURENÇO *et al.*, 2017) devido a sua natureza psicrotrófica (NASSAU *et al.*, 2017). LIM *et al.* (2020) realizaram um estudo com a finalidade de investigar sobre a capacidade de *L. mesenteroides* isolada de um fermentado denominado “kimchi”, em conjunto com uma embalagem contendo extrato de semente de toranja no combate de *L. monocytogenes* em queijo macio. São crescentes os estudos e investimentos em embalagens de alimentos com característica sinérgica em relação ao prolongamento da vida útil do produto, controle de patógenos e não alteração das qualidades do alimento (LIM *et al.*, 2020). Os autores concluíram que a utilização de *L. mesenteroides* na fabricação do queijo e a embalagens contendo o extrato de semente de toranja foram barreiras positivas no controle do crescimento de *L. monocytogenes*.

São diversos os estudos que relacionam alimentação, diversidade da microbiota intestinal e respostas imunes (BARREA *et al.*, 2020). Apesar disso, o sistema imunológico deve apresentar boa especificidade e funcionar de forma otimizada para atuar contra patógenos sem que elimine os benefícios causados por alguns microrganismos (CHAPLIN, 2010). Venter *et al.* (2020) relataram que indivíduos que apresentam um bom estado nutricional, consequentemente terão um bom funcionamento do sistema imunológico. Por conta desses fatores, a abundância relativa menor que 100 *reads* que algumas bactérias patogênicas apresentaram em nosso trabalho, como: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella oxytoca*, *Cronobacter sakazakii*, *Moraxella osloensis*, podem não ser um problema para as pessoas com uma sistema imunológico saudável. Associado a isso, a presença de bactérias lácticas potencialmente probióticas, utilizadas como ingredientes ou naturalmente

encontrados em alguns alimentos fermentados, possuem a capacidade de reestabelecer as conhecidas imunidades inata e adaptativas (SOLDATI *et al.*, 2018; KOK; HUTKINS, 2018).

Por fim, vale destacar que com a utilização de métodos genotípicos foi possível classificar os microrganismos presentes no queijo colonial em relação ao filo, a classe, a ordem, ao gênero e a espécie. Possivelmente uma classificação tão específica não seria possível com a utilização de métodos clássicos de microbiologia que são dependentes de cultivo. Isto por que além da enorme gama de meios de cultivo existentes no mercado, sua aplicação deve ser o mais específica possível em relação ao microrganismo de interesse e aquelas células que estão injuriadas, geralmente, não podem ser quantificadas por essas técnicas (SHARMA; LEE; PARK, 2020).

5 CONCLUSÃO

Os queijos elaborados com leite cru apresentam naturalmente uma microbiota rica e que exerce grande influência no processo de maturação e nas características finais do produto. As técnicas de identificação microbiana em alimentos que não dependem de meios de cultivo foram bastante aprimoradas. No entanto, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de última geração (NGS) permitem um estudo ainda mais detalhado na identificação dos microrganismos presentes nos queijos, auxiliando na garantia de que o produto que está sendo comercializado não apresenta riscos à saúde dos consumidores e quando necessário pode contribuir com melhorias nos processos produtivos com a implementação de boas práticas de fabricação e melhorias nas práticas agropecuárias. Neste estudo os microrganismos que foram detectados por análise metagenômica são aqueles naturalmente encontrados no leite sem tratamento térmico e que também foram relatados em outros tipos de queijos artesanais de estudos nacionais e internacionais. Além disso, muitas das espécies que foram detectadas estão sendo abundantemente estudadas por conta do seu potencial probiótico quando aplicadas como ingredientes e antibacterianos naturais em derivados lácteos fermentados, por exemplo, *Lactocaseibacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Enterococcus durans*, *L. plantarum* e *Lactococcus lactis*. Além disso, potenciais probióticos de nova geração (como do gênero *Enterococcus spp.*) puderam ser identificados nesta amostra.

REFERÊNCIAS

ALBENZIO M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 35-48, 2001. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00533-x.

ALDRETE-TAPIA, A. *et al.* High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. **Food Microbiology**, v. 44, p. 136-141, 2014. DOI: 10.1016/j.fm.2014.05.022.

ALEGRÍA, Á. *et al.* Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 44–51, 2009. DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2009.09.023.

AMANN, R. I; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-69, 1995. PMID: 7535888.

ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 184 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. DOI: 10.11606/T.11.2007.tde-28112007-101523.

ALBENZIO M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 35-48, 2001. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00533-x.

ARFI, K. *et al.* Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 883–891, 2005. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.07.019.

ARICEAGA, C. C. G. *et al.* Physicochemical, Sensorial and Microbiological Characterization of Poro Cheese, an Artisanal Mexican Cheese Made from Raw Milk. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 509, 2019. DOI: 10.3390/foods8100509.

BARBOSA, L. *et al.* As tendências da alimentação. **Brasil Food Trends 2020**. Campinas: ITAL, 2020. Cap. 3, p. 39-47. Disponível em: <https://alimentosprocessados.com.br/arquivos/Consumo-tendencias-e-inovacoes/Brasil-Food-Trends-2020.pdf>.

BARREA, L. *et al.* Nutrition and immune system: from the mediterranean diet to dietary supplementary through the microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-25, 2020. DOI: 10.1080/10408398.2020.1792826.

BARROS, C. P. *et al.* Probióticos, Prebióticos, Paraprobióticos e Pos-Bióticos de Nova Geração. In: ZACARCHENCO, Patrícia Blumer (org.). **Probióticos e prebióticos (livro eletrônico) - desafios e avanços**. São Paulo: Setembro Editora, 2020. Cap. 1. p. 24-51. Disponível em: file:///C:/Users/natal/Downloads/Probioticos%20e%20Prebioticos_%20interativo%20(1).pdf.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C.; ZDOLEC, N. Lactobacillus plantarum with Functional Properties: an approach to increase safety and *shelf-life* of fermented foods. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 1-18, 2018. DOI: 10.1155/2018/9361614.

BELGNAOUIU, A. A. *et al.* *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. **GUT Journal**, v. 55, n. 8, p. 1090-1094, 2006. DOI: 10.1136/gut.2005.084194.

BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: origin, incidence, and control means. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 801-826, 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12212.

BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001. DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00056-5.

BEZKOROVAINY, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 399s-405s, 2001. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.399s.

BJÖRKSTÉN, B. *et al.* Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 4, p. 516-520, 2001. DOI: 10.1067/mai.2001.118130.

BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3611-3629, 2018. DOI: 10.3168/jds.2017-13345.

BONATSOU, S. *et al.* Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 1-16, 2017. DOI: 10.3390/microorganisms5020030.

BORELLI, B. M. *et al.* Identification of Staphylococcus spp. isolated during the ripening process of a traditional minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 481-487, 2011. DOI: 10.1590/s0102-09352011000200028.

BOTTARI, B. *et al.* How the Fewest Become the Greatest. *L. casei*'s Impact on Long Ripened Cheeses. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2866, p. 1-6, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02866.

BOTTARI, B. *et al.* The interrelationship between microbiota and peptides during ripening as a driver for Parmigiano Reggiano cheese quality. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-11, 2020. DOI:10.3389/fmicb.2020.581658.

BRAEM, G. *et al.* Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3-4, p. 383-390, 2012. DOI: 10.1016 / j.vetmic.2011.12.031.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa N° 73, de 23 de setembro de 2019. Estabelecer, em todo o território nacional, o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Brasil: Diário Oficial da União, Brasília, 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa N° 30, de 07 de agosto de 2013. Permitir que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. Brasil: Diário Oficial da União, Brasília, 2013.

BRASIL. Lei n° 17.486 de 16 de janeiro de 2018. Decreto N° 362, de 01 de janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2018/04/Lei-17.486-queijo-artesanal-leite-cru-Di%C3%A1rio-oficial.pdf>.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento Portaria. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.

BRITO, M. A. V. P. **Conceitos básicos de qualidade e sanidade do gado leiteiro**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 28, n. 173, p.4-12, 1999.

BRUNO, L. M; CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. Fortaleza (CE): **Embrapa Agroindústria Tropical**; 2009. Documentos 124. 29p. ISSN 1677-1915, 124.

BUFFA, M. *et al.* Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or highpressure treated goat's milk. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 927- 934, 2001. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00141-8.

CALLANAN, M. *et al.* Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 2, p. 727-735, 2008. DOI: 10.1128 / JB.01295-07.

CAMBRONEL, M. *et al.* Influence of Catecholamines (epinephrine/norepinephrine) on Biofilm Formation and Adhesion in Pathogenic and Probiotic Strains of *Enterococcus faecalis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1501, p. 1-12, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01501.

CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T. O leite em 2018 e perspectivas para 2019. In: EMBRAPA (org.). **Anuário gado leite 2019**. Texto Comunicação Corporativa, 2019. p. 10-12. Disponível em: file:///C:/Users/natal/Downloads/Anuario-LEITE-2019%20(1).pdf.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

CARVALHO, M. de M. **A Agroindústria Familiar Rural e a Produção de Queijos Artesanais no Município de Seara, Estado de Santa Catarina – Um Estudo de Caso**. 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável) -Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2015.

CARVALHO, M. de M. *et al.* A produção de queijo colonial artesanal no município de Seara, estado de Santa Catarina, frente a legislação brasileira. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 70, n. 5, p. 253-261, 2016. DOI: 10.14295/2238-6416.v70i5.463.

CARVALHO, M. de M. *et al.* Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9711–9720, 2019. DOI: 10.3168 / jds.2019-16373.

CASSOLI, L. D. *et al.* Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.1, p.44-48, 2007. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2007.00297.x.

CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação de contagem bacteriana em leite cru**. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

CASTRO, R. D. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10579.

CASTRO, R. D. **Queijo minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de campo das vertentes – MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano.** 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, v. 47, p. 45–61, 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.001.

CENTENO, J. A. *et al.* Effect of Wild Strains of *Lactococcus lactis* on the Volatile Profile and the Sensory Characteristics of Ewes' Raw Milk Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3164-3172, 2002. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302 (02)74404-4.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.

CHAVES, A. C. S. D.; SANTOS, K. M. O. Culturas lácticas em produtos lácteos. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade.** 4. ed. Elsevier Brasil, 2019, p. 129-143. ISBN (versão digital): 978-85-352-8082-1.

CHOI, H. K. *et al.* Purine-Rich Foods, Dairy and Protein Intake, and the Risk of Gout in Men. **New England Journal Of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1093-1103, 2004. DOI: 10.1056/nejmoa035700.

CHOMBO-MORALES, P. *et al.* Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 1153–116, 2016. DOI: 10.1016 / j.lwt.2015.09.044.

CHRISTOFF, A. P. **Utilizando marcadores moleculares para identificação de micro-organismos.** Florianópolis, SC: Neoprospecta, 2016. E-book. Disponível em: file:///C:/Users/natal/Downloads/TCC%20Bruna%20Marchesan%20Maran%20vers%C3%A3o%20final%20esse.pdf.

ÇITAK, S.; YUCEL, N.; ORHAN, S. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p. 21-31, 2004. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00122.x.

CLARRIDG, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n. 4, p. 840–862, 2004. DOI:10.1128/cmr.17.4.840-862.2004.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 6, p. 1403–1411, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-1120-8.

COGAN, T. M, *et al.* Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 63, n. 3, p. 409-421, 1997. DOI: 10.1017/S0022029997002185.

COLLINS, F. S.; MORGAN, M.; PATRINOS, A. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 286-290, 2003. Doi: 10.1126/science.1084564.

COLLINS, J. D. *et al.* Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **European Food Safety Authority Journal**, v. 9, n. 10, p. 2393, 2011. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.

COLLINS, M. D. The Genus *Brevibacterium*. **The Prokaryotes**, p. 1013-1019, 2006. Springer New York. DOI: 10.1007/0-387-30743-5_42.

CONDÉ, P. R. **Potencial deteriorador e diversidade da microbiota do leite cru granelizado**. 2018. 164 F. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba (MG), 2018.

CÓRDOVA U.A. *et al.*, **O Queijo Artesanal Serrano Como Fator de Desenvolvimento Nos Campos de Altitude do Sul do Brasil**. EPAGRI. 2016. Disponível em:http://fidamercosur.org/claeh/images/2015/2_Concurso_BPAF/Associativismo/QueijoArtesanalSerrano.pdf.

CORREIA, V. T. da V.; ASSIS, I. C. L. de. Queijos artesanais: revisão de literatura. **Revista eletrônica Nutri Time**, v. 14, n. 6, p. 8001–8008, 2017. ISSN: 1983-9006.

CORSETTI, A.; CIARROCCHI, A.; PRETE, R. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. **Reference Module in Food Sciences**, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00856-8.

COSTA, M. P. *et al.* Biogenic Amines as Food Quality Index and Chemical Risk for Human Consumption. **Food Quality: Balancing Health and Disease**, p. 75-108, 2018. DOI: 10.1016/b978-0-12-811442-1.00002-x.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; DOUWE, V. D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 93–109, 2013. DOI: 10.1016 / j.tifs.2013.07.004.

CUNHA, P. **Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos**. Florianópolis, SC: Neoprospecta, 2016. E-book. Disponível em: <file:///D:/FACULDADE/TCC%20NOVO/M%C3%89TODOS+DE+TIPAGEM+MICROBIOL%C3%93GICA%20portugu%C3%AAs.pdf>.

DA SILVA, S. *et al.* Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 307, n. 4, p. G420-G429, 2014. DOI: 10.1152/ajpgi.00290.2013.

DAS, D.; GOYAL, A. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 263-268, 2015. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.11.013.

DE ANGELIS, M. *et al.* *Lactobacillus rossiae*, a Vitamin B12 Producer, Represents a Metabolically Versatile Species within the Genus *Lactobacillus*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107232, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107232.

DE CESARE, A. Metagenomics to investigate the dynamics of microbial communities in poultry and poultry products. **Lohmann Information**, v. 53, n. 2, 2019.

DE LIMA, J. M. P. **Avaliação do microbioma do queijo de coalho**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

DE VOS, P. Multilocus Sequence Determination and Analysis. **Methods In Microbiology**, v. 38, cap. 17, p. 385–407, 2011. DOI: 10.1016/b978-0-12-387730-7.00017-6.

DeSANTIS, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environment Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-72, 2006. DOI:10.1128/AEM.03006-05.

DE SOUZA, B. M. S. *de et al.* *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 382-396, 2018. DOI: 10.1007/s12602-018-9406-y.

DEETAE, P. *et al.* Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 1161-1171, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-1095-5.

DEL RIO, B. *et al.* *Lactobacillus rossiae* strain isolated from sourdough produces putrescine from arginine. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-22309-6.

DELAMARE, A. P. *et al.* Microbiological, Physico-Chemical and Sensorial Characteristics of Serrano, an Artisanal Brazilian Cheese. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1068-1075, 2012. DOI: 10.4236 / fns.2012.38142.

DELBÈS, C.; ALI-MANDJEE, L.; MONTEL, M.-C. Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1882-1891, 2007. DOI: 10.1128/aem.01716-06.

DELGADO, S. *et al.* Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. **Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 103-111, 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2013.04.015.

DELGADO, S.; MAYO, B. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus spp.* strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 309-319, 2004. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00323-4.

DEMERS-MATHIEU, V. *et al.* Effect of the low-fat Cheddar cheese manufacturing process on the viability of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei/casei*, and *Lactobacillus plantarum* isolates. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 327-337, 2016. DOI: 10.1016/j.jff.2016.04.025.

DERAKHSHANI, H. *et al.* Invited review: microbiota of the bovine udder. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 12, p. 10605-10625, 2018. DOI: 10.3168/jds.2018-14860.

DERRIEN, M.; VLIEG, J. E. T. V. H. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 354-366, 2015. DOI: 10.1016/j.tim.2015.03.002.

DI CAGNO, G. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* strains isolated from sourdough. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 821—835, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03389.x.

DINAKAR, P.; MISTRY, V. V. Growth and Viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 2854-2864, 1994. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302 (94)77225-8.

DOLCI, P. *et al.* Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 278-287, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.04001.x.

DORIGON, C. O Mercado Informal dos Produtos Coloniais da Região Oeste de Santa Catarina. In: I ENCONTRO LUSO-BRASILEIRO DE ESTUDOS DO CONSUMO, 2010, Rio de Janeiro. V **ENEC - Encontro Nacional de Estudos do Consumo**. Rio de Janeiro: S.L, 2010. p. 1-20. Disponível em: https://estudosdoconsumo.com/wp-content/uploads/2018/05/5.2.3-Dorigon-O_mercado_informal_dos_produtos_coloniais.pdf.

DORIGON, C. **Mercados de produtos coloniais da Região Oeste de Santa Catarina: em construção**. 2008, 437 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DORIGON, C.; RENK, A. Técnicas e métodos tradicionais de processamento de produtos coloniais: de “miudezas de colonos pobres” aos mercados de qualidade diferenciada. **Revista de Economia Agrícola**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola. v. 58, n. 1, p. 101 - 113, 2011. ISSN 1983-7747.

DOULGERAKI, A. I. *et al.* Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n. 2, p. 130–141, 2012. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.

DURANTI, S. *et al.* Exploring the ecology of bifidobacteria and their genetic adaptation to the mammalian gut. **Microorganismos**, v. 9, n. 1, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms9010008.

EATON, T. J.; GASSON, M. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 67, v. 4, p. 1628–1635, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001.

ECKERT, R. G.; WEBBER, M. Controle de qualidade microbiológico de queijos maturados comercializado na feira do pequeno produtor da cidade de Cascavel – PR. **Revista Higiene Alimentar**, v. 30, n. 252/253, p. 80-85, 2016.

EMBRAPA. **ANUÁRIO leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2019. 53 p.

EPAGRI. Queijo artesanal serrano recebe IG Campos de Cima da Serra. Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/03/06/queijo-artesanal-serrano-recebe-ig-campos-de-cima-da-serra/>.

EPAMIG. **Queijo Minas Artesanal - principais problemas de fabricação: manual técnico de orientação ao produtor**, p. 40, 2019. ISBN 978-85-99764-43-5.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 297–314, 2004. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.006.

ERKUS, O. *et al.* Multifactorial diversity sustains microbial community stability. **ISME Journal**, v. 7, n. 11, p. 2126-36, 2013. DOI: 10.1038/ismej.2013.108.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, Leandro Marcio (org.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. p. 27-64. ISBN 978-85-89265-22-5.

FITZGERALD, R.; MURRAY, B. A. Bioactive peptides and lactic fermentations. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 118-125, 2006. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2006.00250.x.

FOGUESATTO, C. R. *et al.* Análise de Viabilidade Econômico-Financeira de uma Agroindústria Familiar para a Produção de Queijo Tipo Colonial. In: **3º Fórum Internacional Ecoinovar**, Santa Maria, 2014, p. 1-10. Disponível em:

<https://docplayer.com.br/15685562-Analise-de-viabilidade-economico-financeira-de-uma-agroindustria-familiar-para-a-producao-de-queijo-tipo-colonial.html>.

FONTANA, A. *et al.* Genomic Comparison of *Lactobacillus helveticus* Strains Highlights Probiotic Potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-4, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01380.

FORTINA, M. G. *et al.* A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 204-211, 2008. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.014.

FORTINA, M. G. *et al.* Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* *sp. nov.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1717-1721, 2004. DOI: 10.1099/ijs.0.63190-0.

FOSTER, A. C.; KEMP, J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 7-17, 2006. DOI: 10.1016/j.coph.2005.11.005.

FRANCIOSA, I. *et al.* Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, p. 26–32, 2018. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.038.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. *Enterococcus* at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 1-24, 1999. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00007-0.

FRANZ, C. M. A. P. *et al.* *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 125-140, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014.

FREO, J. D.; REOLON, J. Qualidade dos produtos derivados da carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 140, p. 53-59, 2006.

FRICKER, Martina *et al.* Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 24-30, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025.

GAALOUL, N. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk. **Journal of Food Safety**, v. 34, n. 4, p. 300–311, 2014. DOI:10.1111/jfs.12126.

GALIA, W. *et al.* Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 2, p. 89- 95, 2009. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.08.004.

GARCIA-GONZALES, N. *et al.* Adhesion properties of food-associated *Lactobacillus plantarum* strains on human intestinal epithelial cells and modulation of IL-8 release. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2392, p. 1-11, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02392.

GARDINI, F. *et al.* Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1218, p. 1-18, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. The Revised Road Map to the Manual. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-46, 2015. DOI: 10.1002/9781118960608.bm00023.

GAROFALO, C. *et al.* Selection of Sourdough *Lactobacilli* with Antifungal Activity for Use as Biopreservatives in Bakery Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7719–7728, 2012. DOI: 10.1021 / jf301173u.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. Conservação de Alimentos por Fermentações. In: GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009. p. 377-398. ISBN: 9788521313823.

GAYA, P. *et al.* Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 849-855, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00932.x.

GENESAN, B. *et al.* Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1642-1656, 2014. DOI: 10.1111/jam.12482.

GILL, J. J. *et al.* Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. **Fems Microbiology Ecology**, v. 56, n. 3, p. 471-481, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00091.x.

GIRAFFA, G. *Lactobacillus helveticus*: importance in food and health. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-2, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00338.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1228-1232, 2000. American Society for Microbiology. DOI:10.1128/aem.66.3.1228-1232.2000.

H.-P.BACHMANN *et al.* Cheese | Raw Milk Cheeses. In: FUQUAY, John W. *et al.* (ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed.: Academic Press, 2011. p. 652-660. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00519-7.

HAHNE J. Isolation and characterization of *Corynebacterium spp.* from bulk tank raw cow's milk of different dairy farms in Germany. **PLoS One**, v. 13, n. 4, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0194365.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.

HARMSSEN, D. *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting using a novel software for spa-repeat determination and database management. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5442-5448, 2003. DOI: 10.1128/jcm.41.12.5442-5448.2003.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 374-379, 2001. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.374s.

HERMANNNS, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013. 101 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HILLERTON, E. Contagem bacteriana no leite: importância para a indústria e medidas de controle. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, n. 2, 2000, Curitiba, Brasil. **Anais**. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Paraná, 2000. 104p.

HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 935-941, 2004. DOI: 10.1111 / j.1365-2672.2004.02346.x.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Microbiology: metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481-3, 2008. DOI: 10.1038/455481a.

HUGHES, J. B. *et al.* Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, v. 10, p. 4399-406, 200. DOI: 10.1128/aem.67.10.4399-4406.2001.

HUSSEIN, W. E.; XIAOLI, L.; YOUSEF, A. E. Draft genome sequence of *Enterococcus durans* OSY-EGY, a multiple-antimicrobial-peptide producer isolated from Egyptian hard cheese. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 28, p. 1-2. DOI: 10.1128/MRA.00303-19.

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

ILSE, S. *et al.* Polyphasic taxonomic characterization of *Lactobacillus rossiae* isolates from Belgian and Italian sourdoughs reveals intraspecific heterogeneity. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 151-156, 2009. DOI: 10.1016/j.syapm.2008.12.006.

INARES, D. M. *et al.* Biogenic Amines in Dairy Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, p. 691-703, 2011. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813.

IRKIN, R. Determination of microbial contamination sources for use in quality management of cheese industry: “Dil” cheese as an example. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 5, n. 1, p. 91-96, 2010. DOI: 10.1007 / s00003-009-0525-y.

IRLINGER, F. *et al.* Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. **Fems Microbiology Letters**, v. 362, n. 2, p. 1-11, 2014. DOI: 10.1093/femsle/fnu015.

ISHIKAWA, E. *et al.* Ethnic diversity of gut microbiota: species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus Bifidobacterium in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 265-270, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.010.

JENSEN, M. P.; VOGENSEN, F. K.; ARDÖ, Y. Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 11, p. 661-668, 2009. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.04.001.

JEPRAS, R. I. *et al.* Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.7, p.2696-2701, 1995. DOI:10.1128/AEM.61.7.2696-2701.1995.

JUNIOR, P. I. T. *et al.* *Pseudomonas spp.* e outros microrganismos psicrotóxicos em queijo Minas Frescal brasileiro inspecionado e não inspecionado: potencial de produção proteolítico, lipolítico e de AprX. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 10, p. 807-815, 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-pvb-6037.

KAMIMURA, B. A. **A Metagenomic Approach to the Study of Microbial Ecology and Safety of Brazilian Artisanal Cheeses: Bacterial diversity of artisanal cheese processing environment from Serra da Canasta region**. 2018. 154 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, jun. 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2018.12.014.

KAZOU, M. *et al.* Microbial Flora. In: TOLDRÁ, F.; NOLLET, L. M. L. **Handbook of Dairy Foods Analysis**. 2. ed: Taylor & Francis, 2021. cap. 32. p. 673-697. ISBN 9780367343132.

KHELISSA, S.; CHIHIB, N.-E.; GHARSALLAOUI, A. Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 2, p. 465-480, 2020. DOI: 10.1007/s00203-020-02054-z.

KOK, C. R.; HUTKINS, R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 1, p. 4–15, 2018. DOI: 10.1093/nutrit/ nuy056.

KUMAR, M. *et al.* Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. **International**

Journal of Antimicrobial Agents, v. 48, n. 3, p. 265-270, 2016. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.05.014.

LADERO, V. *et al.* Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of putrescine-producing *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6409-6418, 2011(a). DOI: 10.1128/AEM.05507-11.

LADERO, V. *et al.* Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 554-561, 2011(b). DOI: 10.1016/j.fm.2010.11.005.

LADERO, V. *et al.* Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 933-939, 2010. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.026.

LANDETA, G. *et al.* Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 272-280, 2013. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.05.019.

LARSEN, M. V. *et al.* Multilocus Sequence Typing of Total Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p.1355–1361, 2012. DOI: 10.1128/JCM.06094-11.

LECLERC, P.-L. *et al.* Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 12, p. 995-1004, 2002. DOI: 10.1016/s0958-6946(02)00125-5.

LI, J. *et al.* Bacterial microbiota of Kazakhstan cheese revealed by single molecule real time (SMRT) sequencing and its comparison with Belgian, Kalmykian and Italian artisanal cheeses. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-11. DOI: 10.1186 / s12866-016-0911-4.

LIM, J. Y. *et al.* Using lactic acid bacteria and packaging with grapefruit seed extract for controlling *Listeria monocytogenes* growth in fresh soft cheese. **Journal Of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 8761-8770, 2020. DOI:10.3168/jds.2020-18349.

LIMA, C. D. L.C. *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009. DOI: 10.1590/s0102-09352009000100037.

LINARES, D. M. *et al.* Biogenic Amines in Dairy Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, p. 691-703, 2011. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813.

LITTLE, C. L. *et al.* Microbiological quality of retail cheese made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 304-312, 2008. DOI: 10.1016/j.fm.2007.10.007.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; AMIGO, L.; RECIO, I. A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. **Dairy Science and Technology**, v. 92, n. 5, p. 419-438, 2012. DOI: 10.1007/s13594-012-0066-5.

LOURENÇO, A. *et al.* Antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in Queso fresco. **Food Microbiology**, v. 64, p. 47-55, 2017. DOI: 10.1016/j.fm.2016.12.014.

LOZO, J. *et al.* Comparative analysis of β -casein proteolysis by PrtP proteinase from *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* BGHN14, PrtR proteinase from *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 and PrtH proteinase from *Lactobacillus helveticus* BGRA43. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 11, p. 863-868, 2011. DOI: 10.1016 / j.idairyj.2011.05.002.

LUGLI, G. A. *et al.* Isolation of novel gut bifidobacteria using a combination of metagenomic and cultivation approaches. **Genome Biology**, v. 20, n. 96, 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1711-6.

MADUREIRA, K. M. *et al.* Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híbridas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 311-316, 2010. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000400005.

MAES, E. *et al.* Structure and biological activities of a hexosamine-rich cell wall polysaccharide isolated from the probiotic *Lactobacillus farciminis*. **Glycoconjugate Journal**, v. 36, n. 1, p. 39-55, 2019. DOI: 10.1007/s10719-018-09854-y.

MAIDEN, M. C. J. *et al.* MLST revisited the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728–736, 2013. DOI: 10.1038 / nrmicro3093.

MAIDEN, M. C. J. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140.

MAIETTI, L. *et al.* Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 509–517, 2007. DOI: 10.1016/j.syapm.2007.05.002.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1185-1196, 2007. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185.

MANGIA, N. P.; FANCELLO, F.; DEIANA, P. Microbiological characterization using combined culture dependent and independent approaches of Casizolu pasta filata cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 2, p. 329-45, 2016. DOI: 10.1111/jam.13001.

MARDANOV, A. V.; KADNIKOV, V. V.; RAVIN, N. V. Metagenomics: A Paradigm Shift in Microbiology. **Metagenomics**. 2 ed.: Elsevier, 2018. p. 1–13. DOI: 10.1016/B978-0-08-102268-9.00001-X.

MARINO, M. *et al.* Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. **Food Microbiology**, v. 79, p. 123-131, 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2018.12.007.

MAUKONEN, J.; SAARELA, M. Microbial communities in industrial environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 238–243, 2009. DOI: 10.1016/j.mib.2009.04.002.

MAZMANIAN, S. Capsular polysaccharides of symbiotic bacteria modulate immune responses during experimental colitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. E1-E20, 2008. DOI: 10.1097/01.mpg.0000313824.70971.a7. PMID: 18354314.

MCNULTY, N. P. *et al.* The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Science translational medicine**, v. 3, n. 106, p. 106ra106, 2011. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002701.

MEADE; E.; SLATERRY, M. A.; GARVEY, M. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: resistance is futile? **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 32, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9010032.

MEIRA, S. M. M. *et al.* Probiotic potential of Lactobacillus spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal Dairy Research**, v. 79, n. 1, p. 119-127, 2012. DOI: 10.1017/S0022029911000884.

MOENS, F.; VERCE, M.; DE VUYST, L. Lactate and acetate based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 225-236, 2017. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.019.

MONIENTE, M. *et al.* Histamine accumulation in dairy products: microbial causes, techniques for the detection of histamine producing microbiota, and potential solutions. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1481-1523, 2021. DOI: 10.1111/1541-4337.12704.

MONTEL, M.-C. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.

MORAES, P. M. *et al.* Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 318-328, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05341.x.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: A importância destes microrganismos para alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015. ISSN 2238-6416.

Nassau, T. J. V. *et al.* Combination of endolysins and high pressure to inactivate *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 68, p. 81-88, 2017. DOI: 10.1016/j.fm.2017.06.005.

NEBE-VON-CARON, G.; BADLEY, R. A. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. **Journal of Microscopy**, v.179, ed. 1, p.55-66, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1995.tb03612.x.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite - Utilização no Brasil - Semina: Ciências Agrárias. Londrina, v. 21, n. 1, p. 115-126, mar. 2000. Disponível em: file:///C:/Users/natal/Downloads/4207-17392-1-PB.pdf.

NIERMAN, W. C. *et al.* Genome data: what do we learn? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, ed. 3, p. 343-348, 2000. DOI: 10.1016/s0959-440x(00)00094-4.

NISHITA, M. *et al.* Ror2 signaling regulates Golgi structure and transport through IFT20 for tumor invasiveness. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017. DOI: 10.1038/s41598-016-0028-x.

NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A. K. Genotypic Microbial Community Profiling: a Critical Technical Review. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 2, p. 276–289, 2007. DOI: 10.1007/s00248-006-9199-5.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotólicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009. DOI: 10.22456/1679-9216.16243.

NUNES, G. S. **Qualidade microbiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos do queijo de coalho artesanalmente produzido.** 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Piau, Bom Jesus, 2017.

O'CALLAGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 925, p. 1-23, 2016. DOI: 10.3389 / fmicb.2016.00925.

O'SULLIVAN, D. J. *et al.* Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2013. DOI: 10.3389 / fmicb.2013.00001.

O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. In: MCSWEENEY, P. L. H. *et al* (ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology:** Academic Press, 2017, p. 301–316. DOI: 10.1016/b978-0-12-417012-4.00012-0.

OKAMOTO, M. *et al.* *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 144-148, 2008. DOI: 10.1099/ijs.0.65296-0.

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Processamento de Produtos Lácteos: Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Doce de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais**. 3. ed. Elsevier Brasil, 2017. p. 11-66. ISBN (versão digital): 978-85-352-8086-9.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium sp.* **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 937-945, 2007. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.01.002.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos. Alimentos de origem animal**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005, cap. 5, p. 85-104.

OZTURKOGLU, B. S. *et al.* The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 50–53, 2016. DOI: 10.1016 / j.idairyj.2015.09.011.

PASSERINI, D. *et al.* Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. 1-12, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0015306.

PEHRSON, M. E. de S. F. **Efeito da adição de culturas probióticas sobre aspectos microbiológicos e parâmetros fermentativos de Queijo Artesanal das Terras Altas da Mantiqueira**. 2017, 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PEREIRA, L. S. **Qualidade microbiológica e físico-química do queijo coalho comercializado na cidade de São Luís - MA**. 2006. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2006.

PEREIRA, M. T.; SANTANA, E. H. W.; SANTOS, J. S. Importância das Bactérias Ácido Lácticas e não Starter (NSLAB) na Tecnologia de Produção dos Derivados Lácteos. **Ensaios**, v. 24, n. 4, p. 348-352, 2020. DOI: 10.17921/1415-6938.2020v24n4p348-352.

PÉREZ-LOSADA, M. *et al.* Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38-53, 2013. DOI: 10.1016 / j.meegid.2013.01.009.

PERRIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160-169, 2017. DOI: 10.1016/j.fm.2017.02.005.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos físicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. vol. 27, n. 2, p. 293-300, 2004. DOI: 10.1590/S0100-40422004000200020.

PIANI, F. *et al.* Hiperuricemia e doença renal crônica: tratar ou não tratar. **Brazilian Journal of Nephrology**, p. 1-8, 2021. DOI: 10.1590/2175-8239-jbn-2020-u002.

PICON, A.; GARCÍA-CASADO, M. A.; NUÑEZ, M. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 3, p. 156-162, 2010. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.10.002.

PIENIZ, S. *et al.* Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, p. 251-256, 2014. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.09.055.

PIMENTEL, T. C.; OLIVEIRA, M. N.; CRUZ, A. G. Premiunização e Sensorialidade: o mercado de produtos *premium* e gourmet. In: ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. (ed.). **Brasil Dairy Trends 2020**. Campinas: ITAL, 2017. Cap. 8. p. 2012-240. Disponível em: <http://brasildairyrends.com.br/3/>.

PINTO, C. L. O. *et al.* Microbiologia do leite cru. In: CRUZ, Adriano G. *et al.* **MICROBIOLOGIA, HIGIENE E CONTROLE DE QUALIDADE NO PROCESSAMENTO DE LEITES E DERIVADOS**: Elsevier, 2019. Cap. 2. p. 5-38. Disponível em: <https://eu-ireland-custom-media-prod.s3-eu-west-1.amazonaws.com/Brasil/Downloads/14-10/microbiologia.pdf>.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, P. D590-D596, 2013. DOI:10.1093/nar/gks1219.

QUIGLEY, L. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.

RAFAEL, V. da C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo minas artesanal da Serra da Canastra**. 2017. 158f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.

RAMIAH, K; REENEN, C. A. V.; DICKS, L. M. T. Expression of the mucus adhesion genes Mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene plaA of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 405-409, 2007. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.011.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 1, p. 1–9, 2009. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.04.001.

REDONDO-USEROS, N. *et al.* Associations of Probiotic Fermented Milk (PFM) and Yogurt Consumption with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Components of the Gut Microbiota in Healthy Adults. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 1-18, 2019. DOI: 10.3390/nu11030651.

RENYE, J. A. *et al.* Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3311–3315, 2011. DOI: 10.3168/jds.2011-4177.

RESENDE, M. F. S. **Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. 2010, 72f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RESENDE, M.F.S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011. DOI: 10.1590/S0102-09352011000600039.

REUTER, G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 43–53, 2001.

RHEE, S. K.; LEE, J-E; LEE, C-H. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented Foods. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. S5, p. 1-13, 2011. DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S5.

RIBEIRO, A. C. *et al.* Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 113-117, 2005. DOI: 10.1590/S1413-70542005000100014.

RIES, J. E.; LUZ, J. C. S.; WAGNER, S. A. Projeto de qualificação e certificação do queijo serrano produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul: relato parcial da experiência. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.5, n.1, p.10-19, 2012. Disponível em: http://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/teses/Rev-Agr_02-Rel-Exp.pdf.

RIOS, D. L. *et al.* Matatranscriptoma em alimentos: o impacto da expressão gênica do microbioma na saúde humana. In: VERRUCK, Silvani (org.). **AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. Guarujá: Editora Científica Digital, 2020. Cap. 21. p. 292-306. DOI: 10.37885 / 201001889.

RIOS-COVIAN, D. *et al.* Interactions between *Bifidobacterium* and Bacteroides Species in Cofermentations are Affected by Carbon Sources, Including Exopolysaccharides Produced by Bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7518 –752, 2013. DOI: 10.1128 / AEM.02545-13.

RIVAS, B. L.; MARCOBAL, A.; MUNÓZ, R. Improved multiplex PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amine. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, n. 2, p. 367-372, 2005. DOI: 10.1016 / j.femsle.2005.02.012.

ROCHA, A. M. P. **Controle de Fungos Durante a Maturação do Queijo Minas Padrão**. 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

RUIZ, J. Á. G.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1075-1080, 2004. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.04.007.

SABAT, A. J. *et al.* Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 4, p. 1-15, 2013. DOI: 10.2807/ese.18.04.20380-en.

SALINAS, R.D. **Alimentos e nutrição: Introdução à Bromatologia**/Rolando D. Salinas; tradução Fátima Murad. – 3 edição – Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 278.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 441-446, 1975. DOI: 10.1016 / 0022-2836 (75) 90213-2.

SANT ‘ANNA, F. M. **Microbioma do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação**. 2019. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SANTA CATARINA. Decreto nº 362, de 21 de novembro de 2019. Regulamenta a Lei no 17.486, de 2018, que dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. Brasil: Diário Oficial do Estado, 2019.

SANTA CATARINA. Lei nº 17.003, de 1 de setembro de 2016. Dispõe sobre A Produção e A Comercialização do Queijo Artesanal Serrano, no Estado de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 1 de setembro de 2016.

SANTA CATARINA. Portaria SAR Nº 32, de 07 de novembro de 2018. Norma Interna Regulamentadora do Queijo Colonial (Maturado), 2018.

SANTANA, R. S. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008. DOI: 10.1590/S0102-09352008000600031.

SCHRÖDER, J. *et al.* Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 2-23, 2011. DOI: 10.1186 / 1471-2164-12-545.

SERIDAN, B. *et al.* Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 465-470, 2012. DOI: 10.1590/S0102-09352012000200029.

SETTANI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691–697, 2010. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.023.

SHAPIRO, H. M. Membrane Potential Estimation by Flow Cytometry. **Methods**, v. 21, n. 3, p. 271–279, 2000. DOI: 10.1006/meth.2000.1007.

SHARMA, A.; LEE, S.; PARK, Y.-S. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 1301-1318, 2020. DOI: 10.1007/s10068-020-00802-x.

SHARMA, P. *et al.* Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176-195, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.025.

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. 2007. 210 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, J. G. *et al.* Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá, Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 647-657, 2019. DOI: 10.1590/1678-4162-10188.

SILVETTI, T.; MORANDI, S.; BRASCA, M. Biopreservation potential of *Enterococcus faecalis* isolated from Italian traditional raw milk cheeses. **Cyta - Journal of Food**, v. 12, n. 3, p. 210-217, 2013. DOI: 10.1080/19476337.2013.825327.

SIMPSON, P. J. *et al.* Genomic diversity and relatedness of Bifidobacteria isolated from a porcine cecum. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 8, p. 2571–2581, 2003. DOI: 10.1128/JB.185.8.2571–2581.2003.

SIQUEIRA, K. B. **O consumo de lácteos na pandemia**. Milk Point, 2020. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/kennya-siqueira/consumo-de-lacteos-na-pandemia-estudo-da-embrapa-219327/>.

SIQUEIRA, K. B. **O Mercado Consumidor de Leite e Derivados**. Circular técnica n. 120, Embrapa, 2019. ISSN 1678-037x.

SLOW FOOD. **Queijo Artesanal Serrano: história e tradição nos campos de altitude do Sul do Brasil**, 2008. Disponível em: <https://slowfoodbrasil.org/2008/08/queijo-artesanal-serrano-historia-e-tradicao-nos-campos-de-altitude-do-sul-do-brasil/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SLOW FOOD. **Queijo Artesanal de Leite Cru**, 2014. Disponível em: <https://slowfoodbrasil.org/temas-campanhas/queijo-artesanal-de-leite-cru/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **Fems Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005. DOI: 10.1016/j.fmrre.2005.04.002.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 327-345, 2001. DOI: 10.1016 / s0958-6946 (01) 00062-0.

SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003. DOI: 10.1590/S1517-83822003000300016.

SPANO, G. *et al.* Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 3, p. S95-S100, 2010. DOI: 10.1038/ejcn.2010.218.

STELLA, T. R. *et al.* Características tecnológicas no processamento de queijo colonial. In: **27º Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2018, Maringá. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2018/anais/artigos/2739.pdf>.

STRAHINIC, I. *et al.* Technological and probiotic potential of BGRA43 a natural isolate of *Lactobacillus helveticus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-5, 2013. DOI:10.3389/fmicb.2013.00002.

TEMPEL, T. V. D.; JAKOBSEN, M. Yeasts associated with Danablu. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 1, p. 25-31, 1998. DOI: 10.1016/s0958-6946(98)00013-2.

TILOCCA, B. *et al.* Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, p. 103534. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103534.

TUCK, C. J. *et al.* Food Intolerances. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1684, 2019. DOI: 10.3390/nu11071684.

TURRONI, F. *et al.* Diversity of Bifidobacteria within the Infant Gut Microbiota. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e3695, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036957.

VALERIO, F. *et al.* Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 438-48. DOI: 10.1016/j.syapm.2009.01.004.

VAN BELKUN, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 13, ed. 3, p.1-46, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x.

VENTER, C. *et al.* Nutrition and the Immune System: a complicated tango. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 818, 2020. DOI: 10.3390/nu12030818.

WAHEED, S. *et al.* Antagonistic Potential of Dairy Origin *Enterococcus faecium* Against Multidrug-Resistant Foodborne Pathogens. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 26, n. 2, p. 2406-2415, 2021. DOI: 10.25083/rbl/26.2/2406.2415.

WATANABE, K. *et al.* Bifidobacterium mongoliense sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk products from Mongolia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 6, 2009. DOI: [10.1099/ijs.0.006247-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.006247-0).

WOLFE, B. E. *et al.* Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 422–433, 2014. DOI: [10.1016/j.cell.2014.05.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041).

WOLSKA, K.; SZWEDA, P. Genotyping Techniques for determining the diversity of microorganisms. **Genetic Diversity in Microorganisms**, p.53–94, 2012. DOI: [10.5772/35101](https://doi.org/10.5772/35101).

WONG, C. B.; ODAMAKI, T.; XIAO, J. Z. Insights into the reason of Human-Residential Bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 3, p. 369–385, 2020. DOI: [10.1093/femsre/fuaa010](https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa010).

WOUTERS, J. T. M. *et al.* Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 91-109, 2002. DOI: [10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0).

WU, Q.; SHAH, N. P. High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: emphasis on lactobacillus brevis as a functional dairy starter. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3661-3672, 2017. DOI: [10.1080/10408398.2016.1147418](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147418).

YASMIN, I. *et al.* In Vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 354, 2020. DOI: [10.3390/microorganisms8030354](https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354)

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K.-H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201-215, 2016. DOI: [10.1016/j.foodcont.2015.11.013](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013).

YU, W. *et al.* Expression and purification of recombinant *Lactobacillus casei* bacteriocin and analysis of its antibacterial activity. **Cyta - Journal of Food**, v. 18, n. 1, p. 301-308, 2020. DOI: [10.1080/19476337.2020.1749134](https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1749134).

YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 185-201, 2001. DOI: [10.1016/S0958-6946\(01\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00049-8).

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. **Apcbee procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012. DOI: [10.1016/j.apcbee.2012.06.010](https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010).

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862 - 867, 2007. DOI: [10.1590/S0103-84782007000300040](https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300040).

ZHANG, J. *et al.* Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. **Science of the Total Environment**, v.618, p. 1254-1267, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.228.

ZHONG, Z. *et al.* Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7832-7841, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10825.