

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE MINAS GERAIS - CAMPUS BAMBUÍ

Letícia Aparecida Cruvinel

CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES
PROCARIÓTICAS DO QUEIJO MINAS
ARTESANAL CANASTRA E SUA
IMPORTÂNCIA PARA SUSTENTABILIDADE

BambuÍ- MG

07/2017

Letícia Aparecida Cruvinel

CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES
PROCARIÓTICAS DO QUEIJO MINAS
ARTESANAL CANASTRA E SUA
IMPORTÂNCIA PARA SUSTENTABILIDADE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - IFMG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental.

Área de concentração: Ciências Ambientais
Linha de Pesquisa: Ecologia Aplicada
Orientador: Gustavo Augusto Lacorte



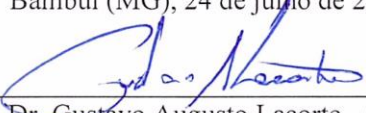
FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado, intitulada “**Caracterização das Comunidades Bacterianas do Queijo Minas Artesanal Canastra e sua Importância para a Sustentabilidade**”, de autoria da mestranda em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental Leticia Aparecida Cruvinel, aprovada pela Banca Examinadora de Defesa, em 24/07/2017, com a média de pontuação de 89.

Título do Trabalho – houve alteração () Sim () Não

Se sim, qual o título Caracterização das comunidades procarionóticas do Queijo Minas Artesanal Canastra e sua importância para a Sustentabilidade

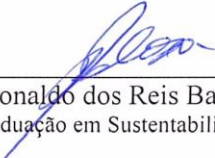
Bambuí (MG), 24 de julho de 2017.


Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte - Orientador


Prof. Dra. Patrícia Costa Lima da Silva (UNA-BH)


Prof. Dr. Ricardo Sousa Cavalcanti (IFMG/Bambuí)


Prof. Dra. Sônia de Oliveira Duque Paciulli (IFMG/Bambuí)


Ronaldo dos Reis Barbosa
Secretário do Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do IFMG

C957c Cruvinel, Letícia Aparecida.

Caracterização das comunidades procarióticas do Queijo Minas Artesanal Canastra e sua importância para sustentabilidade. / Letícia Aparecida Cruvinel. – 2017.

111 f.: il; color.

Orientador: Dr. Prof. Gustavo Augusto Lacorte.

Dissertação de mestrado (Pós-graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, MG, Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental, 2017.

1. Metagenômica. 2. Queijo Canastra. 3. Maturação. I. Lacorte, Gustavo Augusto.
II. Título.

CDD 637.3

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”. (Los Hermanos)

RESUMO

O Queijo Minas Artesanal Canastra é o produto típico mais importante da região da Serra da Canastra, sendo a principal fonte de renda da população regional. Seus aspectos físicos e sensoriais se devem às condições da região em que é produzido e ao modo de preparo, que promovem uma seleção de microrganismos capazes de conferir as características que agregam valor ao produto. Por isso, é essencial que se conheça a fundo a composição microbiana desse produto, bem como a sua dinâmica ao longo do processo de produção, a fim de avaliar quais grupos agem em qual fase do processo, onde surgem e quais são os benéficos e os prejudiciais para a composição do produto final. Sendo assim, este trabalho se propôs a caracterizar as comunidades bacterianas presentes ao longo do processo de produção do Queijo Minas Artesanal tipo Canastra, entre diferentes produtores. Para isso, foi usada a técnica de metagenômica - técnica de identificação independente de cultura - por meio da qual são possíveis a obtenção de milhares de sequências de DNA e a caracterização de qualquer comunidade bacteriana presente numa amostra. O estudo da dinâmica desses grupos ao longo do processo de produção revelou que a microbiota presente no produto final assemelha-se mais à microbiota do “pingo”, destacando a sua importância no processo de produção. A análise de composição das comunidades indicou que possivelmente, os microrganismos que geram as características que desagregam valor aos produtos estão nas fontes que constituem os utensílios e as instalações de trabalho dos produtores. O gênero *Staphylococcus*, que abriga espécies patogênicas, apresentou perda de frequência relativa durante o processo de maturação, nas fazendas de alto valor agregado, e aumento da frequência nas fazendas de baixo valor agregado, o que é um sinal de alerta, visto que bactérias desse gênero podem levar à intoxicação alimentar. O conhecimento da microbiota associada ao processo de produção desse tipo de queijo permite que possam ser identificadas as portas de entradas de microrganismos prejudiciais ao processo, permitindo um maior controle desses microrganismos e, conseqüentemente, um aumento do valor agregado do produto final - fator que pode garantir a sustentabilidade deste processo produtivo local, importante para região da Serra da Canastra.

PALAVRAS - CHAVE: Metagenômica; Queijo Canastra; “pingo”; Maturação; Sustentabilidade

ABSTRACT

Canastra Artesanal Minas Cheese is the most important typical product of Serra da Canastra region, being the main income source of the region's population. Its physical and sensorial aspects are due to the conditions of the region in which it is produced and the way of preparation, which promote a selection of microorganisms capable of conferring the characteristics that add value to the product. Thus, it is essential to have full knowledge of this product microbial composition, as well as its dynamics throughout the production process, in order to evaluate which group acts in which phase of the process, where they appear and which are beneficial and harmful to the composition of the final product. Therefore, the present work has proposed to characterize the bacterial communities present throughout the production process of the Canastra Artesanal Minas Cheese and between different producers. For such purpose the technique of metagenomics, a technique of culture independent identification through which it is possible to obtain thousands of DNA sequences and characterization of any bacterial community present in a sample, was used. The study of these groups dynamics throughout the production process allowed to identify that the microbiota present in the final product is more similar to “pingo” (meaning drop) microbiota, highlighting the importance of the same in the production process. The composition analysis of the communities indicated that possibly the microorganisms that generate the characteristics that disaggregate value to the products are in the sources that constitute the utensils and work facilities of the producers. The genus *Staphylococcus*, which harbors pathogenic species, showed a relative frequency loss during the maturation process on high value-added farms and an increase in the frequency of low value-added farms, which requires an alert since bacteria of this genus can lead to food poisoning. The knowledge of the microbiota associated to the production process of this type of cheese allows to identify the ports of entry of microorganisms harmful to the process, thus allowing a greater control of these microorganisms and consequently increase the added value of the final product, a factor that can guarantee the sustainability of this important local productive process for the Serra da Canastra region.

KEYWORDS: Metagenomics; Canastra cheese; “pingo” (drop); Maturation; Sustainability

Lista de ilustrações:

Figura 1. Mapa do Queijo Minas Artesanal (fonte: NETTO, Marcos Mergarejo, 2009).....	17
Figura 2. Medidas de α diversidade por produtor e amostra	51
Figura 3: α diversidade usando índices de riqueza, diversidade e regularidade avaliados por produtor	52
Figura 4. α diversidade usando índices de riqueza, diversidade e regularidade por amostra.....	52
Figura 5. α diversidade usando índices de riqueza, diversidade e regularidade por grupos estudados e amostras	54
Figura 6. α diversidade avaliando a influência dos diferentes materiais de bancada	55
Figura 7. α diversidade por material de bancada e amostra	56
Figura 8. Distcen por local de alimentação e amostras	56
Figura 9. α diversidade usando índices de riqueza regularidade e diversidade por amostras e local de alimentação	57
Figura 10. α diversidade usando índices de riqueza, regularidade, diversidade e distcen para local de alimentação.....	57
Figura 11. β diversidade - Unifrac ponderada por produtores e amostras pela análise de componentes principais estruturada por produtores	58
Figura 12. β diversidade - Unifrac ponderada por produtores e amostras pela análise de componentes principais estruturada por tipo de amostra	59
Figura 13. β diversidade- Unifrac não ponderada para amostras de “pingo” (bruto rarefeito) ...	59
Figura 14. β diversidade- Unifrac não ponderada para amostras de queijo maturado (bruto rarefeito).....	60
Figura 15. β diversidade- Unifrac não ponderada para amostras de “pingo” e queijo maturado (bruto rarefeito)	60
Figura 16: β diversidade- Unifrac não ponderada para amostras de “pingo” usando índice de Bray-Curtis.....	60
Figura 17: β -diversidade por Bray-Curtis (sumarizadas pela PCoA) por grupos estudados e amostras.....	61
Figura 18. Dinâmica de riqueza das comunidades bacterianas em cada etapa do processo de produção do Queijo Minas Artesanal Canastra (eixo X= riqueza média de gêneros, e eixo Y= etapas do processo (Leite, Massa Latão, Massa Pano, Queijo Frescal e Queijo Maturado)	62
Figura 19. Análise de heat-map sobre os cinquenta gêneros mais representativos e amostras... 63	63
Figura 20. Análise filogenética para as cinquenta OTUs mais abundantes, destacando grupos taxonômicos (classes e gêneros) e presença em cada tipo de amostra.	65
Figura 21. Curva de rarefação por tipo de amostra- Bancada	96
Figura 22. Curva de rarefação por tipo de amostra- Leite.....	97
Figura 23. Curva de rarefação por tipo de amostra- Latão.....	98
Figura 24. Curva de rarefação por tipo de amostra- Mão	99
Figura 25. Curva de rarefação por tipo de amostra- Massa Latão.....	100
Figura 26. Curva de rarefação por tipo de amostra- Massa Pano.....	101
Figura 27. Curva de rarefação por tipo de amostra- “pingo”	102
Figura 28. Curva de rarefação por tipo de amostra- Pá.....	103
Figura 29. Curva de rarefação por tipo de amostra- Pano.....	104
Figura 30. Curva de rarefação por tipo de amostra- Prateleira	105
Figura 31. Curva de rarefação por tipo de amostra- Queijo Frescal	106

Figura 32. Curva de rarefação por tipo de amostra- Queijo Maturado	107
Figura 33. Curva de rarefação por produtor- Produtor 1.....	108
Figura 34. Curva de rarefação por produtor- Produtor 2.....	109
Figura 35. Curva de rarefação por produtor- Produtor 3.....	110
Figura 36. Curva de rarefação por produtor- Produtor 4.....	111
Figura 37. Curva de rarefação por produtor- Produtor 5.....	112
Figura 38: Porcentagem de OTUs identificadas por tipo de amostra.	113
Figura 39: Número de classes e ordens identificadas por tipo de amostra.....	113
Figura 40: Porcentagens de ordens, famílias e gêneros identificados por tipo de amostra.....	113
Figura 41: Distribuição de famílias por amostra sem limpeza e com limpeza de 5 reads	114
Figura 42: Distribuição de gêneros por amostra sem limpeza e com limpeza de 5 reads.....	114

Lista de tabelas:

Tabela 1. Produtores amostrados, datas de coleta e valor agregado que cada propriedade representa	38
Tabela 2. Amostras colhidas para cada produtor, identificação e quantidade colhida	39
Tabela 3. Amostras de SWAB coletadas, siglas escolhidas para identificação e material coletado.	40
Tabela 4. Filos encontrados e sua distribuição por tipos de amostras	45
Tabela 5. Distribuição dos filis identificados pelo número de reads	47
Tabela 6. Gêneros com distribuição de reads acima de 1% e a porcentagem que cada um representa por amostra	48
Tabela 7. Gêneros distribuídos entre os 10 com maior riqueza de reads por produtores e sua porcentagem por grupos estudados	49
Tabela 8. 50 gêneros com maior número de reads e sua distribuição por amostra (valores apresentados em porcentagem)	93

Lista de abreviaturas e siglas:

QMAC - Queijo Minas Artesanal Canastra

QC- Queijo Canastra

QMA- Queijo Minas Artesanal

SISBI-POA- Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal

EMATER- Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural

IMA- Instituto Mineiro de Agropecuária

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BAL- Bactérias do Ácido Lático

NaCl- cloreto de sódio

DNA- Ácido desoxirribonucléico

RNA- Ácido ribonucleico

rDNA- Ácido desoxirribonucleico ribossômico

rRNA- Ácido ribonucleico ribossômico

IPHAN- Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

PCR- Reação da Polimerase em Cadeia

OTUs- Unidades Taxonômicas Operacionais

PCoA- Análise de Componentes Principais

Lista de símbolos:

α - Alpha

β - Beta

1 SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1. Queijo Minas Artesanal e sua importância	16
3.2. Sustentabilidade e o Queijo Canastra	18
3.3. Processo de produção do Queijo Canastra	19
3.4. Comercialização	21
3.5. Fermento endógeno (“pingo”)	21
3.6. Microbiota e o Queijo Canastra	23
3.6.1. Microbiota indígena	23
3.6.2. Microbiota láctica	25
3.6.3. Culturas inicializadoras e secundárias	29
3.6.4. Microbiota não-láctica em queijos	30
3.6.5. Potenciais contaminantes	31
3.7. Estudo de comunidades microbianas e importância no processo de produção ...	32
3.8. Métodos de identificação de microrganismos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Área de estudo	38
4.2. Amostragem	39
4.3. Extração do DNA	40
4.4. Amplificação e sequenciamento do gene de rRNA 16S	41
4.5. Análises bioinformáticas	41
4.6. Estruturação e amplitude taxonômica dos grupos acessados	42
4.7. Análises de diversidade das comunidades	42
4.8. Análises de <i>heat-map</i>	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Estruturação e amplitude taxonômica dos grupos acessados	45
5.2. Análises de diversidade das comunidades	50
5.3. Análises de <i>heat-map</i>	62
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9. ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal Canastra é o produto típico mais importante da região, produzido há mais de 200 anos, é derivado do queijo da Serra da Estrela, de Portugal (BRASIL, 2017d). Hoje, essa atividade caracteriza a identidade sociocultural da região, onde a produção é quase que exclusivamente através de mão de obra familiar, além de ser a principal fonte de renda, sendo, portanto, essencial para a sustentabilidade da região.

As condições da região, como clima, águas, pastagens e altitude, provavelmente favorecem o desenvolvimento de bactérias típicas capazes de conferir a esse queijo um sabor único, muito apreciado pelos consumidores (EMATER, 2004). Porém, embora de forma geral as características se mantenham na região, podem ocorrer variações nas características entre produtores, as quais podem aumentar ou diminuir o valor agregado ao produto, o que reflete diretamente na economia local.

Certamente, essas variações nas características do produto entre os produtores se devem a variações na microbiota durante o processo de produção. Por isso, é essencial que se conheça a fundo a composição microbiana desse produto, bem como a sua dinâmica ao longo do processo de produção, a fim de avaliar quais grupos agem em qual fase do processo, onde surgem e quais são os benéficos e os prejudiciais para a composição do flavor do produto final. Assim, será possível dar suporte aos produtores para que possam agregar valor ao produto, melhorando suas condições de comércio. Para isso, técnicas de identificação independentes de cultivo tornam-se ideais para o estudo desses microrganismos, uma vez que elas permitem a identificação até mesmo de grupos de difícil cultivo, ou mesmo daqueles que não podem ser cultivados (QUIGLEY et al., 2013).

Neste estudo, utilizou-se a análise metagenômica, especificamente o sequenciamento de trechos do rDNA 16S bacteriano a partir do DNA total extraído de amostras do processo de produção do Queijo Canastra, a fim de caracterizar as comunidades bacterianas presentes no processo de produção e como elas variam ao longo do processo e entre diferentes produtores. Acredita-se que os resultados gerados neste estudo contribuirão para compreendermos um pouco mais sobre o papel dos microrganismos no processo de produção do Queijo Canastra.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é caracterizar as comunidades bacterianas presentes ao longo do processo de produção do Queijo Minas Artesanal tipo Canastra de diferentes produtores.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos e hipóteses associadas.

- a. Identificar os gêneros bacterianos (*Archaea* e *Bacteria*) presentes no queijo em processamento e nas principais fontes de contaminação para o processo;
Hipótese 1: existem gêneros bacterianos que são exclusivos em cada fonte de microrganismos do processo.
Hipótese 2: as fontes de contaminação acrescentam novos microrganismos às comunidades já presentes no queijo em processamento.
- b. Estimar a diversidade bacteriana presente em cada uma das etapas do processamento do queijo e das principais fontes de contaminação, bem como verificar a dinâmica da variação na diversidade ao longo do processo.
Hipótese: existe variação na diversidade das comunidades bacterianas ao longo da produção.
- c. Comparar os índices de diversidade (α -diversidade) e também a composição das comunidades bacterianas (β -diversidade) do queijo canastra de diferentes produtores;
Hipótese: existe variação na diversidade das comunidades bacterianas entre os diferentes produtores amostrados.

- d. Buscar relações entre os índices de α e β diversidade encontrados nas comunidades bacterianas identificadas nos diversos produtores e o valor agregado de seus produtos finais;

Hipótese 1: produtores cujo queijo possui menor valor agregado têm maiores índices de α -diversidade em suas comunidades amostradas ao longo do processo.

Hipótese 2: nos produtores cujo queijo tem menor valor agregado, a composição das comunidades presentes no queijo em processamento tem maior influência das comunidades das fontes de contaminação.

- e. Buscar relações entre os índices de diversidade e características associadas ao processo de produção;

Hipótese: a composição das comunidades presentes no queijo em processamento tem maior influência da bancada quando ela é de madeira.

- f. Buscar relações entre grupos filogenéticos encontrados e os locais de amostragem dos grupos encontrados.

Hipótese: existem clados filogenéticos presentes entre os gêneros amostrados associados a um tipo específico de fonte de microrganismos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Queijo Minas Artesanal e sua importância

Minas Gerais se destaca como o mais importante estado produtor de queijos artesanais do Brasil, sendo essa uma atividade tradicional de grande importância, pois é uma das principais atividades geradoras de renda na maior parte das regiões produtoras, estando, portanto, incorporada à identidade sociocultural da população mineira (FURTADO, 1980).

O artigo 1º da lei estadual número 14185, de 31 de janeiro de 2002, considera queijo minas artesanal aquele confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir de leite integral de vaca frescal e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas. Por ser característico de cada região produtora, pela sua evidência, importância histórica, cultural e econômica, em 2006 o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional - IPHAN - passou a considerar o “modo artesanal de fazer queijo de Minas” como sendo Patrimônio Imaterial do Brasil (BRASIL, 2017d), agregando valor a esse produto.

A produção de queijos artesanais em Minas Gerais é concentrada em sete grandes regiões: Serra da Canastra, Serro, Serra do Salitre, Araxá, Cerrado, Campos das Vertentes e Triângulo Mineiro, que, juntas, somam mais de 27 mil produtores, totalizando uma produção de 70 mil toneladas/ano (EMATER, 2004). Entretanto, somente 254 produtores desse total são cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária, e, desses, apenas 10 são relacionados a entrepostos com cadastro no SISBI-POA (Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal), sendo cinco queijarias (produtores) em cada entreposto e somente três possuem esse mesmo cadastro em nível individual (BRASIL, 2017f), que permite a venda do produto para fora do estado. Um entreposto e uma queijaria (produtor com cadastro individual) localizam-se na região de Araxá; uma queijaria, na região do Serro; e uma queijaria e um entreposto, na região da Canastra.

Uma das principais regiões produtoras do estado é a região da Canastra, localizada no sudeste do estado, composta por sete municípios: Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita (**Figura 1**), totalizando uma área

de 7.452 km², com uma população de 75.613 habitantes, sendo que 19,15% residem em áreas rurais (BRASIL, 2017b), de onde saem cerca de 5.787 toneladas/ano do Queijo Artesanal Canastra (BRASIL, 2017a), que abastecem os mercados de Belo Horizonte e São Paulo, principalmente.



Figura 1. Mapa do Queijo Minas Artesanal (fonte: NETTO, Marcos Mergarejo, 2009)

O queijo Minas artesanal da Serra de Canastra é produzido somente nessa microrregião, onde se combinam, de maneira única, solo, pastagem, clima, altitude e água (SILVA et al., 2013). Essas condições físico-ambientais favoráveis à produção do queijo resultam num ambiente propício ao desenvolvimento de bactérias típicas, que promovem o sabor característico do queijo tão apreciado pelos consumidores (EMATER 2004).

Para a grande maioria da população, o Queijo Minas Canastra, além de uma tradição cultural, é uma garantia de sustentabilidade familiar, sendo a principal fonte de renda e empregos para os agricultores da região (SILVA, 2007), demonstrando grande importância econômica e social.

A cidade de Medeiros- MG (região de estudo) possui 94.643,7 hectares de área, sendo que 16.800 (17,75%) são usados na agricultura, em culturas temporárias, permanentes e silvicultura (BRASIL, 2017c). Assim, mais de 80% de sua área, provavelmente, estão sendo utilizados para pecuária - dominante no município.

O Queijo Canastra, em Medeiros, não é importante somente para a população rural, pois influencia também a população urbana, direta ou indiretamente. A maior parte do produto é comercializada por atravessadores - os chamados queijeiros - que abastecem principalmente os mercados de Belo Horizonte e São Paulo principalmente (EMATER, 2004). Esses queijeiros possuem estruturas para lavagem e embalagem do produto na zona urbana, o que disponibiliza empregos.

Na cidade de Medeiros, pode ser encontrado também o centro de qualidade/maturação do Queijo Canastra, que consiste em um entreposto registrado no MAPA - um dos únicos em Minas Gerais que possui autorização para o comércio fora do estado (BRASIL, 2017e). Nesse ambiente, o queijo é maturado em condições adequadas pelos 22 dias exigidos na legislação (BRASIL, 2002). Após esse período, o produto é comercializado em diversos estados brasileiros, principalmente em São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Brasília e Mato Grosso do Sul, sobretudo nas capitais, em bairros de classe alta. Essa distribuição para estados em que o produto sem registro dificilmente chegaria traz reconhecimento para a região produtora, valorizando o produto e atraindo turistas para a região.

3.2.Sustentabilidade e o Queijo Canastra

A sustentabilidade pode ser entendida como um conjunto de ações que visam atender a necessidade humana sem prejudicar o meio ambiente. Contudo, ela não está pautada somente em questões ambientais, englobando também o social e o econômico, formando, assim, os três pilares da sustentabilidade (OLIVEIRA et al., 2012).

O pilar ambiental é a base da sustentabilidade, uma vez que todas as atividades devem ser feitas objetivando reduzir ou impedir impactos ambientais. Já o pilar econômico vai além das questões financeiras, abordando, também, causas e efeitos de decisões de negócios no âmbito social e ambiental. Além disso, visa movimentar a economia de maneira saudável, garantir o fluxo econômico e gerar empregos de forma a garantir a sustentabilidade. Já o pilar social refere-se ao capital humano, à comunidade, à sociedade como um todo, na importância de oferecer um ambiente de trabalho agradável, que preze a saúde e o bem-estar do trabalhador. Nesse item, estão contidos também problemas gerais da sociedade, como educação, violência e até o lazer (LASSU, 2017).

A região da Canastra é conhecida pela simplicidade de seu povo, por suas tradições e pela produção do tradicional Queijo Canastra, mantida quase que exclusivamente por meio de mão de obra familiar. A agroindústria familiar de pequeno porte produtora de queijos possui grande relevância na construção de um modelo de desenvolvimento regional mais equilibrado associado à sua importância social, econômica e ambiental (PREZOTTO et al., 2005). É capaz de impulsionar a geração direta e indireta de novos postos de trabalho e de renda, descentralizando o poder de grandes proprietários, proporcionando a inclusão social e econômica, de forma a contribuir para a melhoria da qualidade de vida das populações que vivem em comunidades rurais, reduzindo o êxodo rural.

Alem disso, a produção do Queijo Canastra incentiva os pequenos produtores a manterem suas propriedades, impedindo que as propriedades sejam arrendadas por grandes produtores que usariam a terra para cultivo de eucalipto e cana de açúcar, culturas de alto impacto e muito cultivadas na região (BRASIL, 2017c).

3.3. Processo de produção do Queijo Canastra

A fabricação artesanal do Queijo Canastra tem como principal característica a utilização do leite cru, no qual a microbiota presente torna-se parte fundamental no processo de produção, conferindo as características sensoriais típicas deste produto (NOBREGA, 2007). Além do leite cru, a utilização de parte do soro residual do processo de produção - conhecido como “pingo” - insere no processo uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o produto é fabricado, que direciona a fermentação e a maturação do queijo, atribuindo-lhe características sensoriais peculiares (MARINO, 2003).

Segundo a lei ordinária nº 14185, de 31 de janeiro de 2002 o processo de fabricação se desenvolverá com a observância das seguintes fases: filtração; adição de fermento natural e coalho; coagulação; corte da coalhada; mexedura; dessoragem; enformagem; prensagem manual; salga seca; maturação (BRASIL, 2002).

Nobrega, (2007) por sua vez inclui no processo de fabricação a ordenha e coleta do pingo e não considera a mexedura, muito provavelmente a autora considera o corte da coalhada e mexedura como fazendo parte de uma mesma etapa do processo.

A etapa da ordenha é composta por vários passos: primeiramente, deve-se conter o animal, seja usando cordas para pear as patas traseiras ou utilizando contenções (mais comuns em fazendas que utilizam ordenhadeira mecânica). Em seguida, deve ser feita a desinfecção do teto (*pré-dipping*), realizada normalmente com iodo e toalhas de papel descartáveis. Na sequência, é realizada a ordenha, podendo ser manual ou mecânica, e, depois, deve ser feita novamente a higienização da teta (*pós-dipping*), uma vez que, após a ordenha, o esfíncter do teto não se contrai de imediato, deixando a cisterna da teta suscetível a possíveis contaminantes (Silva et al., 2002).

Após a ordenha, o leite é coado e imediatamente encaminhado para a queijaria (também chamada popularmente de queijeira ou casinha), onde é acondicionado em tanques de aço inox ou plástico, para seu processamento. O ideal seria que todo o leite chegasse à queijaria em, no máximo, 90 minutos, para a manutenção da temperatura e a diminuição dos riscos de contaminação (BRASIL, 2002). Em sequência são adicionados o coalho e o fermento endógeno e, após coagulação, a massa é quebrada com o auxílio de uma pá (madeira e inox são as mais comumente usadas). A massa coagulada, coletada com o auxílio de peneira plástica, é colocada em fôrmas plásticas, onde a prensagem é realizada manualmente com a ajuda de um tecido. Após a prensagem, os queijos são recobertos com sal. Passadas 24 horas, o excesso de sal é retirado, sendo os queijos transferidos para prateleiras, permanecendo nas fôrmas por mais 24 horas. Os queijos são virados diariamente, até a sua comercialização (NOBREGA, 2007).

Por meio da portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013 na qual o Instituto Mineiro de Agropecuária estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal, ficou definido como tempo mínimo de maturação do queijo Minas artesanal da Canastra o período vinte e dois dias, sendo que a maturação deve ser realizada em temperatura ambiente (MINAS GERAIS, 2017). Durante a maturação, o queijo adquire parâmetros microbiológicos e físico-químicos exigidos pela legislação que garantem a qualidade do produto e a segurança do consumidor (BEMFEITO, 2016). As transformações físicas, químicas e biológicas que ocorrem durante a maturação são responsáveis pela textura, sabor, composição química e qualidade final do produto (BEHMER, 1985; CARIDI et al., 2003; ECK, 1987). A maturação pode contribuir diretamente e de forma significativa para a redução de microrganismos patogênicos presentes no produto (BRANT et al., 2007).

Embora sejam usados os mesmos ingredientes em toda a região, não existe uma padronização no processo de produção do Queijo Canastra, sendo que a quantidade de coalhos, de fermento endógeno e o tempo de coagulação podem variar entre os produtores (ORNELAS, 2005; BORELLI, 2006) ou mesmo variar de um lote para outro de um mesmo produtor, uma vez que eles já estão tão acostumados com a produção e dificilmente usam um medidor exato no processo.

3.4. Comercialização

Após finalizado, o Queijo Canastra geralmente é comercializado diretamente na fazenda poucos dias após a produção (um a cinco dias), em função de apresentar retorno rápido de investimento, processamento simples e apresentar bom rendimento na fabricação, já que não perde líquido, como o que ocorre no processo de maturação (em média, são gastos de 8 a 10 litros de leite para 1kg de queijo fresco, dependendo da fase de lactação, bem como sua alimentação). O Queijo Canastra fresco é comercializado por um valor que pode variar de R\$9,00/kg a R\$17,00/kg, dependendo da época do ano e da qualidade do produto. Entretanto, a comercialização do produto fresco é feita de forma ilegal, uma vez que somente é permitida a comercialização do Queijo Canastra após os vinte e dois dias de maturação (MINAS GERAIS, 2013).

Em alguns casos, os produtores conseguem agregar valor ao produto, aguardando o período de maturação para comercialização, confeccionando rótulos para o produto, registrando-se em órgãos competentes (IMA/MAPA), passando por análises periódicas de qualidade do produto e saúde do rebanho, chegando a comercializar o produto por até R\$65,00 /kg. Porém, é importante levar em consideração que, durante a fase de maturação, o produto perde grande quantidade de líquido, diminuindo consideravelmente seu peso.

3.5. Fermento endógeno (“pingo”)

Quando se finaliza a produção, os queijos já salgados permanecem na bancada de produção até o dia seguinte. Durante esse período, vai perdendo líquido (soro residual) que escorre pela bancada (uma mesa levemente curva e inclinada confeccionada

geralmente em madeira, aço inox ou ardósia) e é captado por um vasilhame (geralmente de plástico) previamente posicionado embaixo de um orifício situado na parte mais baixa da bancada. Entretanto, o “pingo” coletado nas horas próximas ao processo de produção tem uma quantidade elevada de soro, pois, ao fim da produção, o queijo ainda retém grande quantidade de líquido. O “pingo” ideal, que deve ser usado na próxima produção, é aquele recolhido durante a noite - momento em que a umidade do queijo já foi reduzida e grande parte do sal colocado já dissolveu, fazendo com que a concentração do “pingo” seja bem maior.

Não é possível definir com exatidão em quanto tempo deve ser recolhido o “pingo” após o processo de produção, tendo em vista que os produtores não marcam um tempo, eles recolhem o “pingo” que será usado no momento em que viram o queijo e colocam o sal do outro lado, o que ocorre geralmente pouco antes do anoitecer, cerca de seis horas após a produção.

Martins (2006) define o “pingo” como sendo o soro fermentado com sal, que age como inibidor de algumas fermentações indesejáveis. Ele é composto por uma complexa associação microbiana de comunidades de bactérias do ácido láctico (BAL) e comunidades de leveduras (PARENTE et al., 1997).

Embora as várias regiões produtoras utilizem o “pingo” no processo de produção, a composição das culturas lácteas presentes varia entre elas, considerando que essas culturas desempenham forte influência na glicólise, lipólise e proteólise do queijo, que, por sua vez, originam compostos responsáveis pelas características de sabor, aroma e textura (VILJOEN, 2001; CABEZA et al., 2007; LIMA et al., 2009). Sendo assim, pode-se dizer que a composição do “pingo”, bem como seu desempenho, pode variar; porém, ele possui propriedades de suma importância, como relativa insensibilidade ao ataque de bacteriófagos e uma rica e complexa associação microbiana, fonte de novas estirpes (REINHEIMER et al, 1996; COGAN et al, 1997; PARENTE et al, 1997; BERESFORD et al, 2001), características essenciais ao processo de produção.

Mesmo sem conhecimento sobre a composição do “pingo”, os produtores compreendem sua importância. Quando o queijo produzido no dia anterior não tem boa qualidade, eles descartam o “pingo” e usam raspas de um queijo maturado de boa qualidade ou procuram o ingrediente com algum vizinho. Caso o produto recolhido do

lote ruim seja usado, os produtores relatam que o produto também terá má qualidade, o que demonstra a importância da microbiota do produto no processo de produção.

A proporção de “pingo” adicionada varia entre produtores, podendo ser adicionados de 100ml a 1L de “pingo” para cada 100 litros de leite. O “pingo” pode ser acrescentado antes ou juntamente com o coagulante no processo. Quando a temperatura ambiente está baixa (estação fria), frequentemente o “pingo” é adicionado diretamente no recipiente de armazenamento do leite, pelo fato de que, nesse período, o leite entra no processo em temperaturas mais baixas, mudando a consistência da massa (fica mais mole), e o “pingo” ajuda a manter essa consistência mais próxima do adequado, auxiliando no processo.

3.6. Microbiota e o Queijo Canastra

3.6.1. Microbiota indígena

O leite produzido a partir das glândulas mamárias de uma vaca saudável é estéril. No entanto, os microorganismos são capazes de penetrar no úbere através da abertura do ducto da tetina, sendo cocos Gram-positivos, estreptococos, estafilococos e micrococos; bactérias lácticas (LAB), *Pseudomonas* spp e levedura os microorganismos mais frequentemente encontrados no leite retirado assepticamente do úbere; corinebactérias também são comuns (FERNANDES, 2009).

O tipo e a carga microbiana inicial, juntamente com a temperatura de armazenamento, são parâmetros que influenciam a proliferação das bactérias durante o armazenamento do leite em estado cru (MENEZES et al., 2014). Outros fatores diretamente ligados à microbiota do leite são o estado de saúde do rebanho, sua alimentação e manejo (PINTO, 2008). Sob boas condições de manuseio e conservação, a microbiota predominante no leite é Gram-positiva (MENEZES et al., 2014; JAY, 2005).

Durante e após a ordenha, a contaminação pode ocorrer através dos equipamentos de ordenha, pela forma de armazenamento e por várias fontes ambientais (BRITO et al., 2000). Tronco (2010) denomina a contaminação que ocorre ainda no interior do animal como contaminação endógena, e a contaminação após a ordenha, de contaminação exógena.

A superfície externa do úbere é uma fonte importante de contaminação microbiana no leite, tendo em vista que está susceptível a uma variedade de materiais, como solo, fezes e resíduos de silagem, entre outros. Diversos microrganismos podem ser introduzidos por este meio (FERNANDES, 2009).

A contaminação dos materiais de ordenha deve-se principalmente à exposição de equipamentos inadequadamente limpos ao ar contaminado, resíduos de leite em superfícies e em juntas e guarnições de borracha, que torna possível o crescimento de organismos Gram-negativos psicotróficos, tais como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*, e organismos Gram-positivos, tais como *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e os formadores de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (FERNANDES, 2009).

Outras fontes de contaminação incluem fontes de água da fazenda, trabalhadores agrícolas e microrganismos aerotransportados (FERNANDES, 2009).

A maioria dos queijos abriga uma microbiota complexa que é caracterizada por uma sucessão de grupos de microrganismos durante a fermentação de leite, maturação da coalhada e armazenamento (IRLINGER ; MOUNIER 2009). No início do processo, a microbiota é dominada por BAL inicializadoras (por exemplo: *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*) capazes de produzir ácido, reduzindo o pH do leite de forma significativa. Durante os primeiros dias de cura, leveduras e/ou outros fungos (como, por exemplo, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti*) colonizam a superfície dos queijos utilizando lactato (CALLON et al., 2006), o que leva à desacidificação da superfície, permitindo a colonização desse ambiente por bactérias menos ácido-tolerantes (*Arthobacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium linens* e *Corynebacterium casei*) (IRLINGER ; MOUNIER 2009).

Contaminação aleatória, os tratamentos seletivos (altas temperaturas), fatores intrínsecos (pH, concentração de ácido láctico) e os fatores implícitos (concorrência, amensalismo, bacteriófagos) moldam a estrutura da comunidade e da população e determinam o desempenho de culturas artesanais (PARENTE, 2006).

3.6.2. Microbiota láctica

Dentre as bactérias comumente encontradas tanto no leite e seus derivados quanto no “pingo”, pode-se dar destaque às bactérias lácticas fermentadoras da lactose ou bactérias ácido-lácticas. Este é um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, não esporuladas, sob forma de cocos, bacilos ou cocobacilos, com um metabolismo estritamente fermentativo, do qual o ácido láctico é o principal metabolito (TEMMERMAN et al., 2004). Podendo o ácido láctico ser produzido a partir do açúcar, utilização de citrato, degradação de proteínas, lipídios e esters.

As BAL podem ser agrupadas em homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com os produtos de fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico a partir da glucose, enquanto as heterofermentativas produzem dióxido de carbono, ácido acético, etanol etc., além de ácido láctico (CARR, et al., 2002). Outra divisão que pode ser feita no grupo é quanto à temperatura de crescimento, podendo ser classificados como mesofílicos ou termofílicos (FOX et al., 2000).

Os gêneros de BAL diretamente associados com produtos lácticos são: *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* (POT, 2008; WOUTERS, 2002), sendo *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactococcus* os principais gêneros que compõem os fermentos industriais utilizados na fabricação de queijos e outros derivados do leite (ARAUJO, 2008), e *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, os gêneros mais comumente encontrados em queijos (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000), assim como no leite de vaca (QUIGLEY et al., 2013). Nobrega (2012) aponta as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius subsp. infantarius*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc fallax* como sendo as principais espécies que compõem a microbiota do Queijo Canastra.

Enterococcus

Hoje composto por 40 espécies, o gênero *Enterococcus* foi proposto por Schleifer e Kilpper-Balz em 1984 (EUZEBY, 2010). Esse grupo de microrganismos está presente em alta riqueza tanto no “pingo” quanto no queijo maturado - o que sugere que esse grupo desempenha um papel importante na composição das características sensoriais dos

queijos artesanais. Foulquié Moreno et al., (2006) destacam o grupo como sendo considerado essencial para a formação do flavor em muitos queijos fabricados no sul europeu, uma vez que ocorre em uma grande variedade de queijos, especialmente os artesanais.

Sua importância para com os queijos artesanais pode ser destacada pelo fato de que microrganismos pertencentes a esse gênero são capazes de tolerar condições extremas de crescimento, como, por exemplo, altas concentrações de NaCl presente no “pingo” e também pela sua capacidade de produzir bacteriocinas (ARAUJO, 2008), importantes durante o processo de maturação dos queijos artesanais. Segundo Carvalho (2007), as cepas de *Enterococcus faecium* apresentaram a maior produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp., com potencial de emprego na produção de queijo de coalho, como cultura protetora.

Segundo Giraffa (2003), cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* são capazes de produzir bacteriocinas com atividade antilisteria quando crescem em leite e queijo. Sendo que as enterocinas são capazes de reduzir a contagem de *Listeria* de 2-9 ciclos logarítmicos, dependendo do produto e da enterocina testada (MORENO et al., 2003).

Apesar dessas características, *Enterococcus* não são encontrados em fermentos comerciais, devido ao fato de esses microrganismos estarem associados a contaminações de origem fecal e a diversos fatores de virulência (ARAUJO, 2008). Porém, sabe-se que *Enterococcus* podem ser isolados de diversos nichos, como plantas, águas e leite, além do trato intestinal de humanos. Com isso, a associação da presença de *Enterococcus* em alimentos não pode ser atribuída unicamente à contaminação fecal, mas também como contaminante ambiental, principalmente em queijos e derivados (GIRAFFA et al., 1997; 2002).

Leuconostoc

Descritos em 1912 por Beijerinck, atualmente há 22 espécies de *Leuconostoc*. Apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20°C a 30°C (CHOISY et al., 2008).

As principais espécies associadas com produtos lácteos são: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis* (OGIER et al., 2008).

Espécies desse grupo estão naturalmente presentes em uma grande variedade de queijos fabricados a partir de leite cru, ou são intencionalmente adicionadas na forma de culturas iniciadoras (OGIER et al., 2008).

Este gênero tem um importante papel na tecnologia de produtos lácticos graças ao metabolismo do citrato, conduzindo a formação de diacetil - um importante componente do aroma em produtos lácticos - e outros compostos, como acetato e acetoína (HEMME et al, 2004; BOUREL et al., 2001).

Streptococcus

Descrito pela primeira vez em 1884 por Rosenbach, foi subdividido em três gêneros na década de 1980, sendo eles: *Streptococcus stricto sensu*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (POT, 2008).

A espécie *S. thermophilus* é considerada a mais importante do gênero, sendo a segunda cultura inicializadora industrial mais utilizada (HOLS et al., 2005). Essa espécie, além da capacidade de diminuir rapidamente o pH do meio pelo processo de fermentação, é capaz também de produzir metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORNE, 2008; IVANOVA et al., 1998).

Já a espécie *S. macedonicus*, embora ainda não seja considerada uma cultura inicializadora, estudos vêm indicando-a como uma cultura potencial, devido a suas características fisiológicas e tecnológicas (VUYST; TSAKALIDOU 2008; TSAKALIDOU et al., 1998). Essa espécie é composta por microrganismos não patogênicos, termofílicos, moderadamente acidificantes, proteolíticos e lipolíticos, sendo que algumas stirpes produzem bacteriocinas (VUYST; TSAKALIDOU, 2008).

Lactobacillus

Descrito em 1901 por Beijerinck, os *Lactobacillus* são microrganismos aerotolerantes, mas crescem melhor em condições de anaerobiose. Constituem um grupo bastante diverso, com mais de 160 espécies descritas (EUZEBY, 2010). Sharpe (1962), dividiu o gênero em três grupos, de acordo com o produto final de sua fermentação - grupo I (obrigatoriamente homofermentativos), grupo II (heterofermentativos facultativos) e grupo III (obrigatoriamente heterofermentativos).

Segundo Borelli, (2006), a espécie *Lactobacillus plantarus* é a predominante ao longo da fabricação do Queijo Canastra, assinalando essa espécie juntamente com *Lactobacillus casei* como microrganismos que poderiam ser utilizados como componentes da cultura inicializadora na fabricação de queijos artesanais, sendo essas duas espécies pertencentes ao segundo grupo.

Segundo Fialho (2015), *Lactobacillus* spp. possui atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, e a autora destaca que a formação de peptídeos antimicrobianos naturalmente no queijo depende principalmente de um complexo equilíbrio entre a fabricação e o tempo de maturação.

Lactococcus

O gênero *Lactococcus* está amplamente distribuído no meio ambiente, sendo habitante inócuo de alimentos, principalmente laticínios. São microrganismos anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativo, não formam endósporos e possuem a temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C (HOLT et al., 1994).

Em laticínios, *Lactococcus lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*, em particular, são conhecidos principalmente por seu papel como culturas iniciadoras para a indústria de queijos. *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis biovar diacetylactis* também é reconhecida pela sua produção de compostos de desenvolvimento de sabor (HUGENHOLTZ; STARRENBURG, 1992).

Moreno et al., (1999) destacam que esses microrganismos são capazes de produzir determinados compostos antagônicos, como as bacteriocinas - que são proteínas - ou um complexo de proteínas com atividades antagônicas contra espécies homólogas, podendo também apresentar um amplo espectro de ação contra uma variedade de microrganismos Gram-positivos. Já Casalta e Montel, (2008) sugerem que a elevada capacidade de acidificação desses microrganismos pode evitar alterações no produto e o crescimento de bactérias patogênicas.

Segundo Nobrega (2012), *L. latis* foi detectado como uma das espécies dominantes em 20 dias de maturação do Queijo Canastra, destacando a importância do grupo nesse tipo de queijo.

3.6.3. Culturas inicializadoras e secundárias

Fox et al. (2000) descreveram três tipos de microbiota: inicializadora preliminar, culturas secundárias e bactérias não-inicializadoras. As culturas iniciadoras de queijo estão envolvidas na produção de ácido durante a fabricação de queijo e também no processo de maturação em várias extensões, em combinação com culturas de amadurecimento. Outras bactérias, leveduras e fungos filamentosos - provenientes do leite ou do ambiente de processamento - também desempenham um papel significativo durante a maturação (NDOYE et al., 2011).

Dois grupos de microrganismos são essenciais na produção de queijos, sendo eles artesanais ou não. O primeiro grupo é composto por culturas primárias ou inicializadoras, sendo essas as BAL, cuja principal função é a rápida produção de ácido durante o processo de fermentação, são capazes também de promover alterações bioquímicas durante o amadurecimento do Queijo Artesanal - o que ajuda a desenvolver o sabor característico do produto (PARENTE; COGAN, 2004). O outro grupo é composto por culturas secundárias que possuem o papel principal de produzir alterações organolépticas e bioquímicas no queijo, estando envolvido apenas na maturação do queijo (CHAMBA; IRLINGER, 2004), sendo formado por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Bactérias não inicializadoras não são capazes de produzir ácido, porém contribuem para a liberação de compostos aromáticos importantes na composição do flavor do produto final (BERESFORD; WILIAMS, 2004; ARAUJO, 2008).

As bactérias inicializadoras mais comuns são pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (FOX; WALLACE, 1997) - mesmo conjunto de gêneros mais comuns em queijos. Já a microbiota secundária pode ser dividida em grupos, sendo: 1) composto por bactérias ácido-láticas não *inicializadoras*, que consistem em representantes dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*; 2) bactérias propiônicas; 3) mofos e leveduras, que se desenvolvem na superfície de alguns queijos maturados (DINIZ 2013).

O grupo *inicializadora* pode produzir ácido suficiente para reduzir o pH do leite para valores inferiores a 5,3 em até seis horas, em uma temperatura de 30-37°C (NOBREGA, 2012). De acordo com Piard et al., (1999), a principal função das bactérias

láticas nos alimentos é a acidificação até um pH próximo de 4, por meio da produção de ácidos láticos, o que pode evitar alterações no produto e o crescimento de bactérias patogênicas.

Além disso, algumas bactérias láticas que compõem esse grupo são capazes de produzir determinados compostos que antagonizam patógenos, como bacteriocinas (CLEVELAND et al., 2001). E também ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil.

As culturas secundárias e auxiliares incluem leveduras, como, por exemplo: *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*; mofo: *Penicillium camemberti*, *E roqueforti*; e bactérias: *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* sp. e *Lactobacilos* heterofermentativos (CHAMBA; IRLINGER, 2004). Esses microrganismos habitam, na grande maioria das vezes, a superfície dos queijos.

3.6.4. Microbiota não-lática em queijos

Além das BAL, podem ser encontrados grupos de bactérias pertencentes à classe das *Actinobacterias* - grupo heterogêneo que pode ser constituído por espécies aeróbicas ou anaeróbicas - sendo os gêneros *Micrococcus*, *Brevibacterium* e *Corynebacterium* aeróbicos, e *Propionibacterium*, anaeróbico (MEILE et al., 2008).

Os gêneros aeróbicos citados acima são denominados genericamente de bactérias de superfície, representando uma parte importante da microbiota superficial de diversos queijos, contribuindo para a formação de textura, o aroma e a cor (HOPPE-SEYLER et al., 2007)

O gênero *Propionibacterium*, por sua vez, possui espécies de interesse para a indústria de laticínios, sendo elas *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* e *P. thoenii* (MEILE et al., 2008; BRITZ; RIEDEL 1994). Em presença de lactato, produzem grande quantidade de propionato, acompanhado de acetato e CO₂, sendo que a presença de bactérias propiônicas endógenas ou adicionadas na forma de fermento é indispensável para inferir as características essenciais de sabor e textura de vários queijos de massa cozida (CHOISY, 2008; FERREIRA, 2003).

3.6.5. Potenciais contaminantes

Os microrganismos relacionados à contaminação do leite e aos produtos lácteos são diversos, mas *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* são os mais comumente encontrados.

Staphylococcus aureus são bactérias Gram-positivas pertencentes à família Staphylococcaceae. Sua presença em alimento se dá por contaminação devido à manipulação indevida, uma vez que os manipuladores estão frequentemente contaminados por esses microrganismos (ACCO et al., 2003; HATAKKA et al., 2000). Sua presença em alimentos pode representar um risco potencial à saúde, por causa da produção de toxinas (BORELLI, 2006), embora a espécie seja conhecida por ser inibida pela presença de espécies concorrentes (FERNANDES, 2009).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa e um dos habitantes mais comuns do trato intestinal; sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal. Embora não sejam normalmente consideradas patogênicas, são produtoras de enterotoxinas, que podem causar graves doenças de origem alimentar (TORTORA et al., 2002).

Salmonella spp. são bactérias da família Enterobacteriaceae, Gram-negativas, em forma de bastonetes, aeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, catalase-positivas, oxidase-negativas e redutoras de nitratos a nitritos. Possuem capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de 5,3 a 45°C, pH entre 6,6 e 8,2 e atividade de água de 0,94 (JAY, 2005). O gênero *Salmonella* é vasto, compreendendo mais de 2.300 sorotipos. A grande diversidade do gênero decorre da capacidade de esse microrganismo sofrer variação antigênica, da habilidade de criar mosaicos de genes para seus antígenos por meio de recombinação, de alterações no comprimento, de duplicações de genes e de mutações pontuais (SCHAECHTER et al., 2002).

Esse grupo é um dos principais agentes patogênicos de origem alimentar, potencialmente capaz de provocar infecção alimentar no consumidor (FEITOSA et al., 2003), o que é agravado pela sua capacidade de sobreviver em alimentos por um longo período de tempo (SILVEIRA et al., 2012).

Já *Listeria monocytogenes* são bactérias anaeróbicas facultativas e Gram-positivas que se caracterizam por sua capacidade de aderir irreversivelmente à superfície de aço

inoxidável após 3 horas de contato, apresentando a mesma resistência a sanificantes que as células em biofilme maduro (240 h de cultivo) (OLIVEIRA et al., 2010). Podem crescer em concentrações salinas elevadas, em baixas temperaturas e em pH baixo, que tipicamente ocorrem no queijo (PARENTE; COGAN, 2004).

Apesar de ter uma baixa incidência, *Listeria monocytogenes* está associada a altas taxas de mortalidade (SCHUPPLER; LOESSNER, 2010) por causar infecções sérias, principalmente em imunodeprimidos, neonatos, gestantes e idosos. Pode causar gastroenterite e, em casos mais graves, ocasiona septicemia, meningite e meningoencefalite (CARVALHO, 2007).

Esses contaminantes tendem a diminuir durante o processo de maturação, devido à mudança no ambiente ocasionada por outros microrganismos e/ou pela perda de umidade durante o processo.

Vacas doentes podem lançar patógenos em seu leite, incluindo *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes* e salmonelas. Recentemente, as preocupações também têm sido levantadas sobre a presença de *Mycobacterium avium* var. *paratuberculosis* (o organismo causador da doença de Johne em bovinos) no leite de animais infectados (FERNANDES, 2009).

3.7. Estudo de comunidades microbianas e importância no processo de produção

Leite e produtos lácteos são ricas fontes de nutrientes, como proteínas, gorduras, vitaminas e minerais, o que os torna susceptíveis ao crescimento microbiano rápido. Em alguns casos, este crescimento pode ser benéfico, enquanto, em outros, é indesejável.

Os queijos artesanais possuem naturalmente uma flora bacteriana, e a interação desses microrganismos é de extrema importância na formação de produtos artesanais (KONGO, 2007; MARTÍN-PLATERO, 2009), sendo diretamente responsáveis pelo sabor e textura desse alimento (SILVA, 2012).

Existem vários aspectos da qualidade do queijo, sendo provavelmente os mais importantes: segurança, do ponto de vista da saúde pública; nutrição; sabor; textura; funcionalidade e aparência (FOX; COGAN, 2004). Dado um bom fornecimento de leite, o primeiro objetivo é produzir coalhada da composição química e microflora desejada. Se esses critérios não forem satisfeitos, a coalhada não evoluirá para o queijo com o sabor,

a textura e a funcionalidade característicos do processo de maturação (FOX; COGAN, 2004).

A microbiota de qualquer tipo de queijo é influenciada pela fonte e pelo tratamento do leite utilizado na produção do queijo, pelo processo de fabricação e pelas práticas higiênicas observadas durante a ordenha, a fabricação do queijo e o amadurecimento (ARTEAU et al., 2010; BERESFORD et al., 2001; MARTIN-PLATERO et al., 2008). Muitas vezes, os métodos de higiene de fabricação do Queijo Canastra seguem técnicas rudimentares e precárias condições de distribuição e manipulação (SEBRAE, 1997), o que pode modificar a microbiota natural do produto, ocasionando contaminações, causando riscos à saúde, alterando a aparência e o sabor do produto e, conseqüentemente, diminuindo o valor agregado.

Pelo conhecimento de produtores da região, as características que diminuem o valor estão diretamente ligadas às boas práticas de fabricação, que, quando não realizadas adequadamente, podem alterar a microbiota natural do produto, conferindo assim características indesejáveis, como, por exemplo, quando o produto fica com a massa tomada por olhaduras - o que eles chamam popularmente de “queijo inchado”. Entretanto, alguns autores levantam a hipótese de que normas de higiene rigorosas levam a uma redução da carga microbiana do leite, incluindo uma redução de populações de grande importância tecnológica, o que pode, por sua vez, impactar negativamente o queijo fabricado com abordagens tradicionais ou artesanais (MONSALLIER et al., 2012).

Embora seja importante garantir que a qualidade do leite seja mantida em níveis elevados, os produtores de queijo de leite cru de fabricação tradicional devem ter consciência de que certas práticas agrícolas podem ter um impacto negativo sobre os aromas, como consequência da limitação do número de microrganismos específicos (QUIGLEY et al., 2013). Defensores de queijos tradicionais recomendam manter alta diversidade taxonômica em comunidades indígenas microbianas e diversas práticas de fabricação de queijo, baseando-se no fato de que uma alta diversidade de atividades microbianas, combinada com métodos particulares de fabricação de queijo, é a chave para permitir que os queijos tradicionais desenvolvam suas características particulares, incluindo baixo risco de patógenos e diversificação de características gustativas (MONTEL et al., 2014).

As comunidades microbianas são de suma importância para conferir as características essenciais ao Queijo Canastra. Porém, alguns grupos de microrganismos podem ser altamente prejudiciais, conferindo características indesejáveis ou mesmo acarretando risco à saúde do consumidor. Sendo assim, estudos de comunidades microbianas são essenciais para que se possa conhecer melhor o processo de produção, identificando grupos essenciais e prejudiciais e onde surgem no processo de produção. Além disso, as comunidades microbianas são dinâmicas durante o processo de produção, com aumento e redução de grupos em cada fase. Identificar em que momento no processo de produção cada grupo de microrganismos surge e quais são dominantes facilitaria o seu controle, possibilitando uma seleção de microrganismos benéficos e a redução, ou até mesmo a exclusão, daqueles prejudiciais.

Entender a dinâmica e a estrutura de toda a comunidade microbiana do queijo é um passo na direção da promoção de uma melhor compreensão de como as características do queijo variam em relação ao crescimento microbiano e ao metabolismo (NDOYE et al., 2011). Como não são adicionadas culturas inicializadoras nesse produto, é necessário investigar a composição das comunidades microbianas durante o processo de produção, porque elas continuam difíceis de serem controladas (FUKA et al., 2010).

3.8. Métodos de identificação de microrganismos.

Até a década de 1980, a classificação e a identificação de microrganismos baseavam-se em comparações fenotípicas, incluindo características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e químicas das células. Porém, apesar de esses métodos poderem ser relativamente sensíveis, nem sempre são capazes de uma discriminação em nível de espécie ou estirpes, nem detectam relações filogenéticas entre certos grupos (RANDAZZO et al., 2009a).

As técnicas para identificação de microrganismos podem ser divididas em dois grupos: no primeiro, as técnicas cultivo-dependentes, que são baseadas no cultivo seguido por identificações ao nível fenotípico e/ou genotípico. Já no segundo grupo, as técnicas que não requerem o cultivo e o isolamento prévio da microbiota, ou cultivo-independentes, que são especialmente importantes para a identificação de microrganismos não cultiváveis (RANDAZZO et al., 2009a; JANY; BARBIER, 2008).

Os métodos convencionais de identificação de microrganismos necessitam de cultivo e, embora sejam métodos de baixo custo e requeiram baixa tecnologia, eles demandam mais tempo e podem sofrer com interferência de fatores ambientais e possíveis variações na expressão gênica dos microrganismos - o que pode afetar seu poder discriminatório. Muitas vezes, fenótipos semelhantes exibidos por estirpes nem sempre correspondem a genótipos semelhantes ou mesmo intimamente relacionados, o que também dificulta a identificação em níveis menores (TEMMERMAN et al., 2004). Outra dificuldade são as células viáveis não cultiváveis, que não são detectadas nessa metodologia (FARBER, 2001; MARIN, 2006), uma vez que, em meios de laboratório, espécies presentes em baixo número competem com espécies microbianas numericamente mais abundantes (HUGENHOLTZ et al., 1998). Assim, se as condições de cultura forem restritivas ou competitivas e o número de isolados muito baixo, a coleta de cultura não será representativa da microbiota, e a diversidade microbiana real será subestimada, além disso alguns grupos simplesmente não são passíveis de cultivo (HEAD et al., 1998).

As duas últimas décadas testemunharam o desenvolvimento de uma grande série de métodos de identificação e detecção baseados em DNA/RNA (biologia molecular), independentes de cultivo, que permitiram a identificação genotípica de microrganismos, permitindo um estudo mais aprofundado sobre as comunidades microbianas. Essas técnicas permitem a identificação de microrganismos em vários níveis, desde o nível de espécies até a diferenciação de estirpes individuais (tipagem) (TEMMERMAN et al., 2004). Uma das principais vantagens desses métodos é a sua independência de variações nas condições de crescimento dos microrganismos, podendo revelar microrganismos difíceis, ou impossíveis, de cultivo (QUIGLEY et al., 2011; 2013), evitando, assim, uma subestimação significativa das comunidades microbianas. Outro fator relevante se deve ao fato de que o tempo de análise deve ser reduzida ao mínimo, o que pode ser alcançado pelos métodos independente de cultivo.

Esse tipo de técnica vem ganhando destaque, uma vez que é amplamente aceito que até 99% dos microrganismos no ambiente não podem ser facilmente cultivados (KAMAGATA; TAMAKI 2005; SEKIGUCHI, 2006).

Abordagens independentes da cultura têm sido cada vez mais usadas para determinar a composição de comunidades microbianas complexas. Estes procedimentos

permitiram a caracterização simultânea de ecossistemas inteiros e a identificação de microrganismos específicos (QUIGLEY et al., 2011), dependendo do foco. Entretanto, uma série de fatores-chave deve ser considerada quando se emprega uma abordagem independente da cultura: diferenciação entre o DNA de microrganismos vivos e mortos; extração de ácido nucleico e região-alvo (QUIGLEY et al., 2011).

Os genes de rRNAs são sequências nucleotídicas que possuem regiões altamente conservadas que permitem o alinhamento de regiões variáveis e a comparação de nucleotídeos homólogos em análises filogenéticas (OLSEN et al., 1986).

Os alvos mais comumente utilizados para a identificação de espécies procarióticas são os segmentos referentes ao gene de RNAr 16S (RANDAZZO et al., 2009b; ALEGRÍA et al, 2012; DELGADO et al., 2013; NALBANTOGLU et al., 2014; RYSSEL et al., 2015; GUIDONE et al., 2016), uma vez que está presente em todas as formas de vida, possui baixa ocorrência de transferência lateral e recombinação, além de ser o gene com o maior número de sequências depositadas no GenBank (SCHLOSS; WESTCOTT, 2011).

A metagenômica é uma das técnicas baseadas em biologia molecular, cultivo-independentes, que vem sendo utilizada com eficiência nos últimos anos. Sua metodologia consiste no sequenciamento em larga escala do gene de RNA ribossômico 16S (rRNA) como marcador molecular de caracterização de grupos bacterianos. Com ela, tornou-se possível a obtenção de milhares de sequências de DNA e a caracterização de comunidades bacterianas presentes numa amostra de qualquer material - água, solo, alimentos, efluentes, etc. (por meio da comparação das sequências obtidas com bancos de dados disponíveis, sendo os mais populares o EMBL e Genbank) - fornecendo informações consideráveis sobre a composição e o papel desempenhado por estas comunidades que participam do processo de produção de alimentos e também daquelas que são consideradas contaminantes de alimentos e causam danos à saúde, sem a necessidade de isolamento e cultivo (RAPPÉ ; GIOVANNONI, 2003; TRINGE ; HUGENHOLTZ, 2008). Dessa forma, a caracterização de comunidades bacterianas na indústria de alimentos passou de uma tarefa extremamente árdua, na década de 1980, para uma tarefa relativamente simples na década atual (ERCOLINI, 2013).

Durante os passos mais importantes da produção de queijo, as abordagens moleculares oferecem a possibilidade de identificar e quantificar tanto as espécies

microbianas encontradas em cada fase quanto a sua atividade, assim como a diversidade de estirpes (NDOYE et al., 2011) e informações úteis para melhorar o sabor e a qualidade do queijo por meio da compreensão do comportamento metabólico e das alterações na comunidade microbiana durante o processo de produção.

A qualidade final do queijo depende da contribuição da microbiota primária, secundária e adventícia. Portanto, a aplicação de ferramentas moleculares independentes de cultura é importante para identificar diretamente os membros de uma comunidade e avaliar sua abundância; para confiar, com segurança, comunidades bacterianas complexas; para analisar a diversidade e a dinâmica da comunidade microbiana dominante; comparar as mudanças espaciais e temporais na estrutura da comunidade bacteriana; e para quantificar com precisão as espécies-alvo (JANY; BARBIER 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

Foram selecionadas para amostragem seis propriedades situadas no município de Medeiros- MG, uma das cidades pertencentes aos sete municípios produtores do Queijo Canastra. Como critério de seleção, foi usado o valor agregado dos produtos, sendo escolhidas três fazendas de alto valor agregado e três com baixo valor agregado (Tabela 1), com a finalidade de observar variações nas comunidades bacterianas desses dois grupos, identificando, assim, aqueles grupos capazes de conferir características que agregam ou diminuem valor ao produto. Para fins de estabelecimento do critério de seleção, neste trabalho foram considerados produtores de “maior valor agregado” aqueles cujas características permitem que o produto seja comercializado por um valor mais alto do que o preço médio do mercado local. Já os produtores de “menor valor agregado” são aqueles cujos produtos cujas características dificultam sua comercialização pelo preço médio de mercado, fazendo com que sejam comercializados por um valor abaixo do preço médio do mercado.

Tabela 1. Produtores amostrados, datas de coleta e valor agregado que cada propriedade representa

Produtor	Data	Valor agregado
1	27/10	Maior
2	27/10	Menor
3	28/10	Maior
4	28/10	Maior
5	29/10	Menor
6	30/10	Menor

Outras variáveis que potencialmente poderiam influenciar os microambientes e, por extensão, influenciar a composição das comunidades também foram analisadas, sendo elas: matéria prima das bancadas (ardósia e madeira) e local de alimentação do rebanho (céu aberto, local fechado).

4.2.Amostragem

As coletas foram realizadas no período de 27/10/2016 a 30/10/2016, exceto para o queijo maturado, coletado após 22 dias de maturação em cada uma das propriedades.

Foram coletadas amostras do produto em seis etapas do processo: (1) leite cru; (2) massa latão; (3) massa pano; (4) queijo frescal; (5) “pingo” adicionado e (6) queijo maturado e uma amostra do pano usado para a retirada do soro (7) (Tabela 2). Adicionalmente, coletaram-se amostras de *swab* do: (1) recipiente no qual o leite recebe o coalho e o “pingo” - chamado de “latão”; (2) pá utilizada para a mistura de leite coalho e “pingo”; (3) mão do produtor; (4) bancada de manipulação; e (5) prateleira de maturação (Tabela 3).

Tabela 2. Amostras colhidas para cada produtor, identificação e quantidade colhida

Amostra	Sigla	Material	Quantidade amostrada
1	L	Leite tanque	200ml
2	ML	Massa latão (com soro)	50ml
3	MP	Massa dessorada (pano)	50ml
4	QF	Queijo enformado (frescal)	50ml
5	P	“pingo”	50ml
6	QM	Queijo maturado	Peça inteira
7	Pan	Pano	3cm ³

As amostras demonstradas na Tabela 2 foram coletadas nos seguintes momentos: (1) amostra coletada após o final da ordenha, com amostras de todo o rebalho; (2) amostra coletada após a coagulação e antes da quebra; (3) massa coletada após a retirada do soro, com o auxílio de uma bacia, e colocada no pano usado para auxiliar o molde (nesse momento, tem-se também o contato com as mãos do manipulador); (4) amostra do queijo finalizado, antes da adição do sal, após o contato com a bancada, pano, mão do manipulador, forma e água usada para retirar resquícios de massa do processo de produção; (5) “pingo” recolhido da produção do dia anterior, usado nessa produção; (6) o mesmo queijo em que foi retirada a mostra do queijo frescal, sendo os contatos seguintes somente com a prateleira de maturação, ralo e/ou lixa e água usada na higienização; (7) pano usado para retirada do soro no processo de produção.

Tabela 3. Amostras de SWAB coletadas, siglas escolhidas para identificação e material coletado.

Amostra	Sigla	Material
1	Lat	SWAB latão
2	Pá	SWAB pá
3	Mão	SWAB mão do manipulador
4	Ban	SWAB bancada
5	Pra	SWAB prateleira

Para as amostras de Swab, foram usados swabs esterilizados numa área de 20 cm² (moldes de 4x5 cm).

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte/MG - em conjunto com o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Federal de Minas Gerais- Campus Bambuí. No total, foram sequenciadas 72 amostras de 12 etapas do processamento do queijo.

4.3. Extração do DNA

Para dar início às extrações nas amostras não líquidas, foi realizada a padronização do peso das amostras. Os swabs já estavam padronizados em uma solução-tampão de 1,5ml. No momento da extração, foram transferidas as amostras dos swabs para um tubo eppendorf de 2ml, onde foram centrifugados por 10 minutos a 13000rpm; o sobrenadante foi transferido de volta para o tubo original e armazenado para futuras necessidades.

Como podem ocorrer variações na microbiota da casca e no núcleo do queijo, teve-se o cuidado de recolher amostras abrangendo ambas as regiões. Após a pesagem, foi necessário ralar e macerar as amostras.

Para a preparação do leite para extração, foram colocados 1ml de leite em tubos de 2ml e adicionados 1 ml de Etanol a 20%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 5min, descartando-se o sobrenadante.

A extração do DNA de cada amostra da etapa do processo foi realizada utilizando o kit comercial de extração de DNA ambiental *E.Z.N.A.® Soil DNA Kit* (Omega) e seguindo as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi quantificado utilizando o

Qubit 2.0, que é capaz de quantificar DNA, RNA e proteínas usando a alta sensibilidade à fluorescência. A leitura é revelada em ng/μL.

4.4. Amplificação e sequenciamento do gene de rRNA 16S

O gene do rRNA 16S bacteriano de cada amostra de DNA foi amplificado utilizando os primers universais F515 e R806, cobrindo a região hiper-variável V4 do gene. A PCR ocorreu conforme os protocolos do kit KAPA Library Quantification for Illumina. Os amplicons foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (0,5μg/mL) e purificados. O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts, por 60 minutos, e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

Para a ligação dos adaptadores para sequenciamento, as sequências tiveram suas extremidades reparadas e ligadas a uma base de adenina. Em seguida, adaptadores foram ligados às extremidades das sequências e uma nova eletroforese foi realizada para selecionar as sequências com base no comprimento. As bibliotecas foram quantificadas por PCR em tempo real (ABI SteOnePlus) e eletroforese microfluídica (Agilent 2100 bioanalyzer). Logo após, foram enriquecidas e tiveram os índices (*barcodes*) ligados por PCR antes de serem normalizadas e sequenciadas usando a estratégia paired-end de 100pb na plataforma illumina HiSeq2000.

4.5. Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas de avaliação das sequências de DNA geradas foram realizadas utilizando o software PRINSEQ (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) para descarte de sequências de baixa qualidade (Q-score < 25); o software MOTHUR v.1.33.0 (SCHLOSS et al., 2009), para a busca de bases ambíguas e homopolímeros; e o software UCHIME (EDGAR et al., 2011) para detecção de quimeras artificiais. A classificação das sequências finais (*OTUs*) foi realizada por meio do software MOTHUR, utilizando a base de dados de sequências de DNA Greengenes, empregando o critério de similaridade de 97% proposto por DRANCOURT et al. (2000).

4.6. Estruturação e amplitude taxonômica dos grupos acessados

Para comparação e análise estatística das amostras, as matrizes de abundância de *OTUs* foram convertidas para o formato *biome*, exploradas com o pacote *Phyloseq* (MCMURDIE, et al., 2012) no programa estatístico R. Para normatização das amostras, utilizou-se o comando “*rarefy_even_depth*”, que permite identificar a amostra com menor número de sequências e “re-amostrar” todas as outras amostras para que possuam o mesmo número de sequências. A fim de verificar se o esforço amostral realizado foi suficiente para capturar as taxas mais abundantes e inferir o quanto são diversos cada uma das amostras e os grupos estudados, foram construídas curvas de rarefação (nº de sequências X nº de *OTUs*) das amostras e dos produtores analisados. A curva de rarefação consiste em uma análise que fraciona aleatoriamente e repetitivamente uma amostra para que a média do número de espécies encontradas em cada subamostra possa ser calculada (HUGHES et al., 2001)

Análises de amplitude taxonômica e distribuição de *reads*, gêneros e *OTUs* por amostras e grupos estudados (maior e menor valor agregado) foram feitas através de contagem total do produto da análise metagenômica, com o auxílio de tabelas e histogramas gerados no programa Microsoft Excel 2013.

4.7. Análises de diversidade das comunidades

Para as análises de riqueza, diversidade e regularidade, foram usadas medidas de α diversidade. O índice de diversidade de Shannon foi empregado por ser muito utilizado em ecologia microbiana, sendo capaz de refletir a riqueza e a homogeneidade do número de indivíduos de cada espécie (*OTU*) de cada amostra. O índice de Simpson (fórmula inversa $1/D$), por expressar a dominância dentro da comunidade, mostra a probabilidade de que dois indivíduos tomados aleatoriamente em uma comunidade pertençam a uma mesma espécie. Outro índice selecionado foi “Chao1”, que consiste em uma estimativa conservadora do número de *OTUs*, levando-se em conta o número de *OTUs* raras (baixa frequência) da comunidade para calcular o total de espécies da amostra. De acordo com esse estimador, uma comunidade só estaria perfeitamente amostrada se todas as espécies tivessem registro de, pelo menos, dois indivíduos.

No entanto, é importante destacar que os valores representados nos gráficos gerados por meio desses índices são relativos, pois, para se comparar as amostras, é necessário normalizar todas as comunidades com o mesmo número de sequências, e isso leva a uma drástica diminuição do número de sequências e *OTUs* em algumas amostras.

A presença de um número muito grande de *OTUs* com baixa representatividade na amostra (menos de 5 *reads*) pode ocasionar uma saturação dos dados, o que, muitas vezes, impede que sejam encontrados padrões na distribuição dos membros mais representativos das comunidades, impossibilitando evidenciar aspectos importantes sobre a estrutura e a dinâmica de comunidades de microrganismos.

Com o intuito de mostrar as diferenças genéticas entre *OTUs* e os grupos taxonômicos (gêneros e classes) encontrados para as 50 *OTUs* mais abundantes, foi construída uma árvore filogenética usando o software PyNAST (Versão 1.2) (CAPORASO et al., 2010).

A análise da dinâmica das comunidades bacterianas presentes em cada etapa do processo foi realizada através de uma análise de β -diversidade, conhecida como *Unifrac* ponderada, que considera tanto a presença/ausência e a frequência relativa das espécies (neste caso, as *OTUs* ou sequências de DNA das amostras encontradas), para calcular a similaridade entre as amostras, quanto a distância genética entre os indivíduos da comunidade, resultando numa descrição mais robusta das similaridades e diferenças das amostras. Para melhor visualização das diferenças na composição das comunidades em cada etapa do processo, os resultados da análise foram ordenados numa análise de coordenadas principais (*PCoA*) de forma que, quanto mais próximos dois pontos no gráfico, mais similares são as comunidades dessas amostras. As análises de *Unifrac* ponderada foram realizadas utilizando o software MOTHUR v.1.33.0 (Schloss et al., 2009).

Foram realizadas também análises de β -diversidade *Unifrac* não ponderada - uma análise qualitativa que considera a presença ou a ausência de microrganismos, a fim de comparar as comunidades microbianas de amostras entre grupos estudados. Outra análise de β -diversidade usada foi *Bray-Curtis* (sumarizada pela *PCoA*), uma análise de dissimilaridade.

4.8. Análises de *heat-map*

Realizou-se a análise *heat-map*, que produz um mapa de calor para obter uma visão interativa da composição e abundância de espécies entre diferentes amostras por exibição de web display. Por meio dessa análise, é possível observar quais *OTUs* são características de cada grupo.

5. RESULTADOS

5.1. Estruturação e amplitude taxonômica dos grupos acessados

O sequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S das 72 amostras coletadas (12 pontos de coleta x 6 produtores) gerou um total de 1.005.119 sequências com qualidade adequada para análises (aqui tratados como *reads*). A partir das sequências geradas, identificaram-se 4.110 diferentes sequências (tratadas aqui como *OTUs*). O número médio de *reads* por amostra foi de 13.768, com uma amplitude entre as amostras variando entre 3174 e 23117 de sequências obtidas. A análise das curvas de rarefação por amostra demonstrou uma tendência à estabilização na maioria dos casos, sugerindo que a comunidade bacteriana estava bem representada na maior parte das amostras. As curvas de rarefação geradas por produtores também apresentaram pequena variação entre um produtor e outro (Figuras 21 a 37- Anexos).

A análise de comparação das 4.110 *OTUs* identificadas neste trabalho com sequências da região V4 do gene rRNA 16S, depositadas nos bancos de dados de taxonomia molecular procariótica consultados nesta pesquisa, permitiu que 75% das *OTUs* (3.075 *OTUs*, correspondendo a 99,5% das *reads* totais) pudessem ser identificadas em nível família, e 65% (2.684 *OTUs*, correspondendo a 98,9% das *reads* totais) em nível de gêneros já descritos nos bancos de dados consultados. Considerando a representatividade das *OTUs* identificadas por amostra, houve pouca variação na porcentagem de *reads* atribuídas a algum gênero entre as 72 amostras, permitindo uma confiável análise comparativa entre as comunidades (Figura 38- anexos).

Em termos de amplitude taxonômica, as *OTUs* bacterianas identificadas foram agrupadas em 35 diferentes filos (Tabela 4), pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria, distribuídos em 59 diferentes classes. As classes mais presentes entre as amostras foram: Classe Bacilli (Filo Firmicutes), Aroteobacteria e Gammaproteobacteria (Filo Proteobacteria), representando 87% das *reads* identificadas.

Tabela 4. Filos encontrados e sua distribuição por tipos de amostras

FILOS	Ban	L	Lat	Mão	ML	MP	P	Pá	Pan	Pra	QF	QM
Proteobacteria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Firmicutes	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Actinobacteria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Bacteroidetes	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Deinococcus-Thermus	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Euryarchaeota	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cyanobacteria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Saccharibacteria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Chloroflexi	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Verrucomicrobia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tenericutes	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Fusobacteria	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Planctomycetes	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acidobacteria	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
Lentisphaerae	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
Spirochaetae	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	
Parcubacteria	X	X	X	X	X				X	X		
Gemmatimonadetes	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
Fibrobacteres		X	X		X	X					X	
Chlorobi	X	X	X			X		X	X	X	X	
Armatimonadetes		X	X	X	X	X		X	X	X	X	
Gracilibacteria		X	X	X				X	X	X	X	
Nitrospirae		X	X			X		X	X		X	
Elusimicrobia		X		X	X				X			
Nanohaloarchaeota					X	X	X				X	
Chlamydiae			X	X	X				X			
Cloacimonetes			X		X	X						
Aminicenantes		X	X	X	X	X		X	X	X	X	
Microgenomates			X									
Thaumarchaeota				X							X	
Hydrogenedentes		X			X							
Acetothermia	X		X									
Diapherotrites			X	X								
Aerophobetes			X									
Latescibacteria			X									

“X” representa presença, e espaços em branco, ausência.

A Figura 39 (anexos) demonstra o número de classes e ordens identificadas por amostra. Considerando os níveis hierárquicos inferiores, foram identificados, ao longo das 72 amostragens, 480 gêneros procarióticos diferentes agrupados em 220 famílias e 114 ordens, sendo que as amostras de swab das prateleiras de maturação apresentaram a maior riqueza (73% das ordens, 65% das famílias e 43% dos gêneros), enquanto as amostras de queijo maturado exibiram a menor riqueza (32% das ordens, 31% das famílias e 13% dos gêneros) (Figura 40- anexos).

O número de *reads* obtido por *OTU* variou significativamente, sendo que quase metade (49,47%) de todas as *reads* geradas pertenciam às cinco *OTUs* mais abundantes. Por outro lado, mais da metade das *OTUs* (53%) foi representada por apenas uma única *read* (*singletons*). Esta estruturação na distribuição das *reads* entre as *OTUs* refletiu-se nas categorias taxonômicas superiores, onde se verificou que 12 dos 35 filos foram representados por menos de 10 *reads* no total; 10 filos por 10 a 100 *reads*; seis entre 100 e 1000 *reads*; e apenas sete com uma representação acima de 1000 *reads* (Tabela 5). Todos os filos que foram representados por mais de 1000 *reads* estão presentes em todas as amostras analisadas.

Tabela 5. Distribuição dos filos identificados pelo número de *reads*

Menos de 10 <i>reads</i> no total	De 10 a 100 <i>reads</i> no total	De 100 a 1000 <i>reads</i>	Acima de 1000 <i>reads</i>
Elusimicrobia	Acidobacteria	Saccharibacteria	Proteobacteria
Nanohaloarchaeota	Lentisphaerae	Chloroflexi	Firmicutes
Chlamydiae	Spirochaetae	Verrucomicrobia	Actinobacteria
Cloacimonetes	Parcubacteria	Tenericutes	Bacteroidetes
Aminicenantes	Gemmatimonadetes	Fusobacteria	Deinococcus-Thermus
Microgenomates	Fibrobacteres	Planctomycetes	Euryarchaeota
Thaumarchaeota	Chlorobi		Cyanobacteria
Hydrogenedentes	Armatimonadetes		
Acetothermia	Gracilibacteria		
Diapherotrites	Nitrospirae		
Aerophobetes			
Latescibacteria			

Considerando a representatividade por tipo de amostra, a estruturação também se mantém: embora presentes em todas as amostras, alguns gêneros apresentam uma distribuição pouco uniforme entre elas (considerando-se os 50 gêneros com maior número de *reads*) (Tabela 8 em anexo).

Dos gêneros identificados, 19 apresentaram distribuição de *reads* acima de 1%. Avaliando os gêneros dominantes por amostras, tem-se: *Acinetobacter* dominante nas amostras de bancada (21,72% dos *reads* identificados), latão (21,60%), mão (58,55%), massa latão (52,75%), massa pano (47,06%), pá (42,56%), pano (18,89%), prateleira (19,09%) e queijo frescal (41,31%). Esse mesmo gênero está presente em 2,33% em queijo maturado e 0,22% para “pingo”, sendo que os grupos dominantes nessas duas

amostras são *Streptococcus* (34,90% para “pingo” e 32,98% para queijo maturado) e *Lactococcus* (33,75% para “pingo”; 25,80% para queijo maturado). *Streptococcus* manifesta-se acima de 2% nas amostras de massa latão (7,34%), massa pano (10,55%), prateleira (4,50%) e queijo frescal (9,27%). Já *Lactococcus* aparece acima de 2% nas amostras de bancada (7,28%), mão (3,30%), massa latão (14,65%), massa pano (14,77%), pá (5,09%), pano (5,41%), prateleira (3,91%) e queijo frescal (20,40%). Para o leite, o gênero dominante foi *Geobacillus* (43,75%), sendo que esse grupo está entre os 10 grupos mais ricos para mão (1,94%), massa latão (2,23%), massa pano (1,89%), “pingo” (2,43%) e queijo frescal (1,70%), embora em uma porcentagem muito menor (Tabela 6).

Tabela 6. Gêneros com distribuição de reads acima de 1% e a porcentagem que cada um representa por amostra

Gêneros	Amostras (%)											
	Ban	L	Lat	Mão	ML	MP	P	Pá	Pan	Pra	QF	QM
<i>Acinetobacter</i>	21,72	13,40	21,60	58,55	52,75	47,06	0,22	42,56	18,89	19,10	41,31	2,33
<i>Lactococcus</i>	7,28	1,95	0,12	3,30	14,65	14,77	33,75	5,09	5,41	3,91	20,40	25,80
<i>Streptococcus</i>	0,30	1,98	0,47	0,95	7,34	10,55	34,90	0,60	0,34	4,50	9,27	32,98
<i>Pseudomonas</i>	10,79	1,11	20,87	3,09	0,30	0,35	0,02	0,76	18,32	6,40	0,43	0,02
<i>Sphingomonas</i>	7,11	0,31	20,49	1,95	0,03	0,02	0,13	0,71	13,23	4,56	0,02	0,01
<i>Geobacillus</i>	0,48	43,75	0,08	1,94	2,23	1,89	2,43	1,19	0,18	0,26	1,70	0,04
<i>Moraxella</i>	10,93	1,41	3,95	2,78	0,83	0,96	2,49	9,64	5,97	0,57	1,28	0,01
<i>Bacillus</i>	2,22	1,07	0,32	6,63	7,72	6,18	0,02	5,20	0,37	1,29	6,11	0,25
<i>Brevundimonas</i>	5,50	0,30	12,11	1,76	0,05	0,02	0,02	0,31	11,64	3,95	0,01	0,01
<i>Lactobacillus</i>	1,47	0,35	0,09	0,64	1,26	1,32	4,05	2,60	0,14	4,24	0,97	15,45
<i>Staphylococcus</i>	1,42	0,96	0,68	0,49	0,54	1,06	0,40	1,64	0,42	17,82	0,82	4,56
<i>Corynebacterium</i>	0,67	0,52	0,80	0,75	0,73	0,49	0,23	0,54	0,58	12,66	0,28	9,94
<i>Kocuria</i>	11,02	0,26	0,41	0,93	0,25	0,33	2,95	9,36	2,74	1,09	0,80	0,32
<i>Klebsiella</i>	0,07	3,68	0,04	2,93	3,29	6,26	0,12	0,29	1,90	0,25	6,07	0,22
<i>Chryseobacterium</i>	0,46	0,70	0,57	4,85	0,50	0,44	1,29	0,81	5,45	0,32	1,86	0,01
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,17	0,52	0,00	0,07	1,51	3,41	4,17	0,05	0,01	0,16	3,01	2,45
<i>Pseudoxanthomonas</i>	2,26	0,05	5,19	0,70	0,01	0,00	0,00	0,08	4,59	1,53	0,01	0,00
<i>Leuconostoc</i>	2,55	0,08	0,02	0,19	0,27	0,27	3,21	0,96	0,65	2,76	0,28	0,68
<i>Anoxybacillus</i>	0,11	14,25	0,02	0,52	0,50	0,43	0,64	0,40	0,02	0,11	0,42	0,01

Analisando ainda a distribuição de *reads* por grupos de produtores estudados (maior e menor valor agregado), 17 gêneros estão distribuídos entre os dez com maior riqueza de *reads* por produtores, sendo que os gêneros *Klebsiella*, *Chryseobacterium* e *Escherichia-Shigella* não aparecem entre os dez gêneros com maior riqueza de *reads* nos

produtores de menor valor agregado, e *Dermatococcus* não se manifesta nos produtores de maior valor. É importante destacar ainda que a grande maioria dos *reads* encontrados para *Streptococcus* (91,09%) foi encontrada nos produtores de maior valor agregado (Tabela 7).

Tabela 7. Gêneros distribuídos entre os 10 com maior riqueza de *reads* por produtores e sua porcentagem por grupos estudados

Gêneros	Total <i>reads</i> produtores de maior valor	%	Total de <i>reads</i> produtores de menor valor	%
<i>Acinetobacter</i>	116997	37,65	193712	62,35
<i>Lactococcus</i>	69704	43,06	92173	56,94
<i>Streptococcus</i>	64388	91,09	6302	8,91
<i>Pseudomonas</i>	27073	19,36	112776	80,64
<i>Geobacillus</i>	20931	81,45	4768	18,55
<i>Sphingomonas</i>	19162	29,27	46295	70,73
<i>Klebsiella</i>	15524	100,00		0,00
<i>Moraxella</i>	15000	32,57	31048	67,43
<i>Corynebacterium</i>	14009	56,15	10942	43,85
<i>Lactobacillus</i>	12227	36,56	21220	63,44
<i>Chryseobacterium</i>	8501	100,00		0,00
<i>Brevundimonas</i>	5471	14,45	32388	85,55
<i>Kocuria</i>	4931	12,34	35044	87,66
<i>Staphylococcus</i>	4768	49,16	4931	50,84
<i>Bacillus</i>	4414	22,28	15395	77,72
<i>Escherichia-Shigella</i>	3151	100,00		0,00
<i>Dermatococcus</i>		0,00	8828	100,00

Foi observada uma redução significativa no número de *OTUs* após a remoção dos grupos de baixa representatividade de *reads* (grupos com menos de 5 *reads*). Na Figura 41 (anexos), percebe-se que a exclusão de grupos taxonômicos em nível de família foi grande em cada tipo de amostra, sendo que a menor exclusão foi de 71,43% - para amostras de queijo maturado, e a maior foi de 82,14% - para amostras de massa no pano.

Considerando o nível de gênero, as amostras de queijo maturado apresentaram a menor porcentagem de exclusão de grupos (70,95%), enquanto a amostra de massa pano apresentou maior porcentagem (80,75%) (Figura 42- anexos).

5.2. Análises de diversidade das comunidades

Neste trabalho, cada uma das amostras acessadas foi considerada como um microambiente cujos táxons (*OTUs*) bacterianos identificados formam associações e vivem em comunidade. Neste contexto, foram realizados dois tipos de abordagens comparativas em termos da diversidade encontrada em cada um desses microambientes: comparações por tipo de amostra, representando a dinâmica do processo de produção; e comparações por produtor, representando as variações nas comunidades devido às variações no processo de produção que existem entre os produtores (sobretudo entre os de maior e menor valor agregado).

A Figura 2 demonstra as medidas de α -diversidade por produtor e amostra que, de maneira geral, não apresentaram variação significativa entre os tipos de amostras dos produtores. Por meio da imagem, é possível perceber que as amostras de leite foram as que apresentaram o maior número de *OTUs*, sendo as amostras dos produtores 1 e 6 aquelas que apresentaram maior número de *OTUs*. As amostras obtidas da mão e queijo fresco do produtor 5 também se sobressaíram em relação às demais. É possível perceber também que as amostras de “pingo” e queijo maturado exibiram o menor número de *OTUs*, com exceção do queijo maturado, para o produtor 5, e “pingo”, para os produtores 3 e 5.

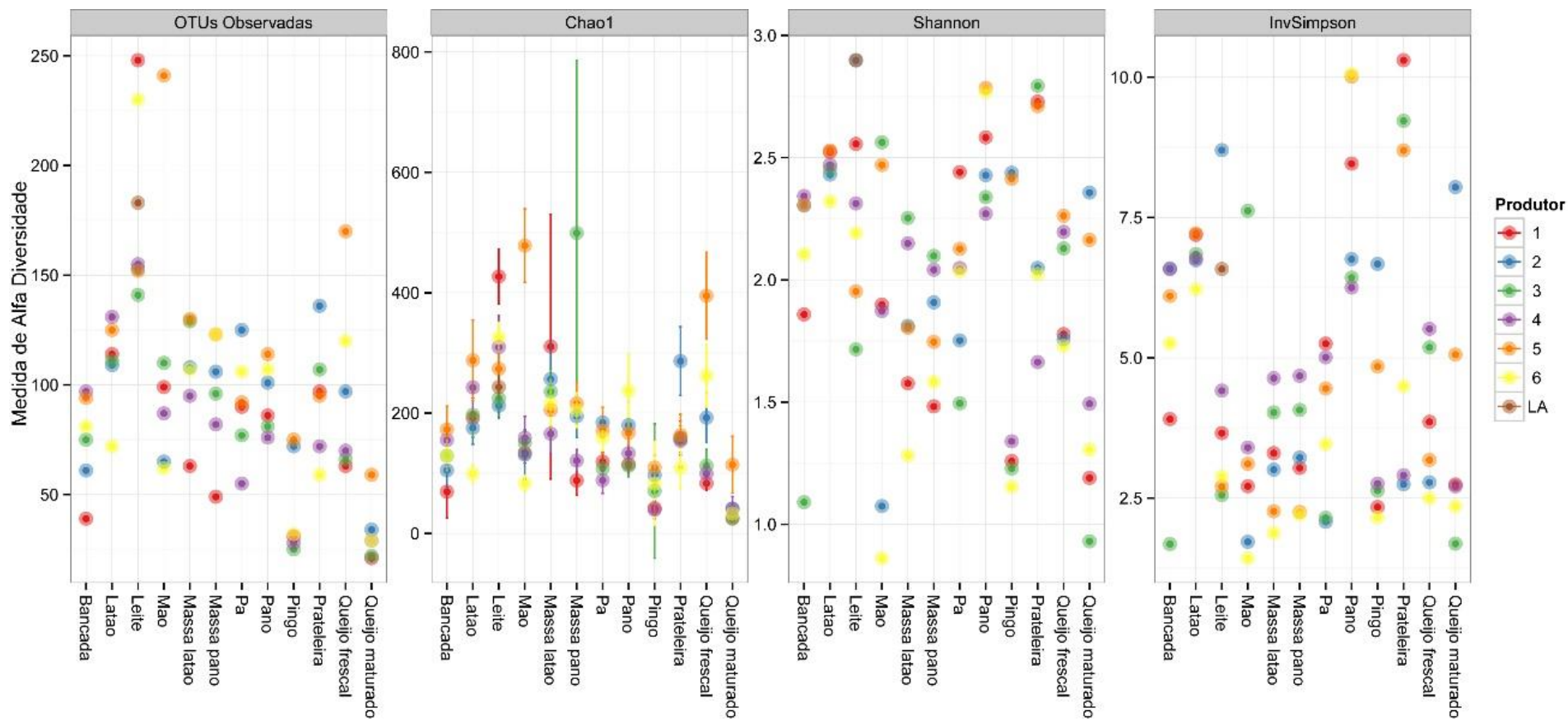


Figura 2. Medidas de α diversidade por produtor e amostra

A Figura 3 demonstra que, com exceção dos valores de riqueza para os produtores 4 e 5, não foi possível obter uma variação significativa de riqueza, regularidade e diversidade entre os produtores.

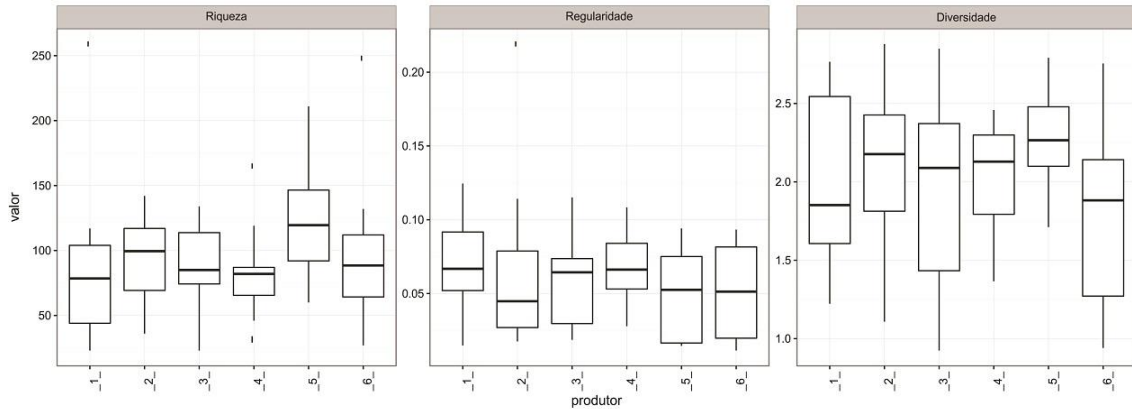


Figura 3: α diversidade usando índices de riqueza, diversidade e regularidade avaliados por produtor

A mesma análise realizada por amostra (Figura 4) evidencia que as amostras de leite apresentaram maior riqueza em comparação às outras. Enquanto o “pingo” e o queijo maturado demonstraram uma menor riqueza, as demais amostras não tiveram variação significativa nos valores de riqueza.

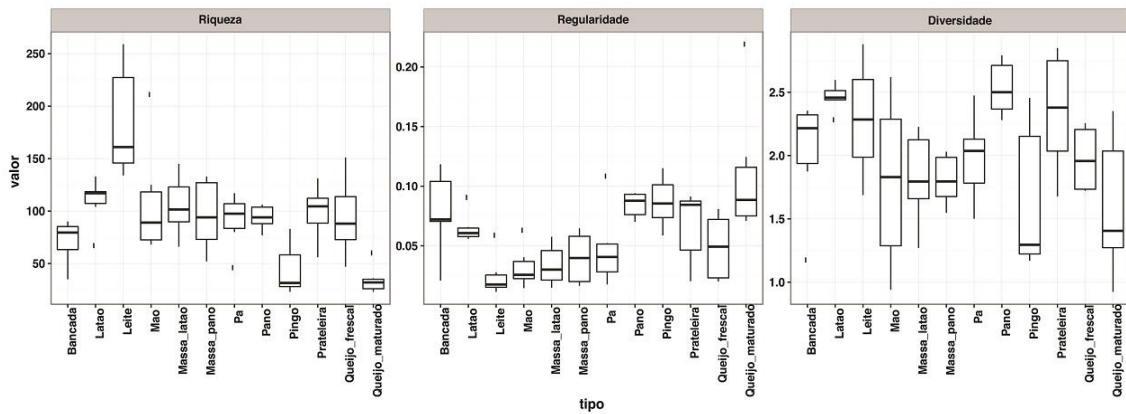


Figura 4. α diversidade usando índices de riqueza, diversidade e regularidade por amostra

Quanto à diversidade, a amostra de bancada apresentou menor valor quando comparada a latão e pano, porém não diferiu das demais. Latão não apresentou variação significativa quando comparada as amostras de leite, pano e prateleira, mas exibiu maior valor quando comparada às demais amostras. O leite não apresentou diferença

significativa com nenhuma amostra, embora tenha apresentado o maior valor de riqueza. A amostra obtida da mão exibiu menor valor que latão e pano e não diferiu das demais, e o mesmo resultado ocorreu para massa latão, pá, “pingo” e queijo frescal. A massa pano apresentou menor valor quando comparada a latão, leite, pano e prateleira e não diferiu significativamente das demais. O pano não diferiu de latão, leite e prateleira, mas demonstrou maior valor em comparação às demais amostras. Prateleira revelou maior valor que massa pano e queijo maturado e não diferiu das demais. O queijo maturado, por sua vez, demonstrou menor valor que latão, pano e queijo frescal, não diferindo das demais amostras.

Com relação à regularidade, a amostra de bancada mostrou maior valor quando comparada às amostras de latão, leite, mão, massa latão, massa pano e pá. O latão demonstrou menor valor em comparação à bancada, ao pano e ao “pingo”, e maior valor quando comparado a leite, mão, massa latão e pá. Pano, “pingo” e queijo maturado não diferiram significativamente entre si, porém mostraram maior valor em comparação a latão, leite, mão, massa latão, massa pano, pá e queijo frescal.

A análise de α diversidade foi realizada também por grupos estudados (maior e menor valor agregado) e amostras (figura 5). Para os valores de riqueza, as amostras que tiveram variação significativa foram massa pano, pá, pano, “pingo”, queijo frescal e queijo maturado, sendo que, em todos os casos, os produtores de menor valor agregado apresentaram maior riqueza. Para o índice de regularidade, houve diferença significativa nas amostras de mão, massa latão, massa pano e queijo frescal, onde, em todos os casos, o grupo de maior valor agregado apresentou maior valor. Quanto à diversidade, nas amostras de bancada, pano, “pingo” e queijo maturado, o grupo de maior valor agregado apresentou menor diversidade. Já nas amostras de mão, massa latão e massa pano, o grupo de maior valor agregado demonstrou maior diversidade. As demais amostras não diferiram significativamente.

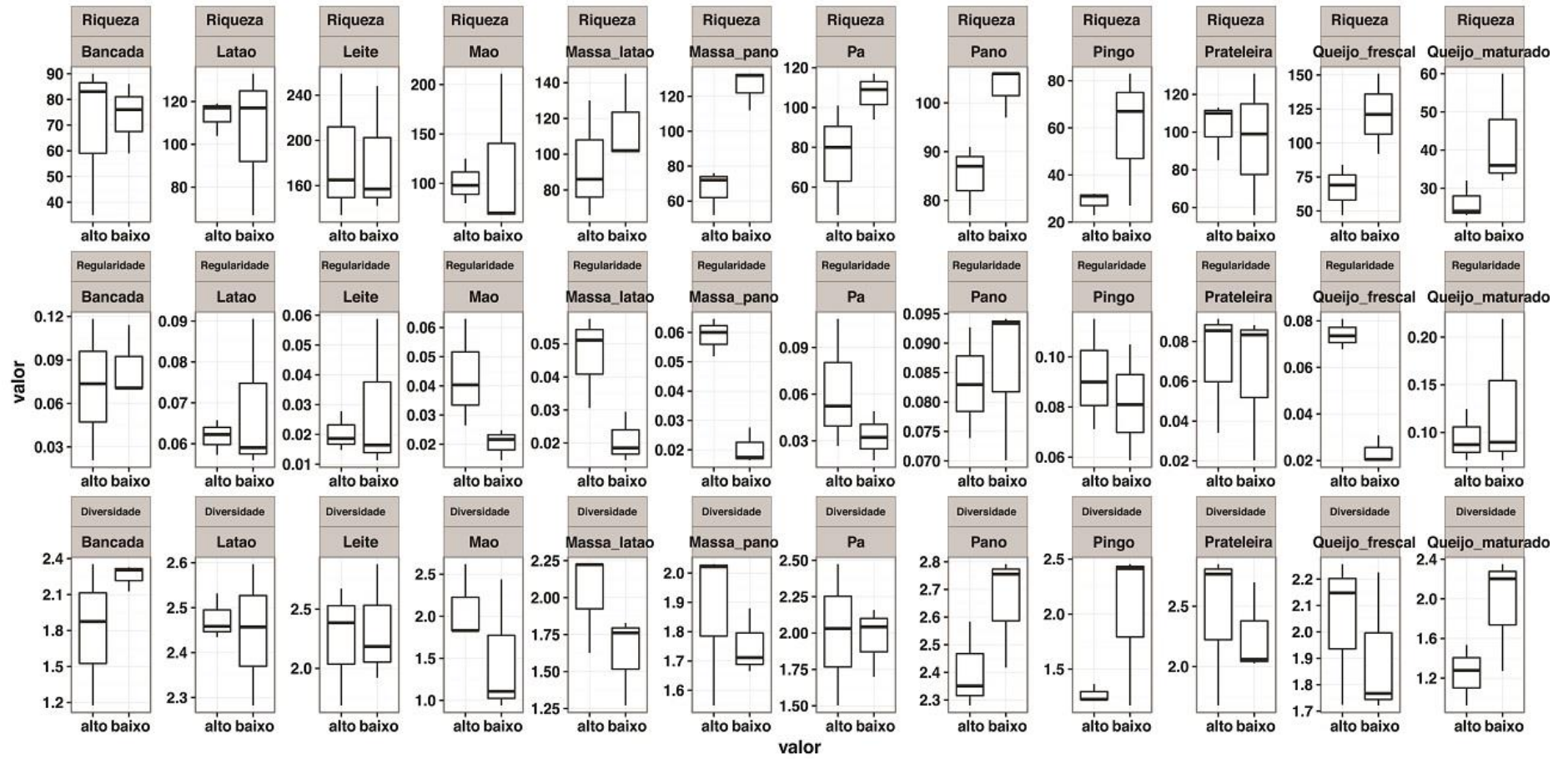


Figura 5. α diversidade usando índices de riqueza, diversidade e regularidade por grupos estudados e amostras

Essa mesma análise também foi realizada para outras variáveis que potencialmente poderiam influenciar os microambientes e, por extensão, influenciar a composição das comunidades: por bancada (ardósia e madeira); local de alimentação do rebanho (céu aberto, local fechado). A análise por tipo de bancada (Figura 6) não demonstrou nenhuma variação significativa nos parâmetros de riqueza e diversidade analisados entre os produtores que usavam bancada de madeira e aqueles que usavam ardósia.

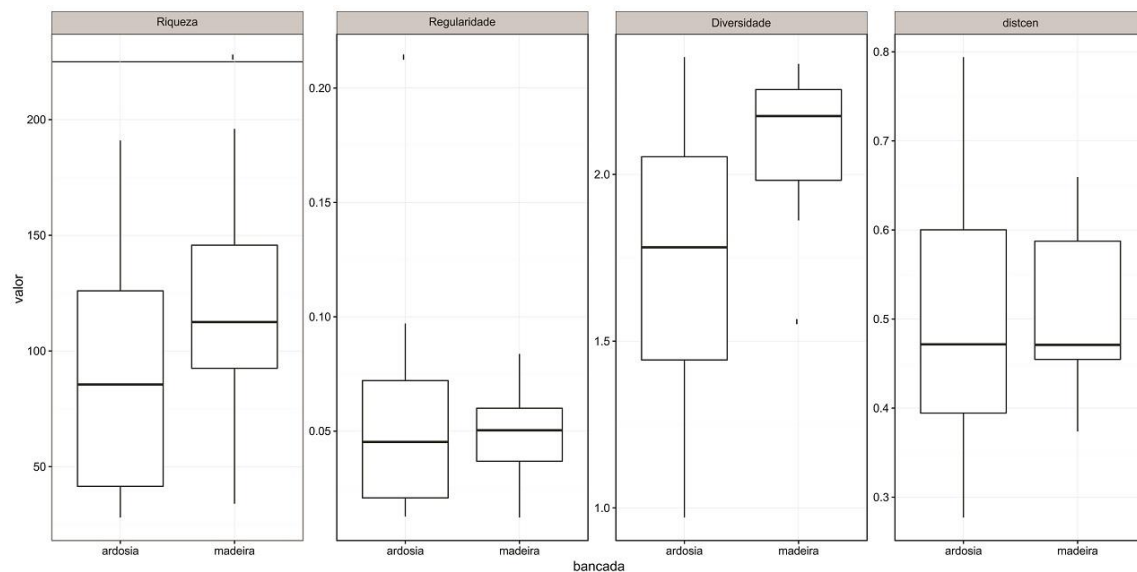


Figura 6. α diversidade avaliando a influência dos diferentes materiais de bancada

A mesma análise realizada com as amostras de bancada, massa pano, queijo fresco e queijo maturado (Figura 7), por sua vez, revelou variações em alguns pontos. Para o índice de riqueza, a bancada e o queijo maturado demonstraram que a bancada de madeira apresenta uma maior riqueza nessas amostras. Para os valores de regularidade, a amostra de madeira apresentou menor valor. Já para os valores de diversidade, a bancada de madeira apresentou maior valor para as amostras de bancada, queijo fresco e queijo maturado.

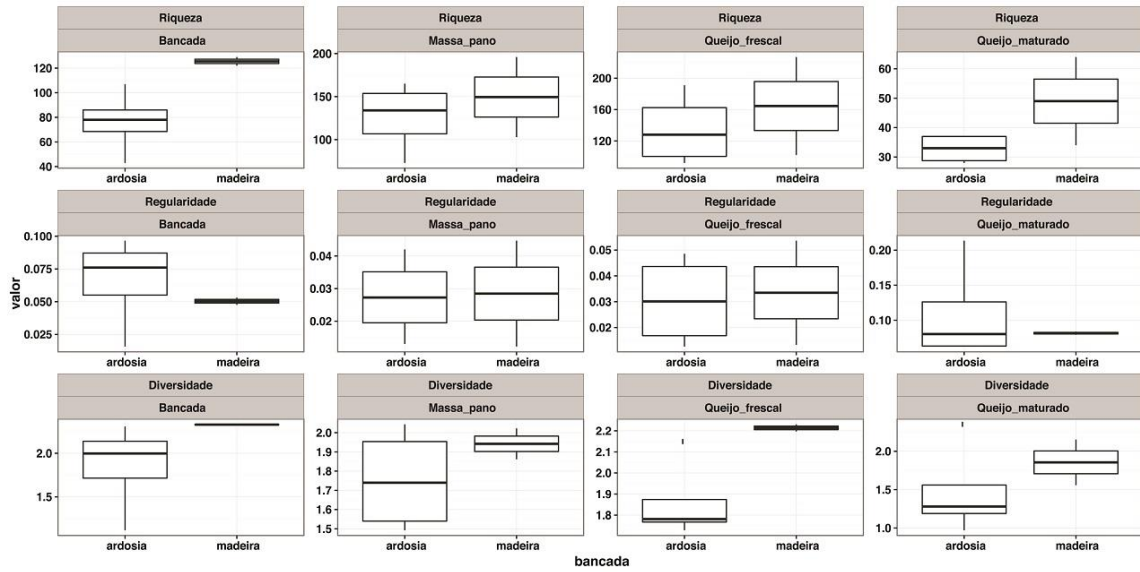


Figura 7. α diversidade por material de bancada e amostra

A avaliação de *distcen*, analisando o local de alimentação usando as amostras de leite, “pingo”, queijo fresco e queijo maturado, revelou que o “pingo” referente às propriedades em que o rebanho é alimentado em local aberto demonstrou um maior valor quando comparado ao “pingo” coletado em propriedades onde o rebanho é alimentado em local fechado (Figura 8). As demais amostras não exibiram variação significativa.

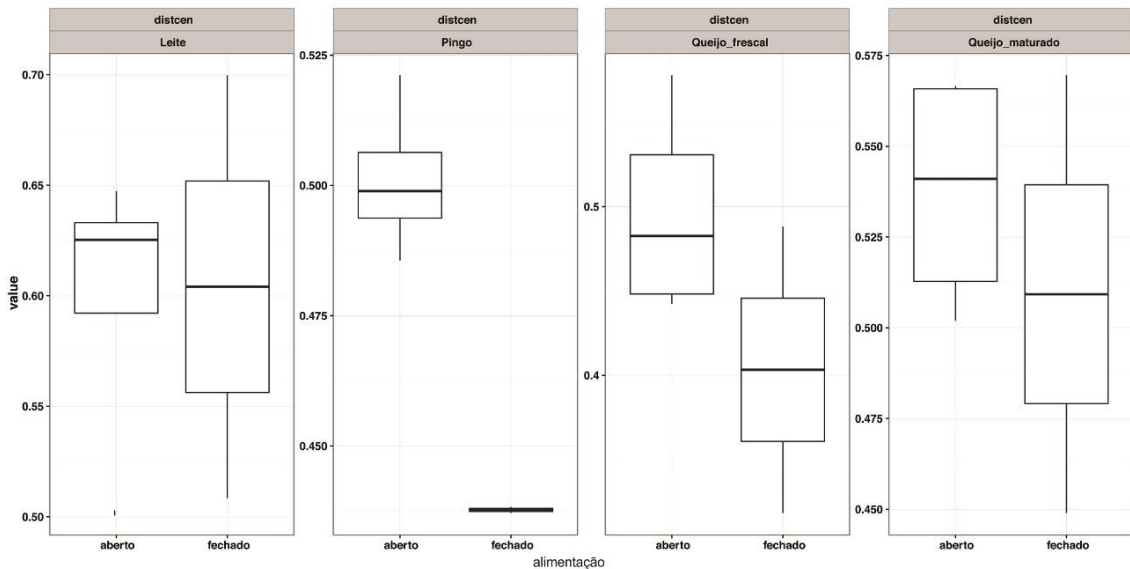
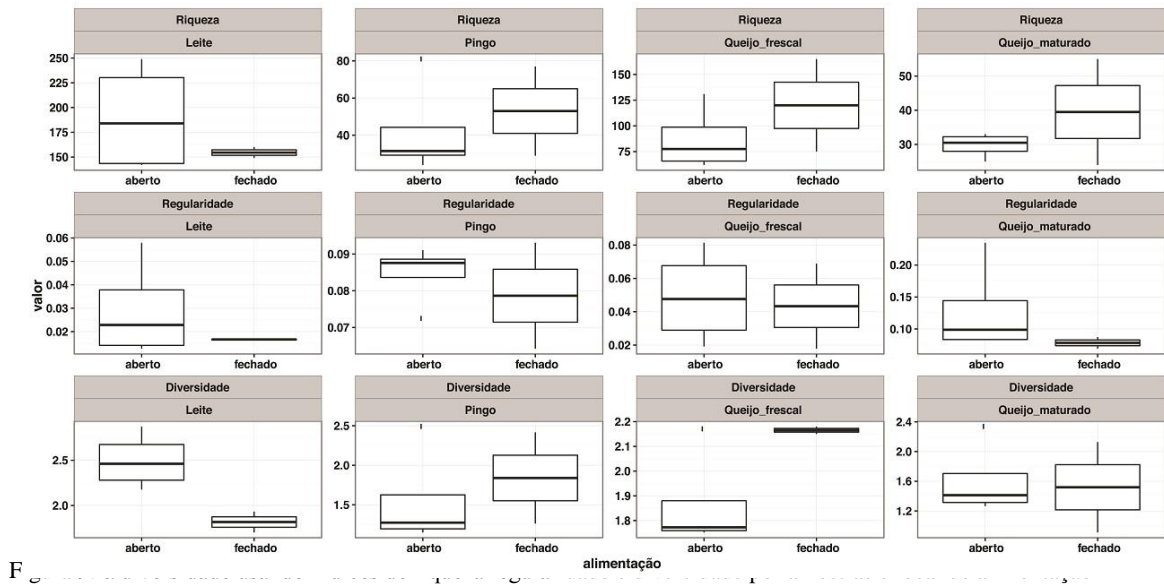


Figura 8. *Distcen* por local de alimentação e amostras

A Figura 9 refere-se aos valores de α -diversidade por amostras, sendo que as únicas análises que demonstraram diferença significativa foram: a análise de regularidade para queijo maturado, onde a alimentação em local aberto apresentou valores acima daqueles encontrados em local fechado; a análise de diversidade para leite, em que o leite apresentou maior valor em local aberto, e o queijo fresco, menor valor em local aberto.



A análise geral de α diversidade para alimentação não demonstrou diferença significativa para nenhum índice analisado (Figura 10).

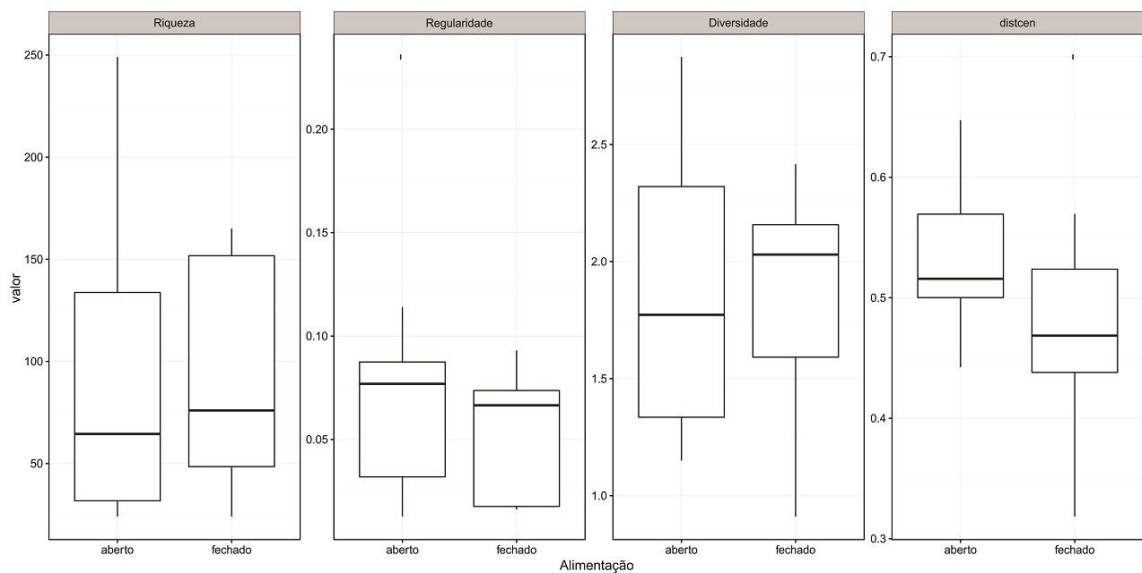


Figura 10. α diversidade usando índices de riqueza, regularidade, diversidade e distcen para local de alimentação

Considerando as análises de β -diversidade, a análise *Unifrac* ponderada estruturada por produtor pode ser visualizada pela análise de componentes principais (PCoA) representada na Figura 11. A partir dela, percebemos que as comunidades de bactérias presentes nas etapas do processo de produção são mais similares entre si do que entre as comunidades consideradas fontes de novos microrganismos, exceto pelo queijo maturado, cuja comunidade está mais relacionada com a comunidade presente no “pingo”. Outra observação é que, comparando os produtores de maior e menor valor agregado, nota-se uma maior proximidade das comunidades do produto final com as comunidades consideradas fontes nos produtos de menor valor agregado do que naqueles considerados de maior valor.

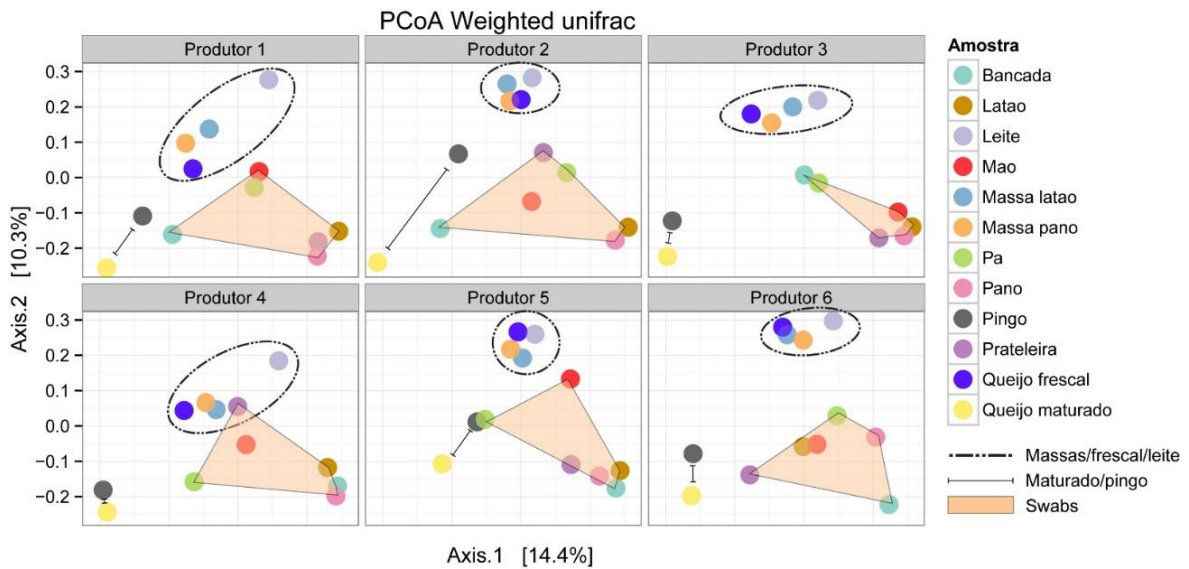


Figura 11. β diversidade - *Unifrac* ponderada por produtores e amostras pela análise de componentes principais estruturada por produtores

A mesma análise β -diversidade, estruturada agora por tipo de amostra (Figura 12), demonstrou que em alguns casos ocorre agrupamentos por grupos de estudo, como em queijo fresco, massa pano e “pingo”; embora, no “pingo”, o produtor 6 de menor valor agregado tenha se mostrado próximo aos produtores de maior valor agregado. Na massa latão, também é possível perceber uma proximidade entre grupos, embora, nesse caso, o produtor 3 tenha se aproximado dos produtores de menor valor agregado.

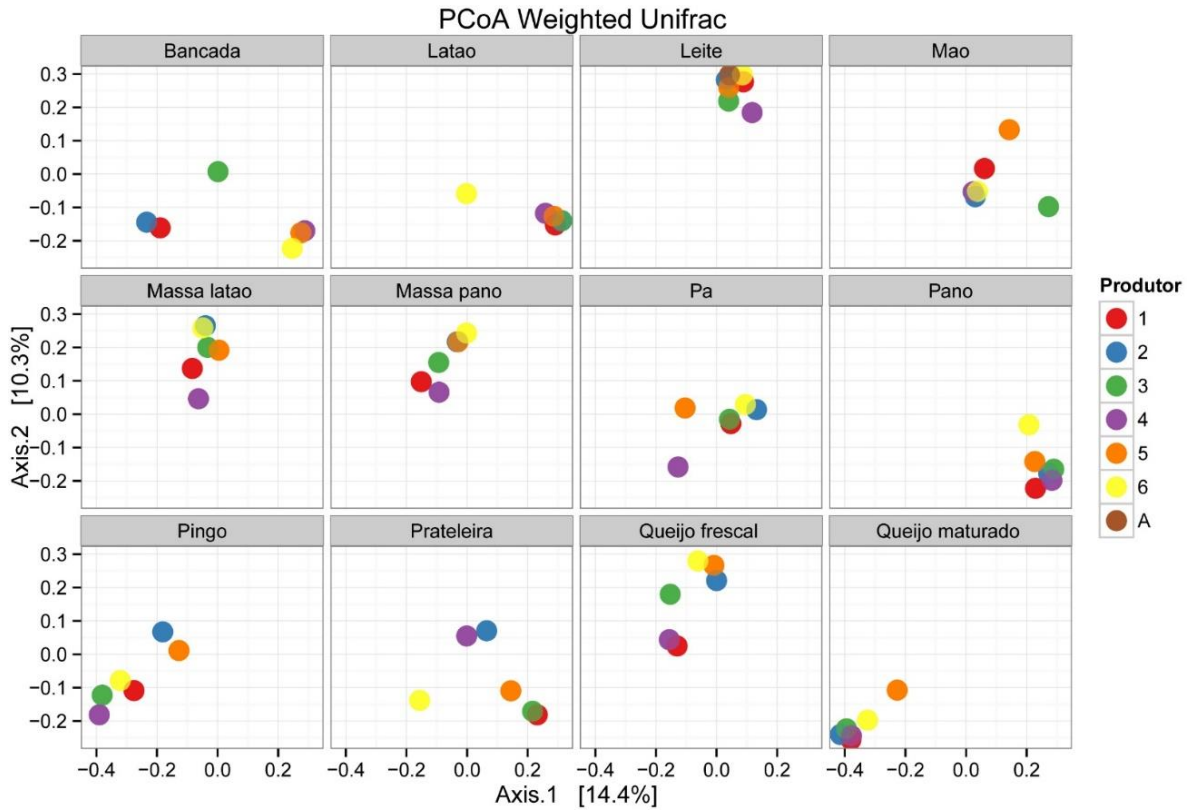


Figura 12. β diversidade - *Unifrac* ponderada por produtores e amostras pela análise de componentes principais estruturada por tipo de amostra

A realização das análises de β -diversidade por *Unifrac* não ponderada para cada tipo de amostra apresentou resultados significativos para comparações entre amostras de “pingos” (Figura 13) e queijos maturados (Figura 14), em que foi possível identificar um agrupamento entre os grupos de maior e menor valor agregado.

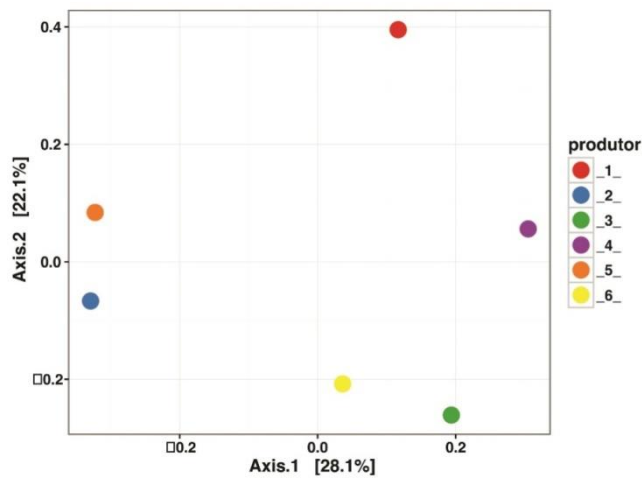


Figura 13. β diversidade- *Unifrac* não ponderada para amostras de “pingo” (bruto rarefeito)

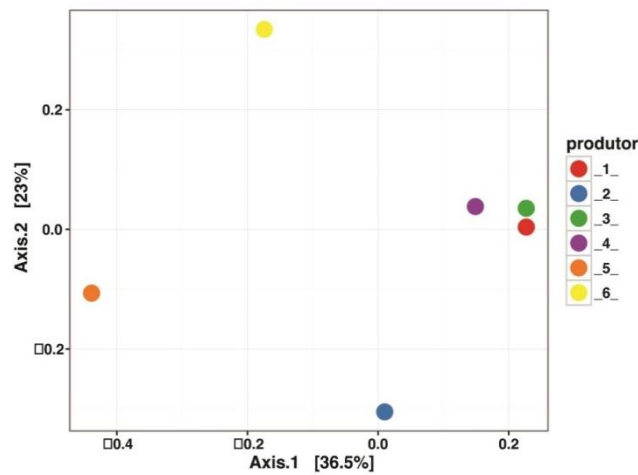


Figura 14.β diversidade- *Unifrac* não ponderada para amostras de queijo maturado (bruto rarefeito)

Ao serem comparadas essas duas amostras (queijo maturado e “pingo”), percebeu-se que ocorreu um agrupamento por amostras (Figura 15). A análise de Bray-Curtis para essas mesmas duas amostras revelou um agrupamento por produtor (Figura 16).

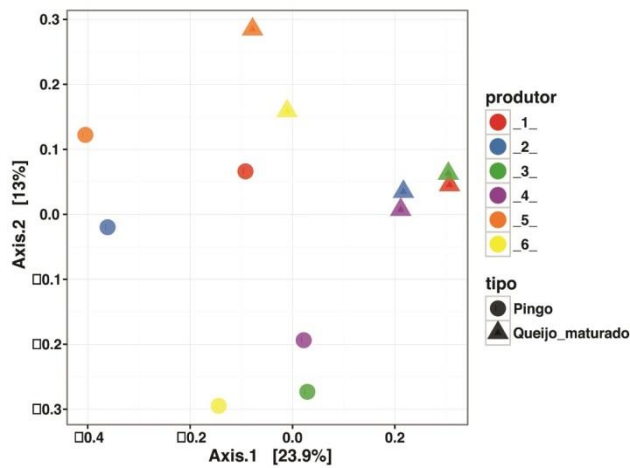


Figura 15.β diversidade- *Unifrac* não ponderada para amostras de “pingo” e queijo maturado (bruto rarefeito)

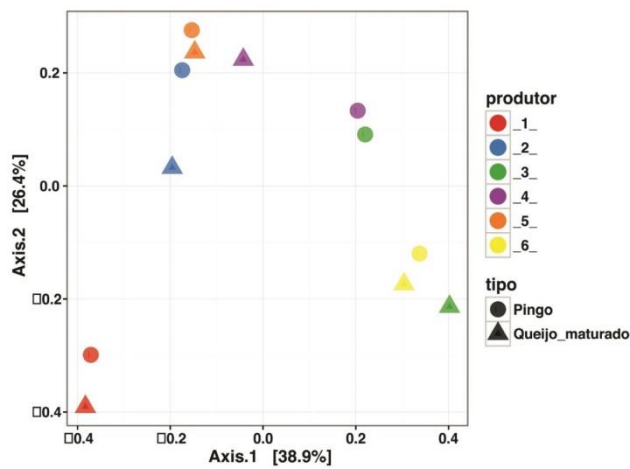


Figura 16.β diversidade- *Unifrac* não ponderada para amostras de “pingo” usando índice de Bray-Curtis

As análises de β -diversidade por *Bray-Curtis* (sumarizadas pela *PCoA*) revelaram alguns padrões importantes para a compreensão da estrutura das comunidades no processo de produção (Figura 17). Primeiramente, houve uma sobreposição das amostras de “pingo” e queijo maturado, bem como a sobreposição das amostras de queijo fresco, massa latão e massa pano - o que demonstra que essas amostras possuem o mesmo tipo de comunidade bacteriana. Em segundo lugar, as amostras de queijo fresco, massa latão e massa pano exibiram uma polarização entre amostras de diferente valor agregado, sugerindo que do momento da quebra da massa até o queijo fresco é importante para definir o valor do produto final. Outra observação é o fato de que, no geral, as fontes de microrganismos apresentam uma maior diversidade microbiana em comparação à

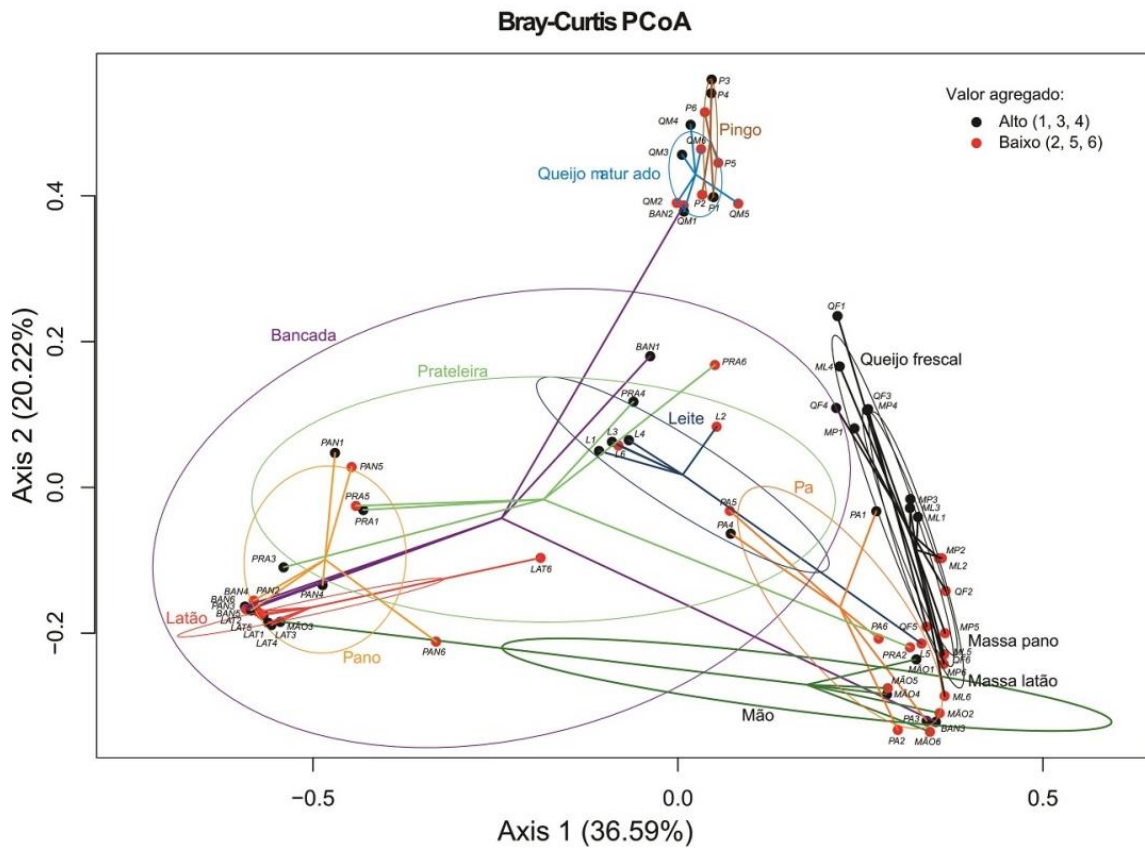


Figura 17: β -diversidade por *Bray-Curtis* (sumarizadas pela *PCoA*) por grupos estudados e amostras

Utilizando os valores médios de riqueza, foi possível caracterizar a dinâmica da riqueza das comunidades ao longo do processo de produção, no qual ambos os grupos analisados apresentaram o mesmo padrão: (1) o leite fornece a comunidade mais rica em bactérias para o processo; (2) ao longo da passagem para massa latão e massa pano, as

comunidades vão decrescendo em riqueza, mesmo que várias fontes de microrganismos estejam contribuindo para as comunidades (pá, latão e “pingo”); (3) na transição de massa dessorada para queijo fresco, as comunidades voltam a ganhar representantes, potencialmente por efeito das fontes de microrganismos adicionais nestas etapas (Mão do produtor, Bancada de manipulação e Pano para remoção dos líquidos totais da massa); (4) por fim, a riqueza das comunidades reduz drasticamente após o processo de maturação (Figura 18).

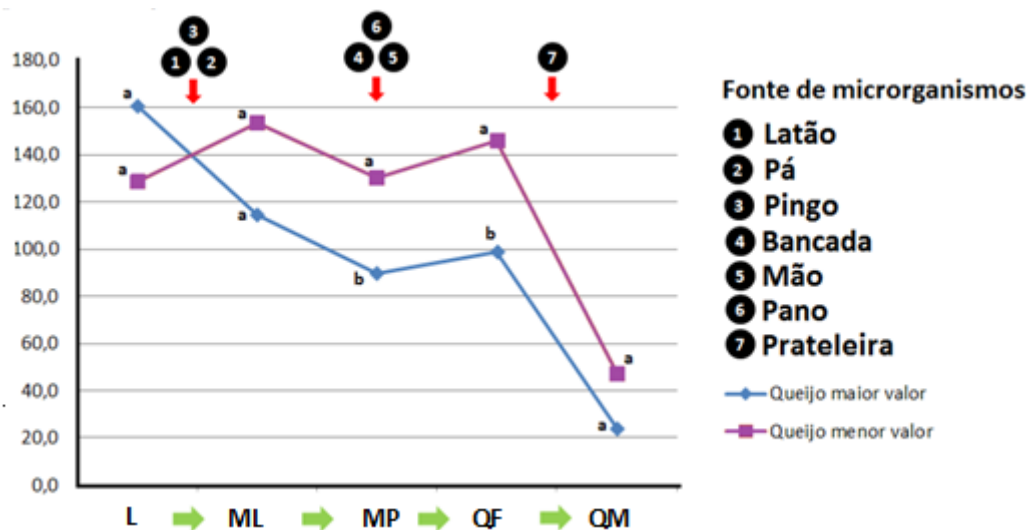


Figura 18. Dinâmica de riqueza das comunidades bacterianas em cada etapa do processo de produção do Queijo Minas Artesanal Canastra (eixo X= riqueza média de gêneros, e eixo Y= etapas do processo (Leite, Massa Latão, Massa Pano, Queijo Fresco e Queijo Maturado))

5.3. Análises de *heat-map*

A abordagem de *heat-map* é uma prática que leva em consideração a distribuição e as relações filogenéticas dos 50 grupos mais representativos numa análise metagenômica, baseando-se no princípio de que os grupos considerados nesta análise sejam os mais importantes para a manutenção da estrutura das comunidades bacterianas amostradas, dada a sua abundância no microambiente.

A distribuição das 50 Unidades Taxonômicas Operacionais (*OTUs*) entre as amostras pode ser inferida por meio da frequência relativa de amostragem desses grupos, resumida na Figura 19, onde é possível analisar os gêneros mais abundantes e onde eles são encontrados em cada etapa de produção.

No queijo frescal, os grupos bacterianos mostram-se mais abundantes quando comparados ao queijo maturado. As bactérias ácido-lácticas foram encontradas em grande abundância nos queijos maturados, sendo o gênero *Lactococcus* o mais relativo em todas as fazendas. Pôde-se perceber uma grande quantidade dessas bactérias presentes no “pingo” utilizado pelos produtores.

Gêneros que podem conter bactérias patogênicas também foram encontrados em diferentes etapas do processo de produção, como *Escherichia-Shingella*, *Klebsiella* e *Staphylococcus*. Encontraram-se alguns gêneros em abundância nas instalações, como *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudoxanthomonas*, *Staphylococcus* e *Sphingomonas*.

Nas fazendas de alto valor agregado (1,3, 4), o número de *Lactococcus* diminuiu consideravelmente durante o processo de maturação do queijo; ao contrário das fazendas de baixo valor agregado (2,5,6), onde o número de *Lactococcus* aumentou no queijo maturado. O gênero *Staphylococcus*, durante o processo de maturação, demonstrou perda de frequência relativa nos queijos maturados de fazendas de alto valor agregado. Já nas fazendas de baixo valor agregado, o número da frequência relativa encontrada no queijo maturado aumentou drasticamente.

Com o intuito de demonstrar diferenças genéticas entre as *OTUs* e os grupos taxonômicos (gênero e classe) encontrados para as 50 *OTUs* mais abundantes, foi feita uma análise filogenética, tendo como resultado uma árvore por meio da qual é possível perceber que, como esperado, houve o agrupamento dos clados por grupos taxonômicos. A imagem demonstra também que todos esses grupos estão distribuídos uniformemente entre as amostras, embora a classe Bacilli evidencie três *OTUs* que não estão presentes em todas as amostras analisadas, sendo: *OTU00037* (*Streptococcus*), ausente em bancada e latão; *OTU00048* (*Lactococcus*), ausente em queijo maturado; e *OTU00041* (*Tetragenococcus*), ausente em queijo frescal. A classe Flavobacteria apresenta a *OTU00036* (*Empedobacter*) ausente em queijo maturado; a classe Actinobactéria, as *OTUs* 00038 (*Streptomyces*), 00025 (*Dermacoccus*) e 00046 (*Actinomyces*) ausentes em queijo maturado; a classe Gammaproteobactéria, por sua vez, exibe a *OTU00018* (*Pseudoxanthomonas*) ausente em massa pano. Por fim, a classe Aroteobacteria, que possui a *OTU00050* (*Haematobacter*) ausente em massa pano, “pingo”, queijo frescal e queijo maturado; a *OTU00039* (*Sphingomonas*), ausente em massa latão; e a *OTU00045*

(*Acidisoma*), ausente em massa latão, massa pano, “pingo”, queijo frescal e maturado (Figura 20).

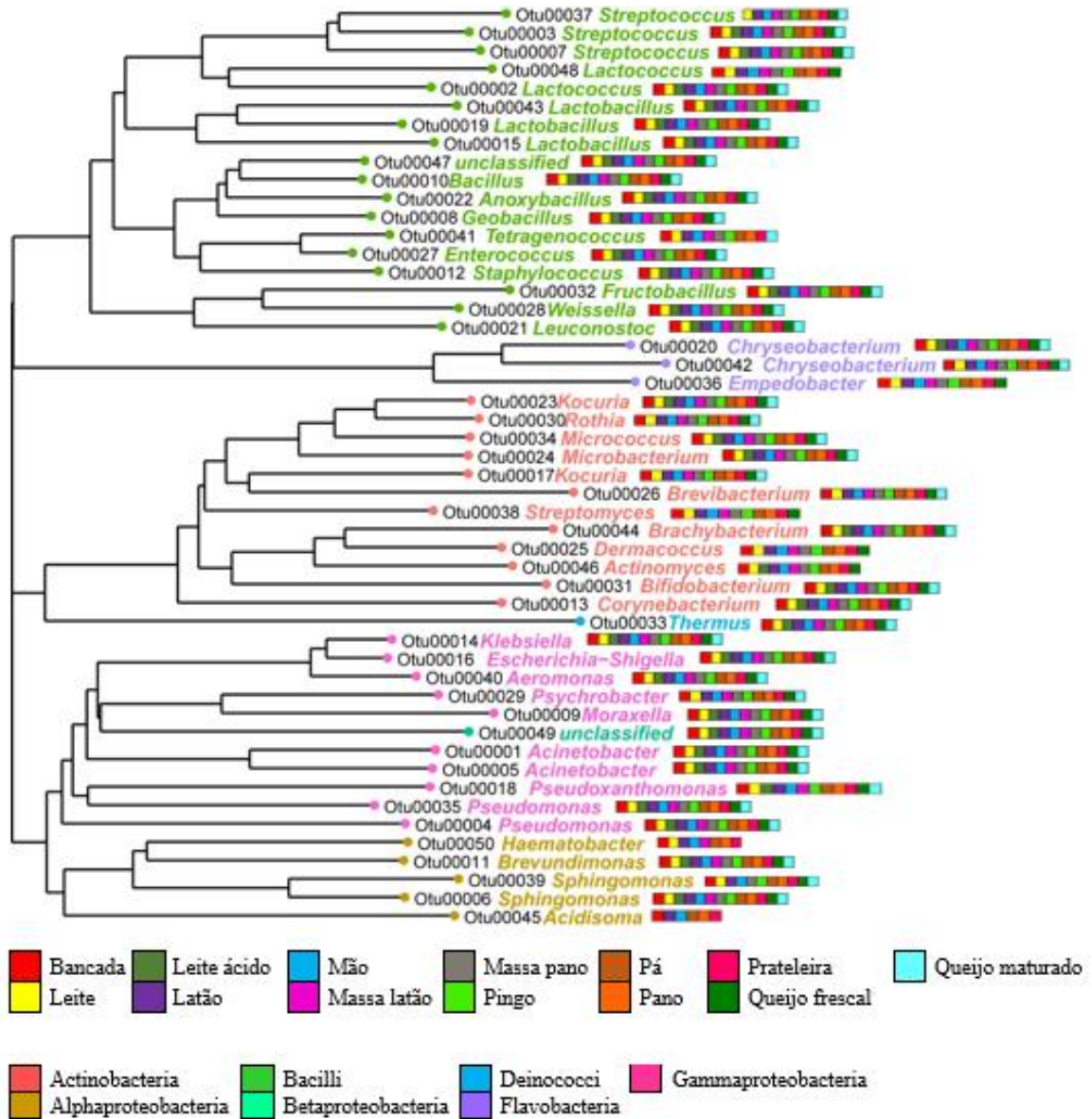


Figura 20. Análise filogenética para as cinquenta OTUs mais abundantes, destacando grupos taxonômicos (classes e gêneros) e presença em cada tipo de amostra.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, a amplificação do gene de rRNA de 16S forneceu uma visão detalhada da microbiota presente em um Queijo Minas Artesanal Canastra. Como foi o primeiro estudo usando metagenômica nesse tipo de queijo, o presente trabalho permite avaliar a riqueza, a diversidade microbiana e a dinâmica populacional ao longo dos processos de fabricação e amadurecimento do queijo.

Algumas práticas implantadas nos últimos tempos podem estar interferindo em grupos de microrganismos importantes para a composição do flavor do Queijo Minas Artesanal Canastra. Um exemplo disso pode ser percebido no trabalho de Mallet et al. (2012), onde os autores relataram uma redução nos níveis de *Lactococcus* tecnologicamente relevantes presentes no leite cru em relação ao que havia sido detectado 15 anos antes no leite cru coletado na mesma área (DESMASURES; GUEGUEN, 1997). Quigley et al. (2013) sugerem que esse fato é consequência da sensibilidade desse grupo à evolução de práticas agrícolas, uma vez que não ocorreram variações entre outros grupos de microrganismos avaliados nos dois estudos. Não foi possível a comparação desses resultados com o presente trabalho, devido à diferença nos métodos de análises.

Verificando os resultados do presente trabalho, percebe-se que as classes mais presentes entre as amostras foram Bacilli (Filo Firmicutes), Aproteobacteria e Gammaproteobacteria (Filo Proteobacteria). Estes grupos também foram predominantes em outros estudos de análise metagenômica de comunidades bacterianas presentes em queijos, revelando a típica capacidade de adaptação de determinadas famílias destes filos a este ambiente, como, por exemplo, as bactérias do ácido láctico (RIQUELME et al., 2015; DALMASSO et al., 2016; LUSK et al., 2012; O'SULLIVAN et al., 2015).

Considerando os níveis hierárquicos inferiores (ordens, famílias e gêneros), as amostras de swab das prateleiras de maturação apresentaram a maior riqueza (73% das ordens, 65% das famílias e 43% dos gêneros). Dos materiais fonte de microrganismos considerados no presente trabalho, a prateleira de maturação é aquele higienizado com menor frequência (semanalmente ou menos), sendo a limpeza realizada com o uso de uma escova de cerdas duras ou por raspagem do biofilme com faca ou lixa, e o enxague feito exclusivamente com água. Em algumas propriedades (ainda pouco comum), é usado também vinagre nessa higienização (esfrega-se um pano embebido em vinagre na

prateleira). Ainda que os produtores utilizem agentes biocidas mais potentes, as bactérias que sobrevivem nos biofilmes em superfícies são muito mais resistentes a agentes biocidas que as células planctônicas da mesma espécie (CARPENTIER; CERF 1993; CAMPANAC et al., 2002). Por esse motivo, os agentes de saneamento convencionais e desinfetantes podem não matar as bactérias sob certas condições (HODD; ZOTTOLA 1997). Essas formas de higienização, somadas à matéria-prima dessas prateleiras (madeira), provavelmente dificultam que todo o biofilme seja retirado durante a limpeza, mantendo, portanto, uma rica diversidade nesse ambiente.

A formação de biofilmes em plantas de processamento de alimentos está associada principalmente a superfícies úmidas, nas quais os microrganismos podem facilmente agregar-se (CHMIELEWSKI; FRANK 2003). Durante a maturação, o queijo vai perdendo água, que pode ir sendo retida pela madeira da prateleira, o que, somado à disponibilidade de nutrientes provenientes do queijo e aos poros da madeira, torna esse ambiente ideal para a proliferação de microrganismos e a formação de biofilme.

Já as amostras de queijo maturado apresentaram uma menor riqueza. A maturação é essencial para o pleno desenvolvimento do sabor e da textura do produto final (BEHMER, 1985; CARIDI, 2003; ECK, 1987). Durante esse processo, ocorrem diversos outros processos físico-químicos e microbiológicos que ocasionam uma seleção de microrganismos específicos para aquelas condições. Nessa seleção, muitos grupos são excluídos (BRANT et al., 2007), o que ocasiona essa diminuição da riqueza no produto final.

Analisando a distribuição de *reads* por gêneros, percebeu-se que mais de 50% da riqueza estão retidos em cinco gêneros principais: *Acinetobacter* (28,10%), *Lactococcus* (11,90%), *Streptococcus* (9,37%), *Pseudomonas* (5,39%) e *Sphingomonas* (4,33%), grupos comumente encontrados em leite e produtos lácteos (O'SULLIVAN et al., 2015; QUIGLEY, et al., 2013; MASOUD et al., 2012; DALMASSO et al., 2016; MALLET et al., 2012; DESMASES; GUEGUEN, 1997; VUYST; TSAKALIDOU, 2008).

Acinetobacter é um grupo de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, amplamente distribuídas no ambiente, podendo ser encontradas na água, no solo e também na pele e outras topografias de pessoas saudáveis (manipulador) (QUIGLEY et al., 2013), sendo capazes de sobreviver em diversas superfícies (úmidas e secas), podendo, portanto, multiplicar-se nas queijarias - nos materiais - contaminando o produto.

Já *Lactococcus* e *Streptococcus* compreendem espécies BAL cujo metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos contribui diretamente para o desenvolvimento do flavor do produto final (MCSWEENEY, 2004; RANDAZZO et al., 2006; DALMASSO et al., 2016) e acidificação da coalhada - processo essencial no início da produção - sendo os principais gêneros usados como culturas inicializadoras industriais (QUIGLEY, et al., 2013; HOLS et al., 2005). Algumas espécies desses grupos são capazes de produzir compostos antagônicos a outros microrganismos (MORENO et al., 1999; DELORNE, 2008; IVANOVA et al., 1998), o que é importante durante o processo, uma vez que microrganismos que podem ser prejudiciais podem ser excluídos por esses compostos. Entretanto, mesmo com a importância desse grupo, sua presença requer atenção, pois algumas espécies de *Streptococcus* podem ser patogênicas (FACKLAM, 2002).

Analisando essa distribuição por amostra, nota-se que *Acinetobacter* domina a microbiota de todos os materiais, e, embora apresente uma porcentagem considerável na matéria-prima (leite - 13,40%) e esteja dominando a microbiota das amostras de massa latão, massa pano e queijo frescal (52,75%, 47,06%, 41,31%, respectivamente), o grupo aparece em baixas quantidade no “pingo” e no queijo maturado (0,22% e 2,33%, respectivamente), o que indica que o grupo pode ter entrado no processo por meio dos materiais. Sua presença no leite seria explicada pelo fato de que ele foi coletado após estar em contato com o latão, bem como com todo o sistema de ordenha, onde pode ter ocorrido a contaminação. A diminuição drástica desse grupo no queijo maturado indica que o ambiente no produto final não seja ideal para sua proliferação, ou mesmo está sendo excluído por competição ou por compostos antagônicos produzidos por outros grupos.

Lactococcus, por sua vez, aparece em todas as amostras entre os dez mais presentes, exceto latão. No entanto, aparece em baixa quantidade em todos os materiais e nas amostras de leite, e em destaque nas amostras de “pingo” (33,75%), massa latão (14,65%), massa pano (14,77%), queijo frescal (20,40%) e queijo maturado (25,80%), o que sugere que, provavelmente, a grande maioria dos microrganismos desse grupo é inserida no processo após a adição do “pingo”. *Streptococcus* também apresenta um padrão semelhante, tendo destaque nas amostras de “pingo” (34,90%), massa pano (10,55%), queijo frescal (9,27%) e queijo maturado (32,98%), sendo que esse grupo não aparece entre os dez mais relevantes para a maioria dos materiais (bancada, pá, pano, latão e mão). Algumas espécies destes dois gêneros contribuem para a acidificação da

coalhada e a proteólise da caseína. O metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos por estas BAL é o principal contribuinte para o desenvolvimento do flavor (MCSWEENEY, 2004; RANDAZZO, et al., 2006; SKELIN et al, 2012). Dessa forma, pode-se ressaltar a importância da adição do “pingo” à produção.

Pseudomonas e *Sphingomonas*, com exceção das *Pseudomonas*, nas amostras de leite (décima posição - 1,11%) foram identificadas entre os 10 grupos com maior porcentagem de *reads* somente nos materiais, exceto para pá, onde não aparece. Essa distribuição indica que o grupo é originado nos materiais e tende a diminuir ao longo do processo, sendo que, no produto final, representa, respectivamente, somente 0,02% e 0,01% da microbiota dessas amostras. Segundo Ercoline et al. (2009), *Pseudomonas spp.*, comumente encontradas no leite cru, são a causa mais comum de deterioração do leite (ERCOLINI et al., 2009).

O gênero *Geobacillus* ocupa a sexta posição na riqueza de *reads*, no geral; entretanto, esse grupo pode ser identificado como dominante para amostra de leite (43,75%) e em baixa porcentagem para as amostras de “pingo” (2,43%), massa latão (2,23%), massa pano (1,89%), queijo frescal (1,70%), pá (1,19%) e mão (1,94%). Porém, na amostra pá, embora apresente uma porcentagem acima de 1%, esse grupo não está entre os 10 mais ricos para essa amostra. Para as demais amostras, esse gênero aparece em quantidades inferiores a 1%. Delgado et al. (2013) também encontraram *Geobacillus* em amostras de leite, mas o autor sugeriu que a presença desse grupo é resultado de contaminação ambiental, tendo em vista que ainda não havia sido relatada sua presença em produtos lácteos. Quigley et al. (2013), por sua vez, indicaram *Geobacillus stearothermophilus* como sendo um dos contaminantes de leite.

No presente trabalho, a distribuição desse gênero entre as amostras sugere que ele pode ser um grupo originado principalmente da matéria-prima, pois a única fonte de microrganismos em que o grupo está presente entre os dez mais relevantes é a mão do manipulador. Quando se compara os resultados do presente trabalho com os de outros que usaram a mesma metodologia estudando queijos de massa cozida, é possível perceber que o Queijo Minas Artesanal Canastra obteve um número maior de *reads* identificados, como no trabalho de O’Sullivan et al., (2015), onde os autores encontraram 294.853 *reads* em amostras do queijo tipo continental amostrado em vários estágios durante a maturação, enquanto, no presente trabalho, identificaram-se 1.005.119 *reads* no total, e

493.372 quando foram retirados os materiais. Os valores dos índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) também tiveram uma variação menor que a do presente trabalho. A amostragem entre os dois trabalhos variou, porém ambas amostraram o queijo antes e após a maturação, o que permite que seja feita a comparação. No estudo de O'Sullivan et al. (2015), os autores encontraram, na amostra de queijo no primeiro dia de maturação, 87.156 *reads*, e 48.404 após a maturação completa. Já no presente trabalho, identificaram-se 91.675 no primeiro dia, e 90.691, após a maturação completa.

Neste estudo, foram encontrados 35 filos diferentes, enquanto O'Sullivan et al. (2015) detectaram 5; no entanto, em ambos os trabalhos, Firmicutes foi o filo dominante.

Outros estudos realizados com queijos de massa cozida usando a mesma metodologia tiveram outras formas de amostragem, o que dificultou comparações mais detalhadas. Porém, sabe-se que a pasteurização do leite cru é efetuada para reduzir a carga microbiana do leite e, em particular, limitar o número de microrganismos indesejados e prevenir as doenças transmitidas pelos alimentos. Contudo, esse processo também reduz o número de microrganismos que normalmente contribuem para propriedades sensoriais desejáveis associadas com queijos de leite cru (Quigley et al., 2013). Sendo assim, os queijos de massa cozida perdem a maioria dos grupos microbianos durante o processo de pasteurização, sendo muitas vezes necessário adicionar culturas inicializadoras para compor a microbiota responsável por conferir as características desejadas ao produto final, e os grupos que não pertencem a essas culturas provavelmente são provenientes do ambiente e dos materiais. Já a microbiota do queijo de leite cru é composta totalmente por microrganismos naturais do ambiente e da região em que é produzido. Como não ocorre adição nem exclusão de grupos ao longo da produção, a microbiota que compõe o produto final é a resultante de interações de microrganismos e modificações físico-químicas que ocorrem ao longo do processo.

Analisando a distribuição de *reads* dos gêneros que aparecem entre os dez gêneros com maior riqueza de *reads* por grupos estudados, percebeu-se que *Klebsiella*, *Chryseobacterium* e *Escherichia-Shigella* não aparecem entre os dez gêneros com maior riqueza de *reads* nos produtores de menor valor agregado, e *Dermatococcus* não ocorre entre os dez nos produtores de maior valor.

Estudos com *Chryseobacterium* revelaram que esse grupo possui genes envolvidos na aquisição e na captação de ferro - uma característica importante das

bactérias da superfície do queijo - assim como genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono e enxofre, metabolismo de aminoácidos e degradação de ácidos graxos. O repertório genético dessas estirpes também destaca a sua capacidade de catabolizar lactato e propionato, sendo capazes, assim, de produzir compostos importantes para a formação do sabor dos queijos amadurecidos (MONNET et al., 2010; SCHRÖDER et al., 2011). Como esse grupo aparece entre os dez mais relevantes para os produtores de maior valor agregado e não se manifesta entre os de menor valor, pode-se esperar que esses microrganismos colaborem para a formação do flavor no produto final.

Em geral, a presença de *Klebsiella* pode indicar contaminação do rebanho (mastite) (OIKONOMOU et al., (2012), condições higiênicas precárias durante o processo de fabricação (DALMASSO et al., (2016), ou mesmo uma má preparação do úbere para ordenha (QUIGLEY et al., 2013). A presença desse grupo entre os dez mais relevantes para os produtores de maior valor agregado pode indicar que algum animal na propriedade esteja com mastite, o que pode contaminar toda a produção. A contagem de *reads* desse gênero pelos produtores individualmente demonstrou que a contaminação encontra-se no produtor 4, que retém 80,26% (15524 *reads*) do total de *reads* identificados (dados não apresentados) para o gênero. A distribuição nas amostras do produtor reforça que o grupo entrou no processo na matéria-prima e proliferou ao longo deste, diminuindo no produto final, o que, por sua vez, indica que, durante a maturação, as condições físico-químicas e microbiológicas tendem a excluir esse grupo.

O gênero *Escherichia-Shigella* também possui espécies patogênicas (VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012); entretanto, não foram encontrados estudos que constatarem sua presença em leite e derivados, bem como para o gênero *Dermatococcus*.

As análises de α -diversidade por grupos estudados não demonstraram diferenças significativas. Porém, quando a mesma análise foi realizada comparando as amostras por grupos estudados, conseguiu-se identificar variações. Por meio dos valores de riqueza, pôde-se perceber que as amostras de massa pano, pá, pano, “pingo”, queijo frescal e queijo maturado tiveram uma maior riqueza nos produtores de menor valor agregado - o que evidencia que esse grupo possui uma carga de microrganismos consideravelmente maior. Isso pode ser atribuído aos métodos de higienização precários nesse grupo de produtores, assim como às condições das instalações onde o produto é fabricado. Quanto à diversidade, o que se destaca é o fato de que as amostras de bancada, pano, “pingo” e

queijo maturado mostraram menor diversidade nos produtores de maior valor agregado, o que pode indicar uma dominância de certos grupos de microrganismos, provavelmente aqueles benéficos ao processo de produção.

As análises de α -diversidade de tipo de bancada por grupos de produtores não mostraram variação, mas quando foi realizada a mesma análise separando pelo tipo de amostra, percebeu-se que as amostras de bancada mostram uma riqueza e uma diversidade bem maiores quando utilizada a bancada de madeira, o que provavelmente reflete no produto final, uma vez que o mesmo padrão foi observado para queijo maturado. Superfícies de processamento de madeira, incluindo placas de envelhecimento (MARIANI et al., 2007; FELIGINI et al., 2012), são fontes ricas de microrganismos, que são importantes para a acidificação do queijo e seu amadurecimento.

Os padrões observados pela análise *PCoA* demonstram que o leite, que é a matéria-prima inicial do processo e que possui a comunidade bacteriana mais rica, contribui para o processo até a fase de queijo frescal, de forma que, à medida que o processo de maturação se perfaz, os grupos bacterianos do leite, predominantes no início da maturação, vão sendo reduzidos, mantendo-se aqueles grupos predominantemente advindos do “pingo”. Embora existam várias fontes de novas bactérias para o produto, aquela que mais contribui para o produto final é o “pingo”.

Por meio das análises de β -diversidade por *Bray-Curtis* (sumarizadas pela *PCoA*), pode-se destacar ainda mais a importância do “pingo” no processo de produção, tendo em vista que as amostras de “pingo” e queijo maturado se sobrepõem, evidenciando que essas duas amostras possuem o mesmo tipo de comunidade bacteriana. Sendo assim, provavelmente o “pingo” é o que mais influencia na microbiota do produto final. Por meio dela, percebemos também que, no geral, as fontes de microrganismos apresentam uma microbiota mais diversa quando comparada à matéria-prima, demonstrando que a higienização do ambiente influencia diretamente no produto.

Conferindo, ainda, a análise *PCoA*, agora por produtor, observou-se que possivelmente os microrganismos que geram as características que desagregam valor aos produtos estão nas fontes que constituem os utensílios e instalações de trabalho (queijaria, ambiente de ordenha) dos produtores. Comparando-se os produtores de maior e menor valor agregado, nota-se uma maior proximidade das comunidades do produto final com

as comunidades encontradas nas fontes de microrganismos nos produtos de menor valor agregado do que naqueles considerados de maior valor.

As análises de β -diversidade por *Unifrac* não ponderada exibiram um agrupamento por grupos estudados nas amostras de “pingo” e queijo maturado, o que indica que a higienização do ambiente influencia diretamente na microbiota. Quando a análise (usando Bray- Curtis) foi realizada comparando as amostras de queijo maturado e “pingo”, em conjunto, observou-se um agrupamento por produtor, indicando que a microbiota de cada queijaria se assemelha mais entre si do que às mesmas amostras de diferentes queijarias. Por exemplo, o “pingo” de uma queijaria é mais semelhante ao queijo maturado da mesma queijaria do que com as amostras de “pingo” de outras. Isso indica a importância da caracterização microbiana de todo o ambiente, uma vez que ela influencia diretamente no produto final.

A caracterização da dinâmica das comunidades, utilizando valores de riqueza, demonstrou a importância do processo de maturação, já que as comunidades microbianas decrescem drasticamente do queijo fresco para o queijo maturado. Esse mesmo padrão também foi observado nas análises de *heat-map*, onde, no queijo fresco, os grupos bacterianos se mostraram mais abundantes em comparação ao queijo maturado. Essa redução de gêneros mostra uma possível competição interespecífica por nutrientes.

Nas análises de *heat-map*, percebeu-se que as bactérias ácido-láticas foram encontradas em grande abundância nos queijos maturados, sendo o gênero *Lactococcus* o mais relativo em todas as fazendas. Bukolich & Mills (2013) também encontraram dominância desse grupo em instalações e superfícies de queijos artesanais. *Lactococcus* é abundante no “pingo” utilizado pelos produtores, indicando que pode exercer uma forte influência na maturação do queijo, até mais que o próprio leite.

Quando se fez a análise por grupos estudados, *Lactococcus* diminuiu durante o processo de produção, para o grupo de maior valor agregado, e aumentou para o grupo de menor valor. Isso pode indicar que o ambiente no produto de menor valor favorece a proliferação desses microrganismos, ou mesmo que a distribuição de outros grupos de microrganismos, favorece a proliferação desse grupo.

Durante a maturação, o gênero *Staphylococcus* apresentou esse mesmo padrão, aumentando drasticamente a frequência relativa nos produtores de menor valor agregado e diminuindo para produtores de maior valor - o que exige um alerta, visto que bactérias

desse gênero, como *Staphylococcus aureus*, pode levar à intoxicação alimentar. O gênero *Staphylococcus* foi encontrado em todas as etapas do processo de produção, o que provavelmente se deve ao fato de esse grupo ser capaz de sobreviver no ambiente após a limpeza e desinfecção (AUSTIN; BERGERON, 1995; SHARMA; ANAND 2002; GUNDUZ; TUNCEL 2006; SCHLEGELOVA et al., 2010). Esses resultados podem indicar que a microbiota que compõe os produtos de maior valor agregado está em equilíbrio e é capaz de promover a redução de grupos indesejados, permitindo a dominância de grupos que colaboram para o desenvolvimento do flavor do produto final.

Observando o *heat-map* por amostras, identificou-se que os gêneros *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudoxanthomonas*, *Staphylococcus* e *Sphingomonas* são mais abundantes nas instalações e também nos produtores de menor valor agregado, o que pode indicar que a higienização e o ambiente estão diretamente relacionados com a distribuição desses grupos.

A árvore filogenética entre as *OTUs* e os grupos taxonômicos (gênero e classe) encontrados para as 50 *OTUs* mais abundantes evidenciou que, embora a grande maioria dessas *OTUs* estivesse presente na maior parte das amostras, houve variações. Das amostras analisadas, o queijo maturado foi a que teve maior número de *OTUs* (entre as 50 mais abundantes) ausentes, o que pode demonstrar um maior equilíbrio entre sua microbiota, uma vez que possui menos grupos dominantes quando comparada às demais amostras, ou mesmo que seus grupos dominantes acabem por excluir outros grupos.

Por outro lado, as *OTUs* OTU00050 (*Haematobacter*) e OTU00045 (*Acidisoma*) estiveram ausentes nas massas (com exceção de *Haematobacter* para massa latão), “pingo”, queijo frescal e maturado, o que pode indicar que esse grupo seja proveniente dos materiais (fontes de microrganismos). A compreensão da composição microbiana dos queijos produzidos a partir de leite cru é essencial para a qualidade e a segurança do produto final. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que as condições das instalações, bem como os métodos de higienização, influenciam diretamente na microbiota do produto final, indicando que esse seja o ponto-chave para agregar valor ao produto, refletindo diretamente na sustentabilidade da região, uma vez que o queijo possui extrema importância social e econômica para a região, sendo a principal fonte de renda para a grande maioria da população.

O presente estudo foi o primeiro passo para estudos mais detalhados, que permitam um melhor entendimento sobre a microbiota desse produto, o que é essencial para que se possa dar suporte aos produtores da região, auxiliando-os no que deve ou não ser feito durante o processo, contribuindo para as características finais do produto, agregando valor a ele.

Estudos que abranjam mais passos do processo de produção e também mais fontes de microrganismos ainda se fazem necessários. A contaminação da matéria-prima pode iniciar durante a ordenha e se manter até o produto final. Identificando todos os pontos de contaminação desde o início, bem como quais microrganismos são provenientes de cada fonte, é possível que se possa controlar a entrada de microrganismos indesejados no processo.

Amostrar o queijo durante as diferentes fases da maturação também é necessário para que se possa compreender detalhadamente a dinâmica dos microrganismos durante esse processo. O tempo de maturação é uma preocupação para a maioria dos produtores da região, pois, durante o tempo em que o produto está maturando, ele está perdendo peso e, conseqüentemente, reduzindo o valor que será recebido pelo produtor. Um estudo mais detalhado do período de maturação pode abrir a possibilidade de diminuir o tempo de maturação exigido pela legislação (22 dias), caso seja comprovado que a microbiota não sofra variação significativa em sua dinâmica e composição em um período menor. Essa redução no período de maturação também pode favorecer aqueles produtores que, por falta de capital de giro, acabam por comercializar o produto na forma frescal, de forma ilegal.

7. CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho podemos concluir que a compreensão da composição microbiana dos queijos produzidos a partir de leite cru é essencial para a qualidade e a segurança do produto final. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a microbiota do pingo é fundamental para composição da comunidade que atuará na maturação do produto final e que as condições das instalações, bem como os métodos de higienização, também influenciam significativamente na microbiota do produto final, indicando que estes – pingo e boas práticas de produção – sejam os pontos-chave para agregar valor ao produto, refletindo diretamente na sustentabilidade da região.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**. London, v. 20, n. 5, p. 489-493, 2003.

ALEGRÍA, A.; SZCZESNY, P.; MAYO, B.; BARDOWSKI, J.; KOWALCZYKA, M. Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n.6, p. 1890–1898, 2012.

ARAUJO, T. F. **Caracterização e identificação de enterococcus spp. Isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo minas artesanal da região da canastra, minas gerais**. Viçosa: UFV, 2008. 74p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ARTEAU, M.; LABRIE, S.; ROY, D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. **Int Dairy J**. v. 20, n. 8, p. 545–554, 2010.

AUSTIN, J.W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**. v. 62, n. 3, p. 509–549, 1995.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite: produção, industrialização e análise**. 15ed. São Paulo: Nobel, 1985.

BEMFEITO, R. M. **Queijo Minas Artesanal da Microrregião da Serra da Canastra: Caracterização sensorial e eletroquímica**. Lavras: UFLA, 2016. 135p. Dissertação (mestrado), Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 4, p. 259-274, 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3^a ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V.1, General Aspects, p. 287-317.

BUKOLICH, N.A.; MILLS, D.A. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 7, n. 17, p.5214- 5223, 2013.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; FONSECA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Mapa do queijo Minas artesanal**. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2017a.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades- Minas Gerais. Censo demográfico**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 06 set. 2017b.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades- Minas Gerais**. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 06 set. 2017c.

BRASIL. Lei no 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. **Diário do Executivo**. Belo Horizonte, MG, 2002.

BRASIL. Ministério da Cultura. **Queijo artesanal de Minas. Patrimônio cultural do Brasil**. 2006. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>>. Acesso em: 06 jul. 2017d.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal**. SISBI-POA, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sisbi-1>>. Acesso em: 06 jul. 2017e.

BRASIL. Instituto Mineiro De Agropecuária. **Queijo Minas Artesanal. Lista produtores cadastrados no programa do Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>>. Acesso em: 06 jul. 2017f.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Revista Ciência Rural**. v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F. Testando a qualidade do leite. In: avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira, 2000. Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 200. p. 83-94.

BRITZ, T. J.; RIEDEL, K. H. J. Prapionibacterium species diversity in Leerdammer cheese. **Int J Food Microbial.** v. 22, n. 4, p. 257-267, 1994.

BORELLI, B. M. **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de Staphylococcus enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG.** Belo Horizonte: UFMG, 2006. 119p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal Microbiology Biotechnology,** v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; SILVA, M.C.C.; ROSA, C.A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.** São Paulo, v. 37, n. 4, p. 545-550, 2006.

BOUREL, G.; HENINI, S.; KRANTAR, K.; ORABY, M.; DIVIÈS, C.; GARMYN, D. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. **Le Lait.** v. 81, n. 1, p. 75-82, 2001.

CABEZA, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J. M.; SESEÑA, S.; PALOP, M^a. L. L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. **Food Control.** Guildford, v. 18, p. 11-17, 2007.

CALLON, C.; DELBÈS, C.; DUTHOIT, F.; MONTEL, M. C. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheese. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 29, n. 2, p. 172–180, 2006.

CAMPANAC, C.; PINEAU, L.; PAYARD, A.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; ROQUES, C. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 46, n. 5, p. 1469–1474, 2002.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.;

LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**. v. 7, n, 5, p. 335 - 336, 2010.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**. Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 191-200, 2003.

CARPENTIER B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 75, n. 6, p. 499–511, 1993.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. New York, v. 28, n. 4, p. 281 - 370, 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. Campinas: Unicamp, 2007. 187p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2007.

CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms : The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**. v. 126, n. 1, p. 271-273, 2008.

CHAMBA, J.-F.; IRLINGER, F. 2004 , Secondary and Adjunct Cultures. In: Fox, P. F.; McSweeney, P, L, H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P. (Org.) **Cheese Chemistry Physics and Microbiology**. Academic Press, 2004. p. 191 a 206.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.; GUEGUEN, M.; LENOIR, J.; SCHMIDT, J.L.; TOURNEUR, C. Les phénomènes microbiens. In : Le Fromage. 3ed. Paris: Lavoisier, 2008.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. E. CHIKINDAS, M. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol**. v. 71, n.1 , p. 1-20, 2001.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOPOULOS, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **J. Dairy Res.** v. 64, p. 409-421, 1997.

DALMASSO, A.; DEL RIO M. D. S.; CIVERA, T.; PATTONO, D.; CARDAZZO, B.; BOTTERO, M. T. Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput Sequencing. **Food Science and Technology.** v. 69, n. 70, p. 490 – 496, 2016.

DELGADO, S.; RACHID, C. T. C. C.; FERNÁNDEZ, E.; RYCHLIK, T.; ALEGRÍA, A.; PEIXOTO, R. S.; MAYO, B. 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.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology,** v. 126, n. 3, p. 274- 277, 2008.

DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **J Dairy Res.** v. 64, n. 2, p. 271–280, 1997.

DINIZ, M. F. S. **Queijo Canastra: um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento.** Piracicaba: USP, 2013. 159 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARLIOZ, R.; MARTELIN, R.; GAYRAL, J. P.; RAOULT, D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **J Clin Microbiol.** n. 38, v. 10, p. 3623–3630, 2000.

ECK, A. **O queijo.** 1ed. Europa-América, 1987.

EDGAR R. C.; HAAS, B. J.; CLEMENTE, J. C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics.** v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EMATER-MG. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais. **Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal.** Belo Horizonte, MG, 2004.

ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, n. 10, p. 3148-3155, 2013.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**. v. 26, n. 2, p. 228–231, 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. França, 1997. Disponível em <www.bacterio.cict.fr.> Acesso em: 26 abr. 2010.

FACKLAM R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Rev**. v. 15, n. 4, p. 613-30, 2002.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F. de; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F. de; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. 10, p. 162-165, 2003.

FELIGINI, M.; PANELLI, S.; BUFFONI, J. N.; BONACINA, C.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Identification of microbiota present on the surface of Taleggio cheese using PCR-DGGE and RAPD-PCR. **J. Food Sci**. v. 77, n. 11, p. M609–M615, 2012.

FERNANDES, R. Liquid milk products. In: FERNANDES, R. **Microbiology Handbook: Dairy Products**. 3ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. p. 1 – 10.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactéria lácticas – caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Ed.). **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. 1ed. Viçosa: Suprema, 2003.

FIALHO, T. L. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo minas artesanal da canastra**. Lavras: UFLA, 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**. v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; COGAN, T. M. Factors that Affect the Quality of Cheese. In: Fox, P. F.; McSweeney, P, L, H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P. (Org.) **Cheese Chemistry Physics and Microbiology**. Academic Press, 2004. p. 583- 608.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P.L. **Fundamentals of Cheese Science**. 1ed. Gaithersburg: Springer, 2000.

FOX, P. F.; WALLACE, J. M. Formation of flavor compounds in cheese. **Advances in Food Microbiology**, v. 45, p. 1-37, 1997.

FUKA, M. M.; ENGEL, M.; SKELIN, A.; REDZEPOVIC, S.; SCHLOTTER, M. Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 142, n. 1-2, p. 19–24, 2010.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 35, p.33-36, 1980.

GIRAFFA, G. Enterococci in food. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, n. 2, p. 163 – 171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, 2003.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 6, p. 732 – 738, 1997.

GUIDONE, A.; ZOTTA, T.; MATERA, A.; RICCIARDI, A.; FILIPPIS, F.; ERCOLINI, D.; PARENTE, E. The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with diferente acidification methods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 214, n. 4, p. 9 – 7, 2016.

GUNDUZ, G.T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 89, n. 3-4, p. 329–336, 2006.

HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K. J.; ASPLUND, K.; MÄKI-PETÄYS, N.; KORKEALA, H.J. Genotypes and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 11, p. 1487-1491, 2000.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal analysis of uncultivated microorganisms. **Microb. Ecol.** v. 35, n. 1, p. 1–21, 1998.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**. v. 14, n. 6, p. 467-494, 2004.

HODD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 9, p. 1034–1037, 1997.

HOPPE-SEYLER, T.; JAEGER, B.; BOCKELMANN, W.; GEIS, A.; HELLER, J.K. Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. **Systematic and applied Microbiology**. v. 30, p.50-57, 2007

HOLS, P.; HANCY, F.; FONTAINE, L.; GROSSIORD, B.; PROZZI, D.; LEBLOND-BOURGET, N.; DECARIS, B.; BOLOTIN, A.; DELORME, C.; DUSKO EHRlich, S.; GUÉDON, E.; MONNET, V.; RENAULT, P.; KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiol Reviews**. v. 29, n. 3, p. 435-63, 2005.

HOLT, J. G.; GRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**. v. 180, n. 18, p. 4765–4774, 1998.

HUGENHOLTZ, J.; STARRENBURG, M. J. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 38, n. 1, p. 17–22, 1992.

HUGHES, J. B.; HELLMAN J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Appl Environ Microbiol**. v. 67, n. 10, p. 4399 – 4406, 2001.

IRLINGER, F. E.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion Biotechnology**. v. 20, n. 2, p. 142-148, 2009.

IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, T. S.; PANTEV, A.; BUDAKOV, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 147-158, 1998.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed., Porto Alegre: Artmedia. 2005.

JANY, J. L.; BARBIER, G. Culture- independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiol.** v. 25, n. 7, p. 839–848, 2008.

KAMAGATA, Y.; TAMAKI, H. Cultivation of uncultured fastidious microbes. **Microbes Environ.** v. 20, n. 2, p. 85–91, 2005.

KONGO, J.M.; HO, A.J.; MALCATA, F.X.; WIEDMANN, M. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from são Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. **Journal of Applied Microbiology.** v 103, p. 1838–1844, 2007.

LASSU. Laboratório de Sustentabilidade. **Pilares da Sustentabilidade**. São Paulo: USP, 2017. Disponível em: < <http://www.lassu.usp.br/sustentabilidade/pilares-da-sustentabilidade/>>. Acesso em: 06 jul. 2017.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. 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**. Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

LUSK, T. S.; OTTESEN, A. R.; WHITE, J. R.; ALLARD, M.W.; BROWN, E. W.; KASE, J. A. Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. **BMC Microbiology.** v. 12, n. 254, p. 1 -10, 2012.

MALLET. A.; GUEGUEN, M.; KAUFFMANN, F.; CHESNEAU, C.; SESBOUE, A.; DESMASURES, N. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. **Int Dairy J.** v. 27, n. 1-2, p. 13–21, 2012.

MARIANI, C.; BRIANDET, R.; CHAMBA, J. F.; NOTZ, E.; CARNET-PANTIEZ, A.; EYOUNG, R. N.; OULAHAL, N. Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. **J. Dairy Sci.** v. 90, n. 4, p. 1653–1661, 2007.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro**. Viçosa: UFV, 2006. 175 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARTIN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTIN-SANCHEZ, I.; MARTINEZ-BUENO, M. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese, using culture-dependent and -independent methods. **Appl Environ Microbiol.** v. 74, n. 18, p. 5662–5673, 2008.

MARTIN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology.** v. 132, n.1, p. 24-32, 2009.

MASOUD, W.; VOGENSEN, F. K.; LILLEVANG, S.; AL-SOUD, W. A.; SORENSEN, S. J.; JAKOBSEN, M. The fate of indigenous microbiota, inoculadora cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real-time (qRT)-PCR. **International Journal of Food Microbiology.** v. 153, n. 1-2, p. 192- 202, 2012.

MCSWEENEY, P. L. H. Diversity of cheese varieties: An overview. In: FOX, P. F. (Org) **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.** Wisconsin: Academic Press, 2004. p.1-23.

MEILE, L.; LE BLAY, G.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganisms: propionibacterium and Bifidobacterium. **Int J Food Microbiol.** v. 126, n. 3, p. 316 – 320, 2008.

MENEZES, M. F.C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K1; BORTOLUZZI, D. P.; CRISTIANO MENEZES, C. R. Microbiota e conservação do leite. **Reget/UFMS.** v. 18, n. Ed. Especial Mai. 2014, p. 76-89, 2014.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013.** Estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2013. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2017.

MONSALLIER, F.; VERDIER-METZ, I.; AGABRIEL, C.; MARTIN, B.; MONTEL, M-C. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. **Dairy Sci Technol.** v. 92, n. 3, p. 265–278, 2012.

MONNET, C.; LOUX, V.; GIBRAT, J. F.; SPINLER, E.; BARBE, V.; VACHERIE, B.; GAVORY, F.; GOURBEYRE, E.; SIGUIER, P.; CHANDLER, M., ELLEUCH, R.; IRLINGER, F.; VALLAEYS, T. The arthrobacter arilaitensis Re117 genome sequence

reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. **PLoS ONE**. v. 5, n. 1, e15489, 2010.

MONTEL, M-C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D.A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **Int. J. Food Microbiol.** v. 177, n. 2, p. 136–154, 2014.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**. v. 30, n. 2, p. 130-136, 1999.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAN, T. M.; DE VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 73-84, 2003.

NALBANTOGLU, U.; CAKAR, A.; DOGAN, H.; ABACI, N.; USTEK, D.; SAYOOD, K.; CAN, H. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. **Food Microbiology**. v. 41, p. 42 -51, 2014.

NDOYE, B.; RASOLOFO, E. A.; LAPOINTE, G.; ROY, D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. **Dairy Sci. Technol.** v. 91, n. 5, p. 495–524, 2011.

NETTO, M. M.; NETTO, M. C. C. **O Queijo Minas Artesanal e o Mercado Central de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: Uma Questão Cultural**. In: ENCONTRO DE GEÓGRAFOS DA AMÉRICA LATINA, 12., 2009, Montevideu. Uruguai. EGAL

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do Queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. Viçosa: UFV, 2007. 82p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

NÓBREGA, J. E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais, Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 2012. 128p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

OGIER, J. C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAIHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 286-290. 2008.

OIKONOMOU, G.; MACHADO, V. S.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y. H.; BICALHO, R. C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. **PLoS One**. v. 7, n. 10, e47671, 2012.

OLIVEIRA, L. R.; MEDEIROS, R. M.; TERRA, P. B., QUELHAS, O. L. G. Sustentabilidade: da evolução dos conceitos à implementação como estratégia nas organizações. **Produção**. v. 22, n. 1, p. 70 – 82, 2012.

OLIVEIRA, M. B. de; COSTA, A. L. M.; ANDRADE, B. R. D.; CARVALHO, F. O. D.; ARAÚJO, G. C.; MOURA, C. J. de. Maturação e aceitabilidade do queijo pecorino produzido com leite de vaca aos 180 dias. **Revista do Instituto de Laticínio “Candido Tostes”**. Juiz de Fora, v. 65, n. 372, p. 43 – 48, 2010.

OLSEN, G. J.; LANE, E. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution : a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**. v. 40, p. 331-355, 1986.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 65p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

O’SULLIVAN, D. J.; FALLICO, V.; O’SULLIVAN, O.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P. D.; GIBLIN, L. High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. **BMC Microbiology**. v. 15, n. 266, p. 1 -12, 2015.

PARENTE, E. Diversity and dynamics of microbial communities in natural and mixed inicializadora cultures. **Aust. J. Dairy Technol**. v. 61, n. 2, p. 1–8, 2006.

PARENTE, E.; COGAN, T. M. 2004. Inicializadora Cultures: General Aspects. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Org.) **Cheese Chemistry Physics and Microbiology**. Academic Press, 2004. p. 123 a 147.

PARENTE, E.; ROTA, M.; RICCIARDI, A.; CLEMENTI, F. Characterization of natural inicializadora cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). **International Dairy Journal**. v. 7, n. 12, p. 775–783, 1997.

PIARD, J-C.; LOIR, Y.L.; POQUET, I.; LANGELLA, P. Bactérias lácticas: as bactérias lácticas no centro dos novos desafios tecnológicos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 2, n. 8, p. 80-84, maio/jun. 1999.

PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria sp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro.** Viçosa: UFV, 2008. 71p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

POT, B. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: CORRIEU, G.; LUQUET, F.M.(COORD) **Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments.** Paris: Lavoisier, 2008.

PREZOTTO et al. **Manual de orientações para concepção de projetos agroindustriais da agricultura familiar.** Brasília: Programa de Agroindustrialização da Agricultura Familiar, 2005.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology.** v. 150, n. 2-3, p. 81-94, 2011.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews.** v. 37, n. 5, p. 664 - 698, 2013.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of Molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **J.Microbiol.Methods.** v. 78, n. 1, p. 1–9, 2009a.

RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; RIBBERA, A.; CAGGIA, C. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. **Food Microbiology.** v. 27, n. 3 p. 363–374, 2009b.

RANDAZZO, C. L.; VAUGHAN, E. E.; CAGGIA, C. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. **International Journal of Food Microbiology.** v. 109, n. 1 – 2, p. 1 – 8, 2006.

RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 57, p. 369–394, 2003.

REINHEIMER, J. A.; QUIBERONI, A.; TAILLIEZ, P.; BINETTI, A. G.; SUÁIREZ, V. B. The lactic acid microflora of natural whey inicializadoras used in Argentina for hard cheese production. **International Dairy Journal.** v. 6, n. 8-9, p. 869-879, 1996.

RIQUELME, C.; CÂMARA, S.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; VINUESA, P.; DA SILVA, C. C. G.; MALCATA, F. X.; REGO, O. A. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). **International Journal of Food Microbiology**. v. 192, n. 2, 86 – 94, 2015.

RYSSEL, M.; JOHANSEN, P.; AL-SOUD, W. A.; SORENSEN, S.; ARNEBORG, N.; JESPERSEN, L. Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of surface ripened semi-hard Danish Danbo cheeses investigated by culture-independent techniques. **International Journal of Food Microbiology**. v. 215, n. 13, p. 124 – 130, 2015.

SCHAECHTER, J. D.; KRAFT, E.; HILLIARD, T. S.; DIJKHUIZEN, R. M.; BENNER, T.; FINKLESTEIN, S. P.; ROSEN, B. R.; CRAMER, S. C. Motor recovery and cortical reorganization after constraint-induced movement therapy in stroke patients: a preliminary study. **Neurorehabil. Neural. Rep.** v. 16, n. 4, p. 326-338, 2002.

SCHLEGELOVÁ, J.; BABÁK, V.; HOLASOVÁ, M.; TANTINOVÁ, L. K.; CIDOVÁ, L.; ŠIŠÁK, F.; VLKOVÁ, H.; ROUBAL, P.; JAGLIC, Z. Microbial Contamination after Sanitation of Food Contact Surfaces in Dairy and Meat Processing Plants. **Czech J. Food Sci.** .v. 28, n. 5, p. 450–461.2010.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; SAHL, J. W. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**. v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. **Applied and environmental microbiology**. v. 77, n. 10, p. 3219-26, 2011.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**. v. 27, n. 6, p. 863–864, 2011.

SCHRODER, J., MAUS, I., TROST, E.; TAUCH, A. 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. 545, p. 1 -23, 2011.

SCHUPPLER, M.; LOESSNER, M. J. The opportunistic pathogen *Listeria monocytogenes*: pathogenicity and interaction with the mucosal immune system. **International Journal of Inflammation**. Nasr City, v. 2010, p. 1-12, 2010.

SEKIGUCHI, Y. Yet-to-be cultural microorganisms relevant to methane fermentation processes. **Microbes Environ.** v. 21, n. 1, p. 1–15, 2006.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology.** v. 19, n. 6, p. 627–636, 2002.

SHARPE, M. E. Taxonomy of the lactobacilli. **Dairy Science Abstracts.** v. 24, n. 3, p. 110-118, 1962.

SILVA, R. W. S. M.; PORTELLA, J. S.; VERAS, M. M. **Manejo correto da ordenha e qualidade do leite.** Circular Técnica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Bagé, Rio Grande do Sul, (2002).

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do Queijo Minas artesanal da Canastra.** Lavras: UFLA, 2007. 198p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, J.G.; ABREU, L.R.; MAGALHÃES, F. A. R.; PINTO, S. M.; PICCOLI, R. H. 2013. Influence of endogenous yeast on the physicochemical and sensory characteristics of artisanal Minas cheese from Canastra. **Informe Agropecuário.** v. 34, p.7-13, 2013.

SILVEIRA, D. R.; LOPES, N. A.; GONZALES, H. L. de.; TIMM, C. L. Sobrevivência de *Salmonella typhimurium*, infantis, Derby e Enteritidis em doce de leite pastoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v. 32, n. 4, p. 715-717, 2012.

SKELIN, A.; FUKA, M. M.; MAJHENI, A. C.; REDZEPOVI, S.; SAMARZIJA, D.; MATIJASI, B. B. Phenotypic and genotypic characterization of indigenous Lactobacillus community from traditional Istrian Ewe's cheese. **Food Technology and Biotechnology.** v. 50, n. 3, p. 362 - 370, 2012.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science & Technology** , v.15, n. 7, p. 348–359, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 10ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção de Qualidade do Leite.** 1ed. Santa Maria: UFSM, 2010.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Curr Opin Microbiol.** n. 11, v. 5, p. 442-446, 2008.

TSAKALIDOU, E.; ZOIDOU, E.; POT, B.; WASSILL, L.; LUDWIG, W.; DEVRIESE, L.A.; KALANTZOPOULOS, G.; SCHLEIFER, K. H.; KERSTERS, K. Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 2, p. 519–527, 1998.

VAN DEN BELD, M. J.; REUBSAET, F.A. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Microbiology.** Stuttgart, v. 69, n. 1-2, p. 37-44, 2001.

VUYST, L. D.; TSAKALIDOU, E. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 476-485, 2008.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 91-109, 2002.

9. ANEXOS

Tabela 8. 50 gêneros com maior número de *reads* e sua distribuição por amostra (valores apresentados em porcentagem)

Gêneros	Amostras												
	Ban	L	LA	Lat	Mão	ML	MP	P	Pá	Pan	Pra	Q F	Q M
<i>Acinetobacter</i>	5,04	2,28	0,02	8,07	16,68	18,33	11,41	0,07	11,99	5,11	6,89	13,35	0,76
<i>Lactococcus</i>	3,98	0,78	0,08	0,11	2,22	12,02	8,45	26,85	3,38	3,46	3,33	15,57	19,77
<i>Streptococcus</i>	0,21	1,01	0,11	0,53	0,81	7,65	7,67	35,27	0,51	0,28	4,87	8,98	32,1
<i>Pseudomonas</i>	13,04	0,99	0,04	40,62	4,58	0,54	0,44	0,04	1,11	25,8	12,02	0,73	0,04
<i>Sphingomonas</i>	10,7	0,34	0	49,69	3,61	0,07	0,03	0,29	1,29	23,22	10,67	0,05	0,02
<i>Geobacillus</i>	0,96	64,13	3,31	0,24	4,76	6,68	3,93	7,05	2,88	0,42	0,81	4,73	0,1
<i>Moraxella</i>	22,31	2,11	0,04	13	6,98	2,55	2,04	7,37	23,91	14,21	1,8	3,64	0,03
<i>Bacillus</i>	4,65	1,65	0,79	1,07	17,06	24,23	13,54	0,06	13,24	0,91	4,21	17,83	0,75
<i>Brevundimonas</i>	11,54	0,46	0,02	40,95	4,55	0,16	0,05	0,05	0,8	28,47	12,9	0,04	0,02
<i>Lactobacillus</i>	3,26	0,57	0,66	0,33	1,74	4,21	3,07	13,08	7,01	0,35	14,67	3,02	48,04
<i>Staphylococcus</i>	3,21	1,6	0,13	2,49	1,36	1,84	2,52	1,33	4,53	1,1	62,85	2,58	14,46
<i>Corynebacterium</i>	1,64	0,95	0,05	3,18	2,28	2,68	1,27	0,83	1,62	1,66	48,55	0,97	34,32
<i>Kocuria</i>	30,76	0,54	0	1,85	3,19	1,05	0,95	11,97	31,72	8,91	4,72	3,1	1,24
<i>Klebsiella</i>	0,24	9,05	0,17	0,24	12,05	16,49	21,94	0,58	1,17	7,43	1,31	28,32	1,01
<i>Chryseobacterium</i>	2,16	2,38	0,55	4,3	27,73	3,52	2,15	8,73	4,57	29,54	2,31	12,02	0,05
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,81	1,85	0,26	0,04	0,44	11,01	17,36	29,48	0,32	0,03	1,24	20,44	16,72
<i>Pseudoxanthomonas</i>	11,66	0,21	0,02	43,11	4,44	0,07	0,02	0,02	0,49	27,61	12,31	0,05	0,01
<i>Leuconostoc</i>	16,16	0,35	0,06	0,2	1,46	2,54	1,8	29,51	7,42	4,78	27,16	2,48	6,06
<i>Anoxybacillus</i>	0,74	68,46	4,25	0,17	4,16	4,87	2,95	6,09	3,19	0,16	1,08	3,8	0,09

<i>Microbacterium</i>	10,11	0,6	0,01	44,93	5,59	0,17	0,09	0,06	1,11	25,57	11,63	0,12	0,01
<i>Dermacoccus</i>	6,02	0,07	0	2,48	1,48	0,12	0,07	0,27	86,82	1,95	0,07	0,64	0
<i>Brevibacterium</i>	1,44	0,17	0	7,66	1,15	0,24	0,3	0,11	0,86	3,97	72,4	0,03	11,68
<i>Enterococcus</i>	7,1	1	0,02	0,43	5,77	2,94	2,24	37,67	21,82	1,47	11,47	4,25	3,81
<i>Weissella</i>	1,33	6,01	5,57	0,1	1,26	6,3	2,95	19,17	0,52	0,19	36,6	3,13	16,87
<i>Bifidobacterium</i>	3,53	1,08	0,17	0,39	1,47	6,62	3,68	46,02	27,29	0,54	2,72	4,63	1,86
<i>Psychrobacter</i>	86,84	0,76	0,03	0,17	0,23	0,23	0,67	2,64	0,41	0,12	1,08	0,44	6,39
<i>Rothia</i>	23,94	0,48	0	2,48	16,73	0,78	0,99	5,03	29,62	8,14	1,29	10,38	0,15
<i>Fructobacillus</i>	20,51	0,07	0,07	0,03	1,4	4,4	2,45	42,48	0,49	0,82	6,52	3,65	17,12
<i>Thermus</i>	2,48	43,94	1,06	0,69	8,24	9,5	4,67	9,36	9	0,43	2,88	7,25	0,5
<i>Micrococcus</i>	10,55	2,15	0,07	43,4	6,15	0,5	0,36	0,04	1,25	23,26	11,45	0,68	0,14
<i>Empedobacter</i>	0,32	37,99	0	0,44	3,05	28,07	14,87	0,2	2,1	0,87	0,24	11,86	0
<i>Streptomyces</i>	10,16	6,34	0	43,73	5,23	0,09	0,04	0,04	1,51	22,62	10,11	0,13	0
<i>Brachybacterium</i>	11,31	1,13	0,06	6,84	2,83	1,19	1,07	0,85	18,5	3,79	44,91	0,79	6,73
<i>Aeromonas</i>	0,12	24,91	0,17	0,23	0,52	21,96	17,56	0,41	0,7	4,29	0,29	28,74	0,12
<i>Tetragenococcus</i>	0,12	0	0	0,12	0,25	0,37	0,12	0,74	1,35	0,12	59,72	0	37,09
<i>Acidisoma</i>	12,23	0,07	0	40,37	4,75	0	0	0	0,6	30,21	11,76	0	0
<i>Actinomyces</i>	15,09	2,03	0,07	3,19	1,89	0,29	0,29	0,36	67,13	6,68	2,61	0,36	0
<i>Paracoccus</i>	9,27	3,34	0,08	25,46	11,55	10,41	0,68	0,46	10,49	19	8,43	0,76	0,08
<i>Methylobacterium</i>	2,06	1,03	0,09	84,45	1,89	0,17	0,52	0	1,2	4,55	3,87	0	0,17
<i>Haematobacter</i>	13,35	1,61	0	36,14	10,14	0,2	0	0	0,4	26,41	11,75	0	0
<i>Janibacter</i>	6,18	2,41	0	51,1	7,43	1,36	0,73	0,21	1,26	19,16	9,11	1,05	0
<i>Stenotrophomonas</i>	0,55	24,93	0,55	0,97	4,57	27,7	15,24	1,11	4,29	4,99	1,39	13,43	0,28
<i>Duganella</i>	2,42	0,71	0	0,14	53,28	0,43	0,57	0	17,52	1,14	0	23,79	0
<i>Deinococcus</i>	2,43	0,71	0	44,94	19,26	1,14	0,57	12,7	12,98	1	2,28	1,85	0,14
<i>Propionibacterium</i>	6,53	10,32	0,46	15,48	16,39	1,06	1,52	6,07	13,66	7,44	17,3	0,76	3,03

<i>Chromohalobacter</i>	0	0	0	0	0	0,95	0,32	3,64	0	0	0,95	0,63	93,51
<i>Roseomonas</i>	8,45	0,88	0,53	44,54	7,75	0,7	0	0,18	3,87	21,83	10,92	0,35	0
<i>Phenylobacterium</i>	8,69	1,11	0	44,55	3,7	0,18	0	0	1,48	28,65	11,46	0	0,18
<i>Sediminibacterium</i>	2,63	16,92	0,94	2,26	25,56	8,65	3,57	6,02	19,55	0,94	8,46	3,2	1,32
<i>Bosea</i>	8,8	1,53	0	25,81	16,63	3,25	1,53	0,38	19,12	12,43	9,56	0,76	0,19

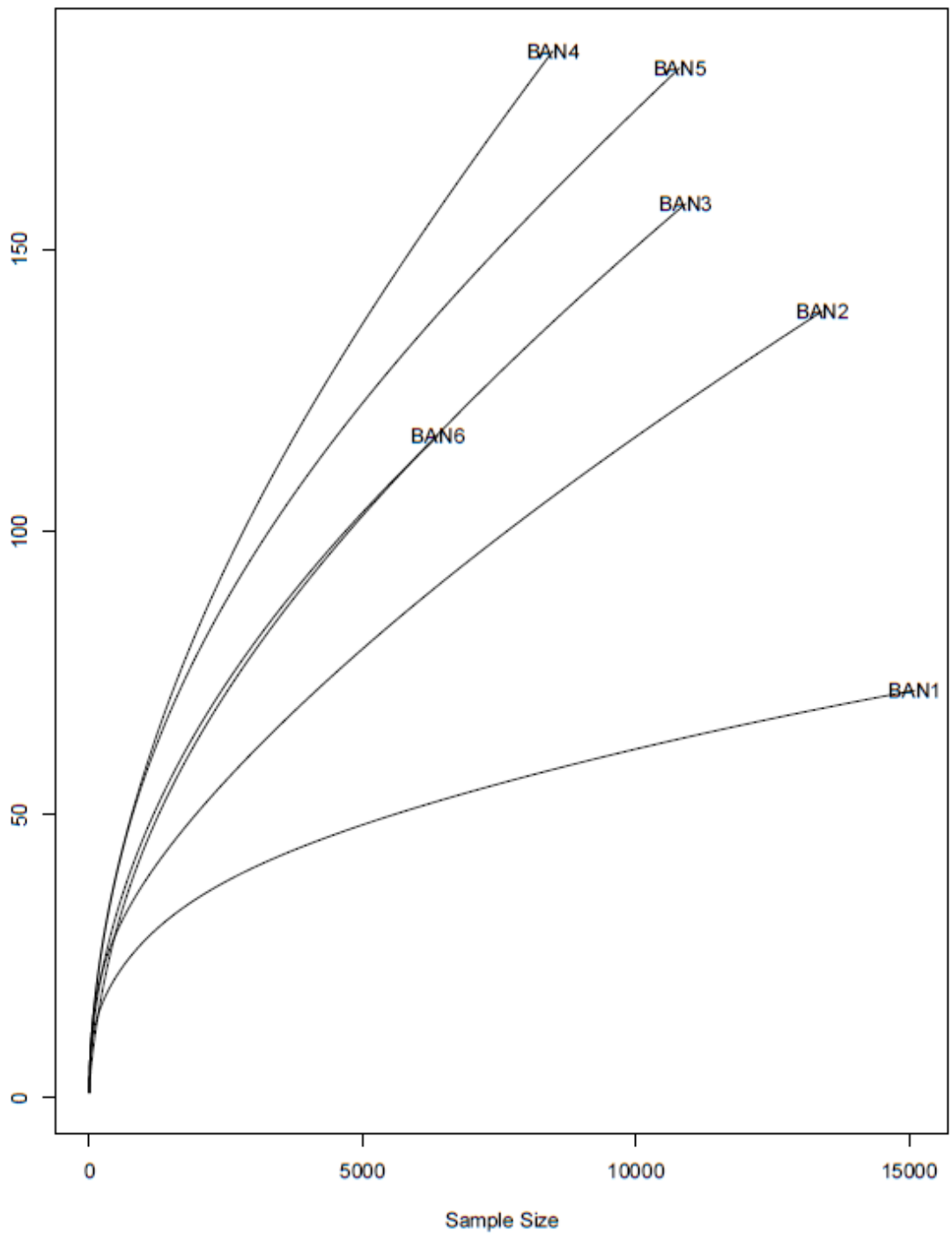


Figura 21. Curva de rarefação por tipo de amostra- Bancada

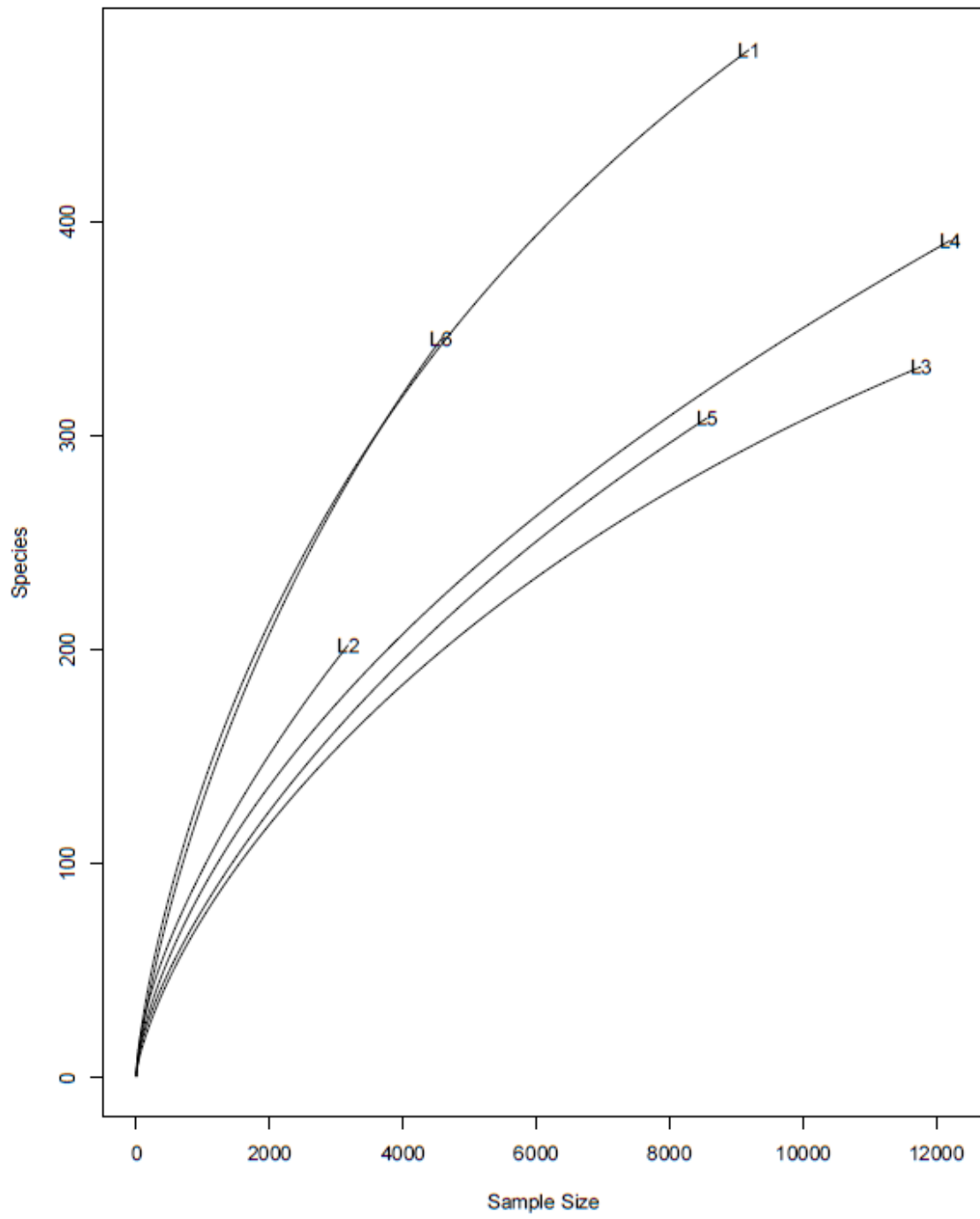


Figura 22. Curva de rarefação por tipo de amostra- Leite

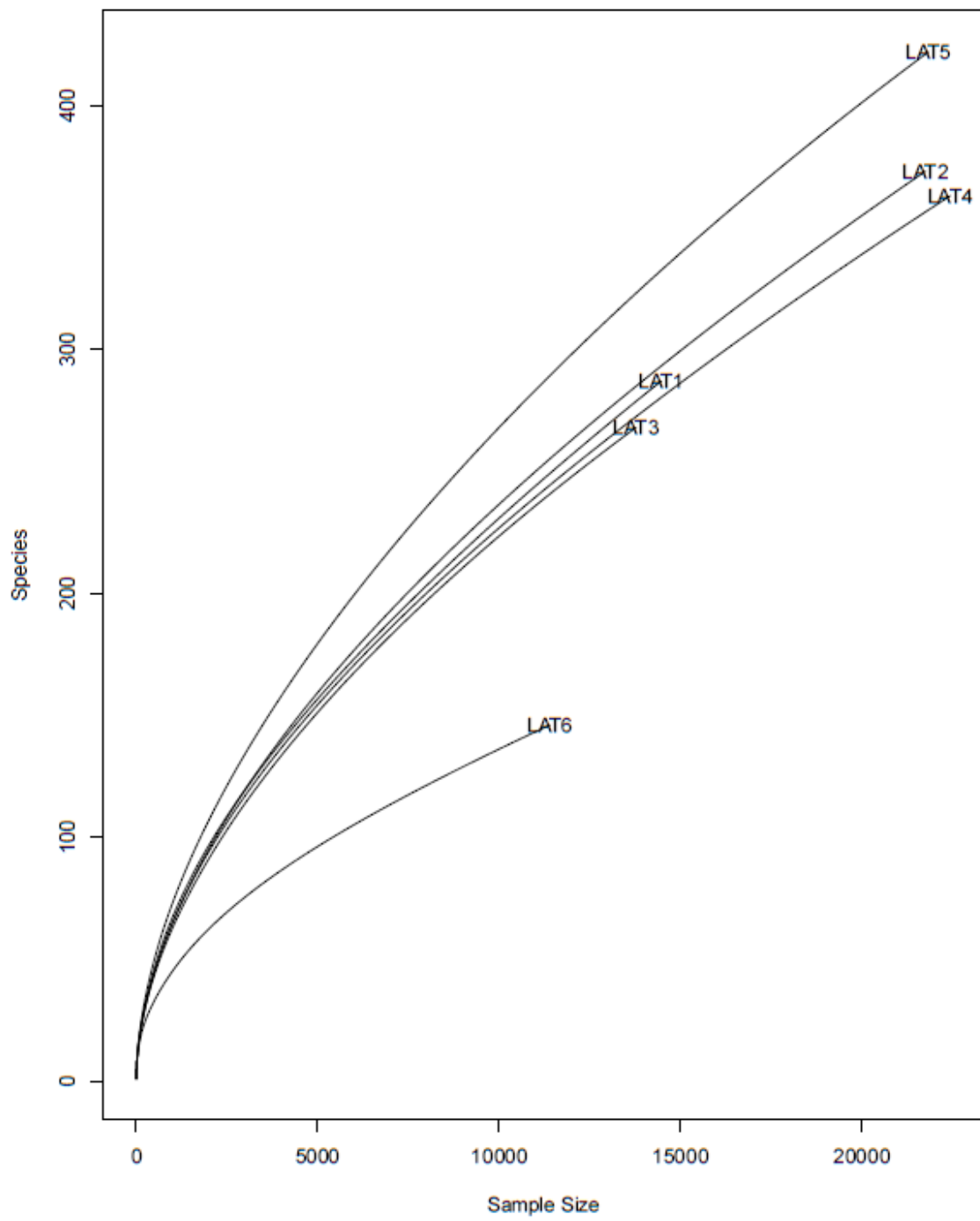


Figura 23. Curva de rarefação por tipo de amostra- Latão

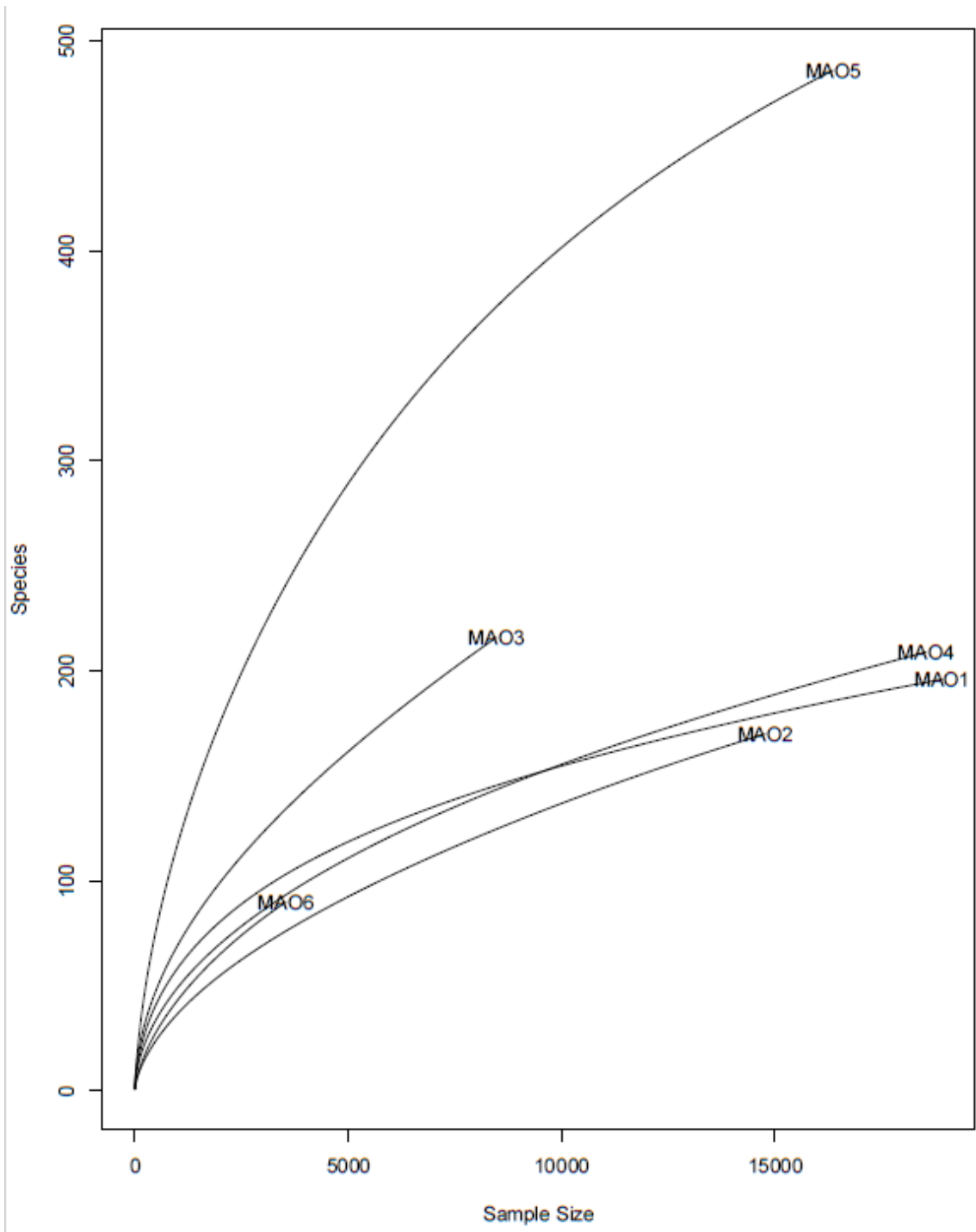


Figura 24. Curva de rarefação por tipo de amostra- Mão

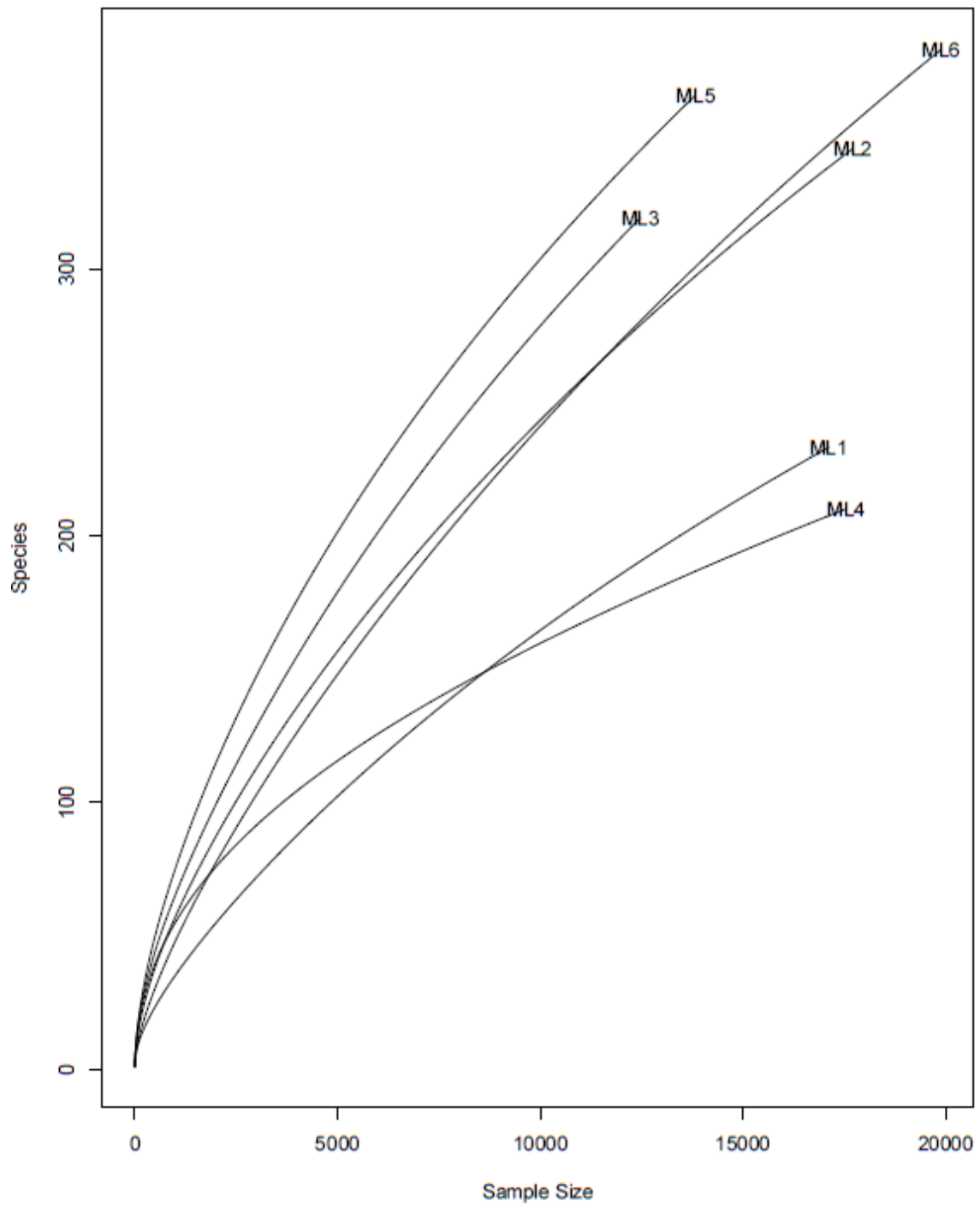


Figura 25. Curva de rarefação por tipo de amostra- Massa Latão

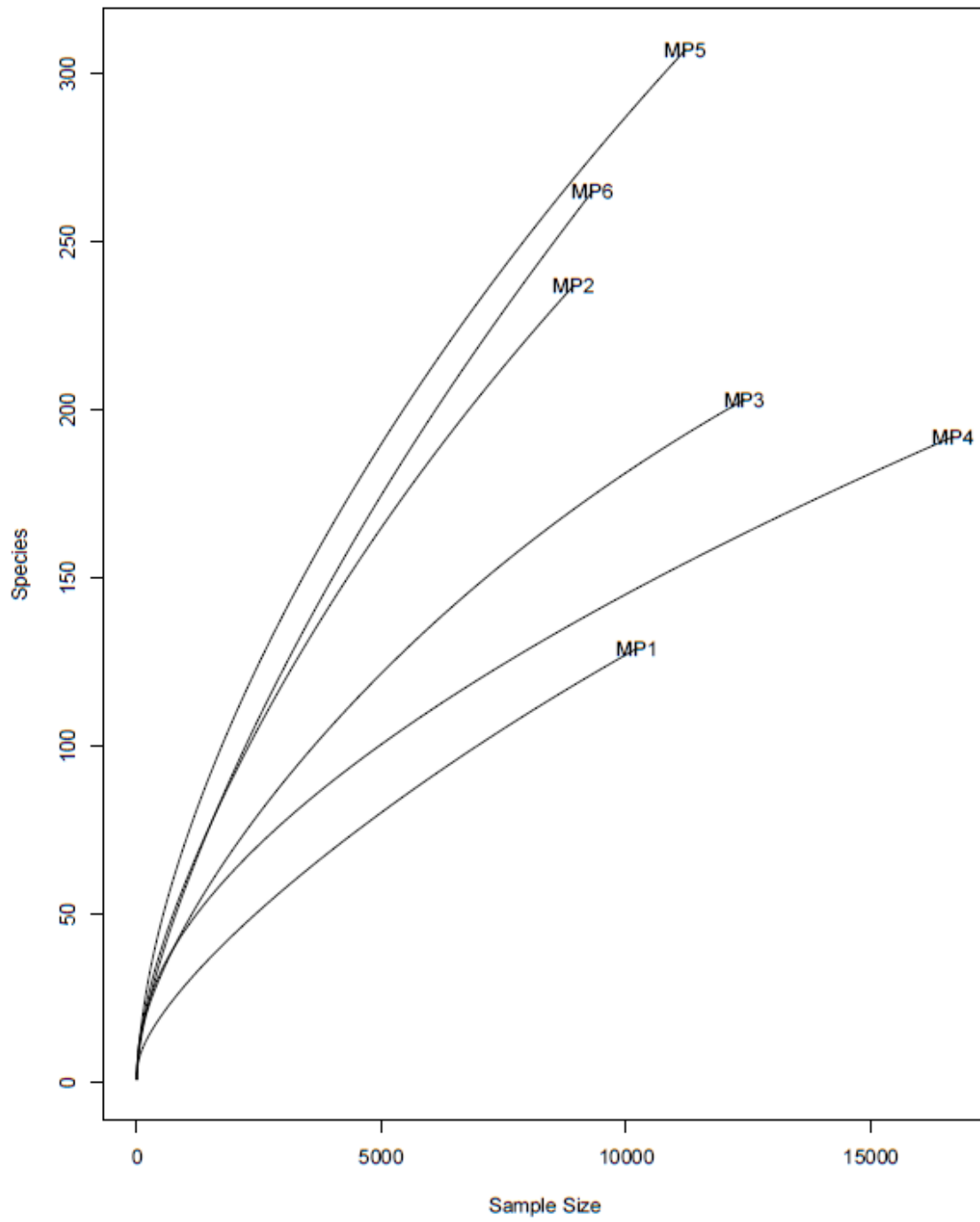


Figura 26. Curva de rarefação por tipo de amostra- Massa Pano

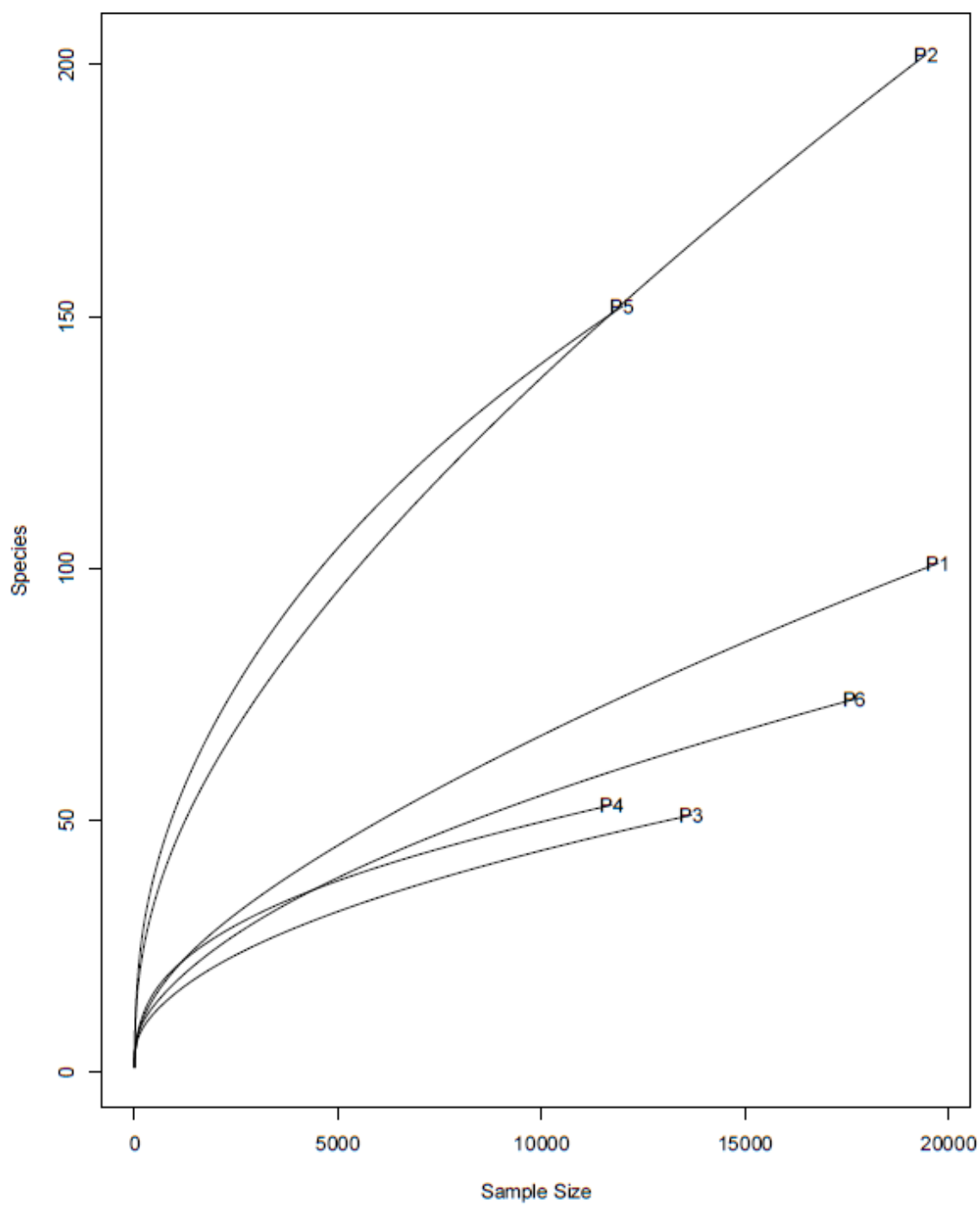


Figura 27. Curva de rarefação por tipo de amostra- “pingo”

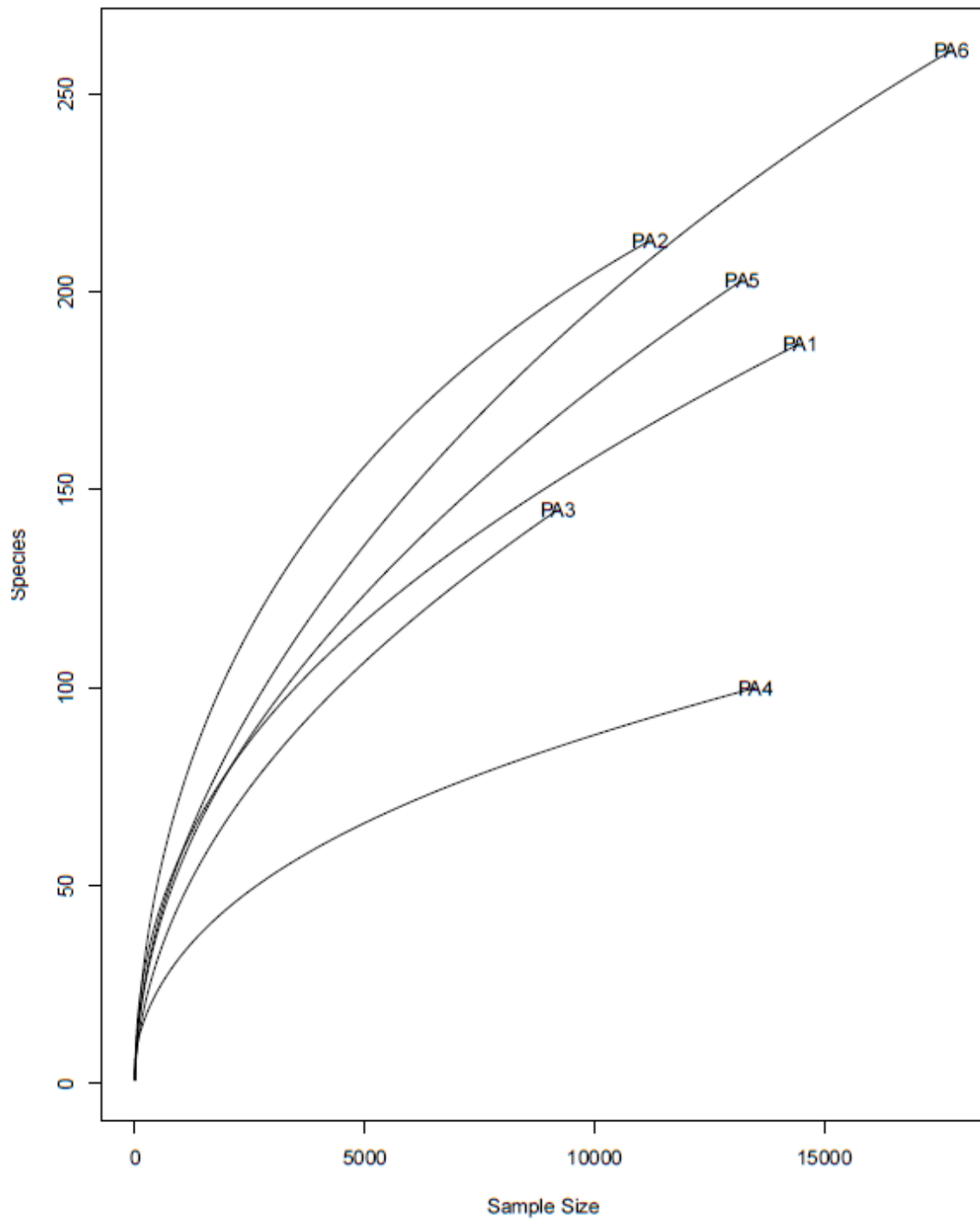


Figura 28. Curva de rarefação por tipo de amostra- Pá

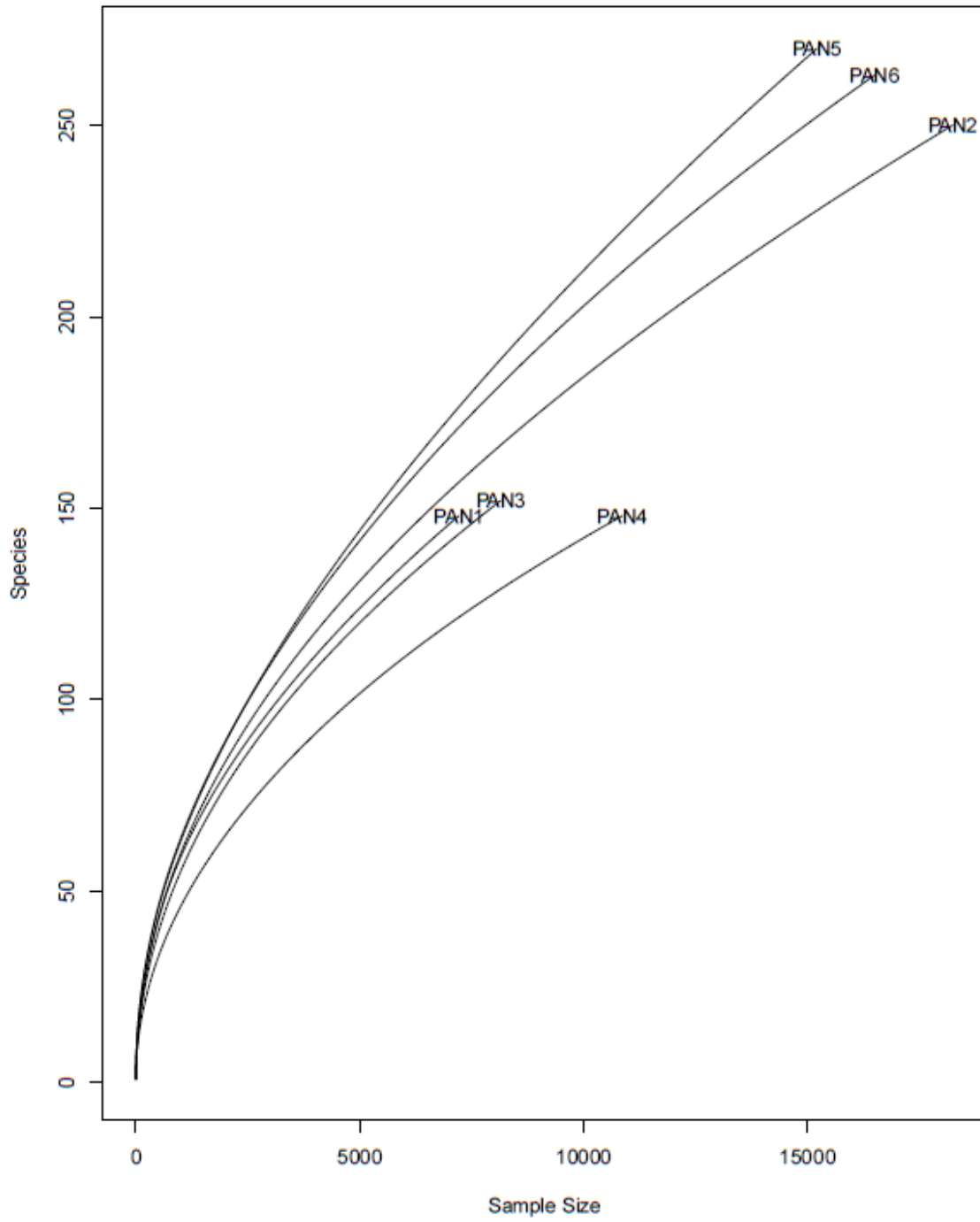


Figura 29. Curva de rarefação por tipo de amostra- Pano

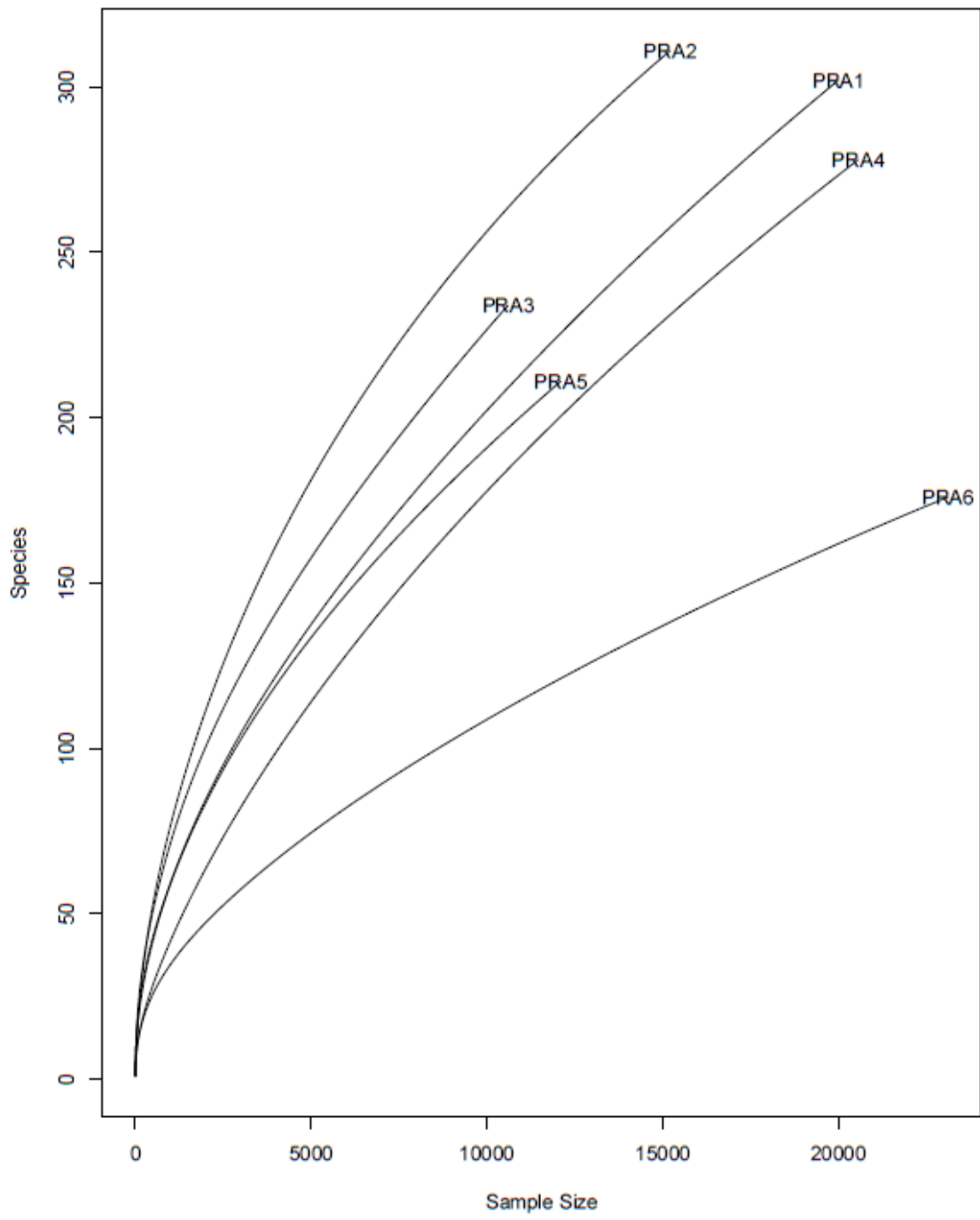


Figura 30. Curva de rarefação por tipo de amostra- Prateleira

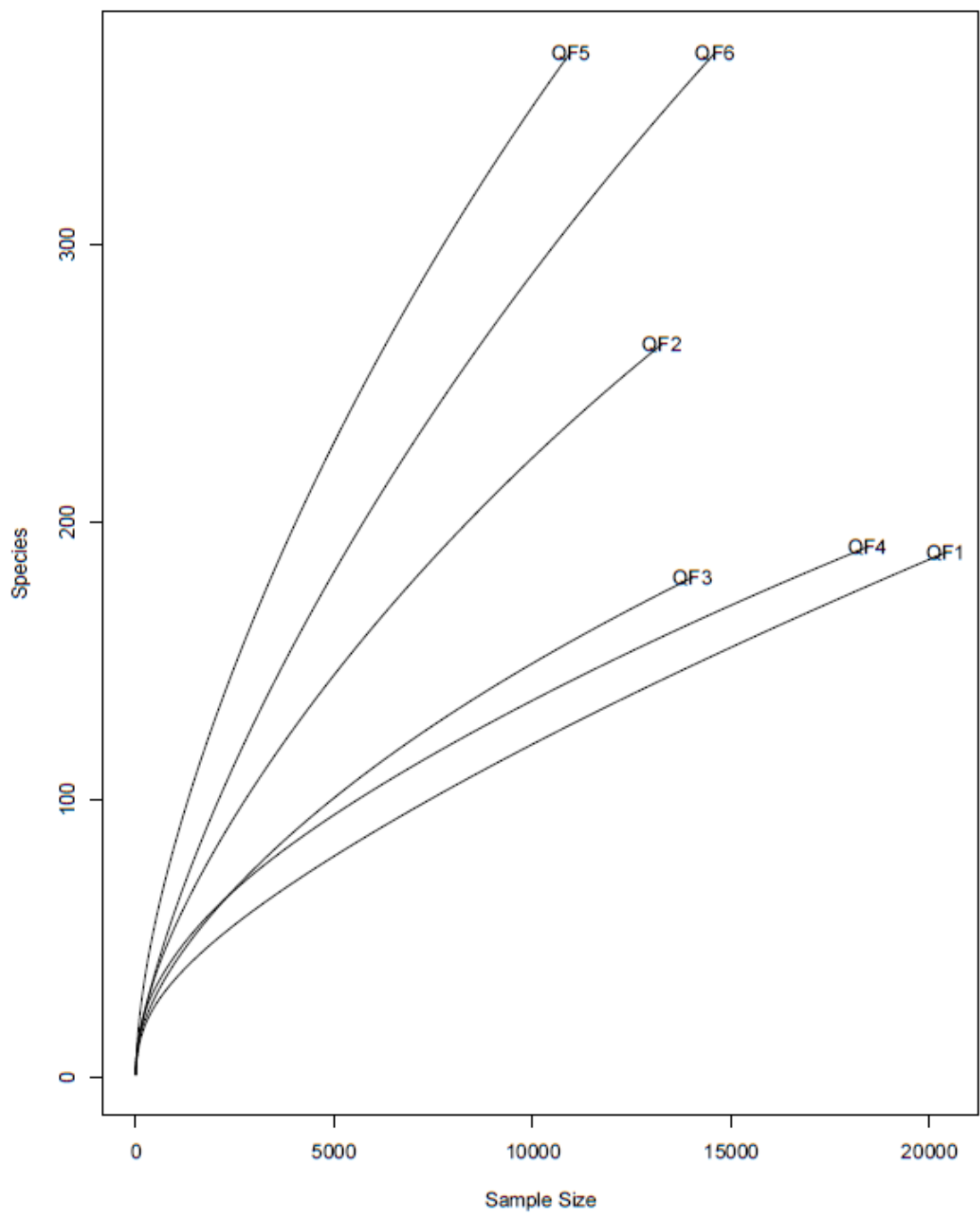


Figura 31. Curva de rarefação por tipo de amostra- Queijo Frescal

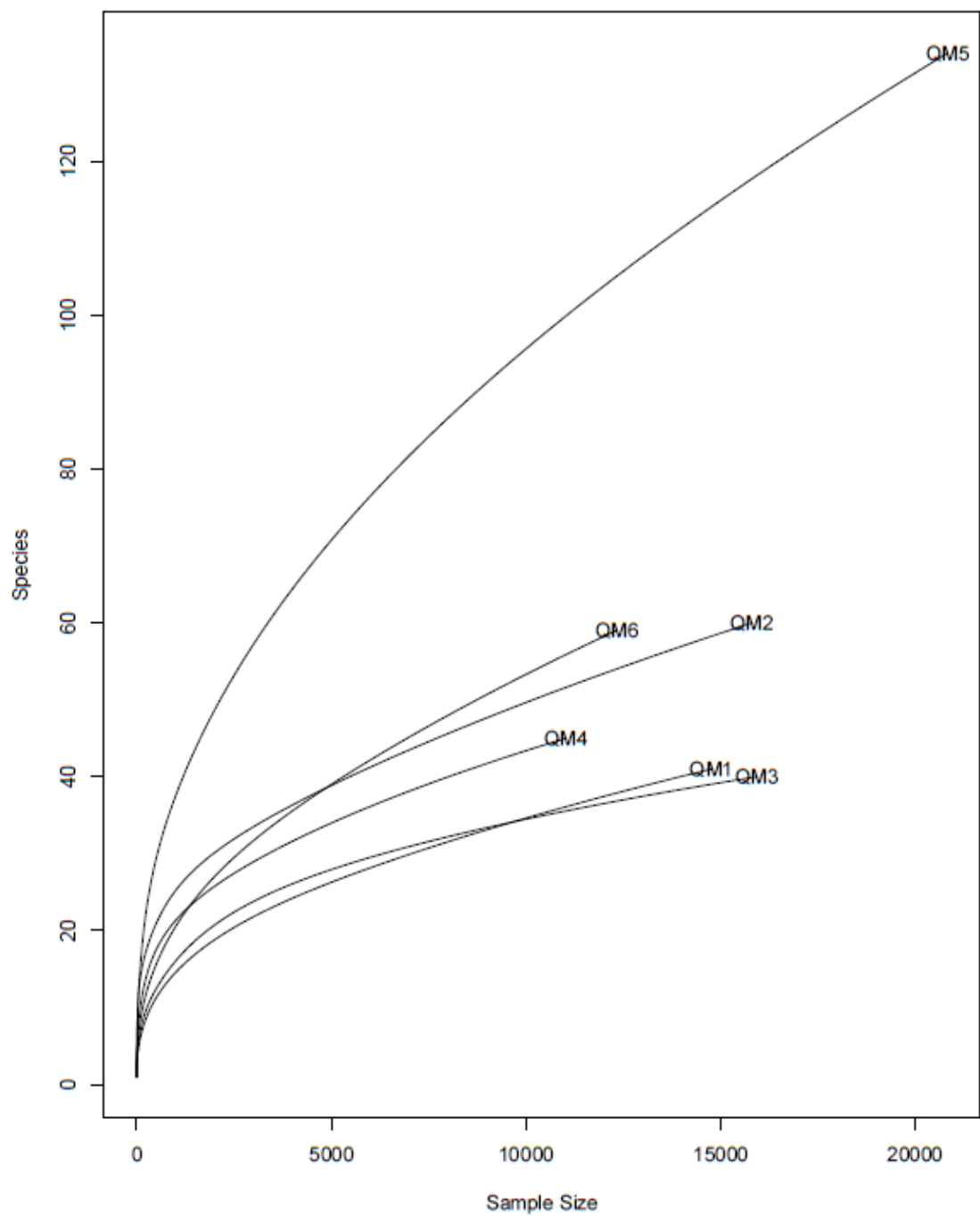


Figura 32. Curva de rarefação por tipo de amostra- Queijo Maturado

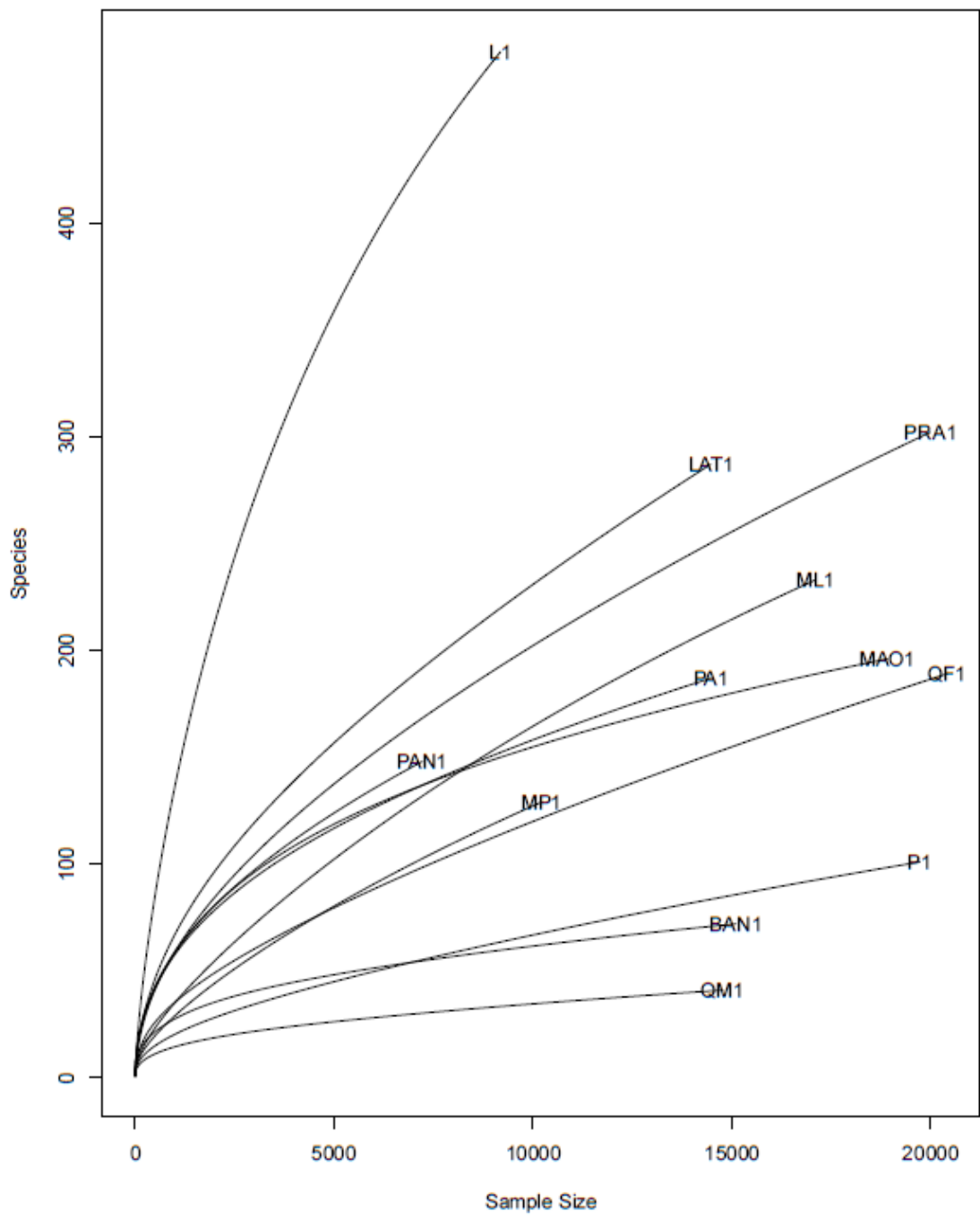


Figura 33. Curva de rarefação por produtor- Produtor 1

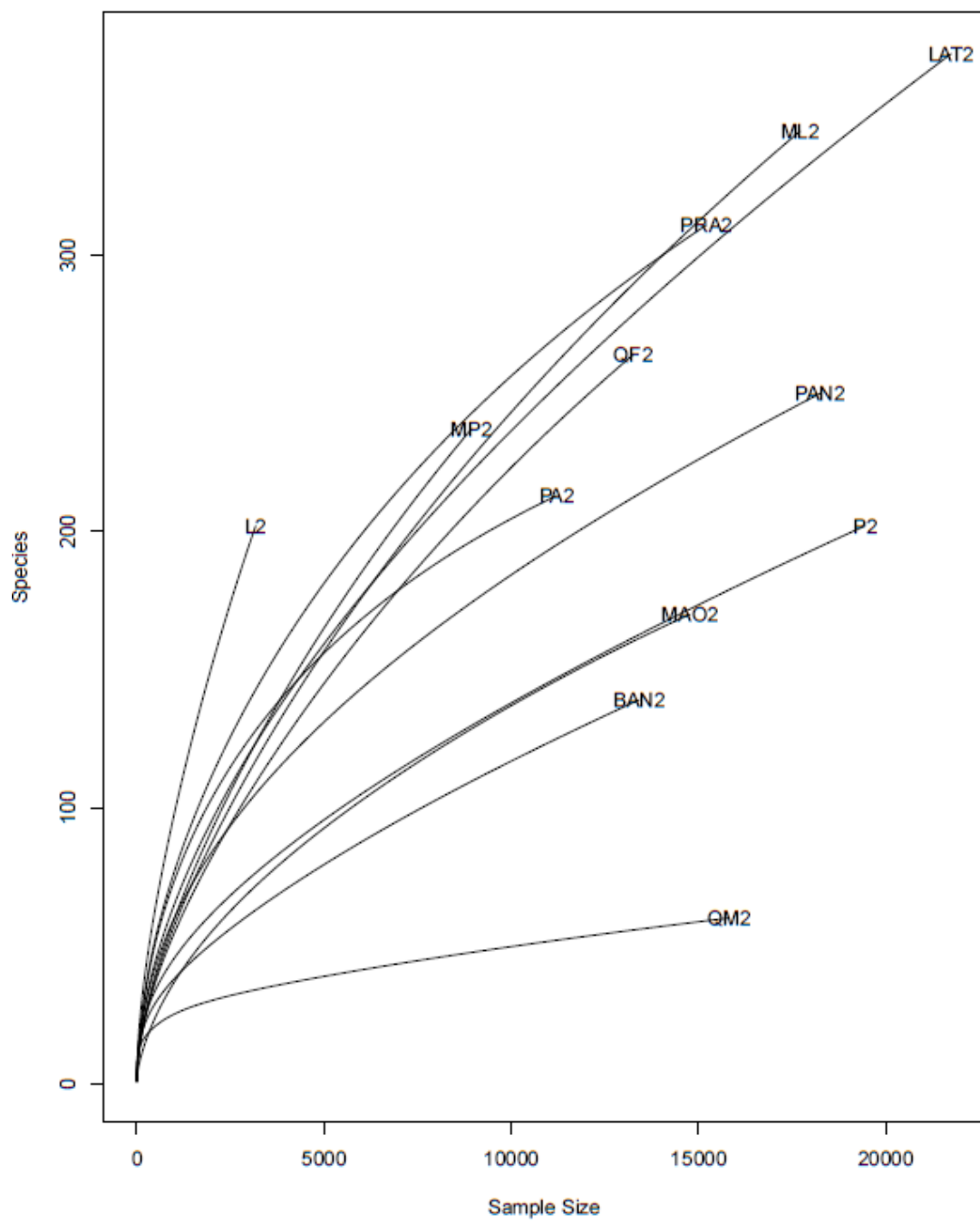


Figura 34. Curva de rarefação por produtor- Produtor 2

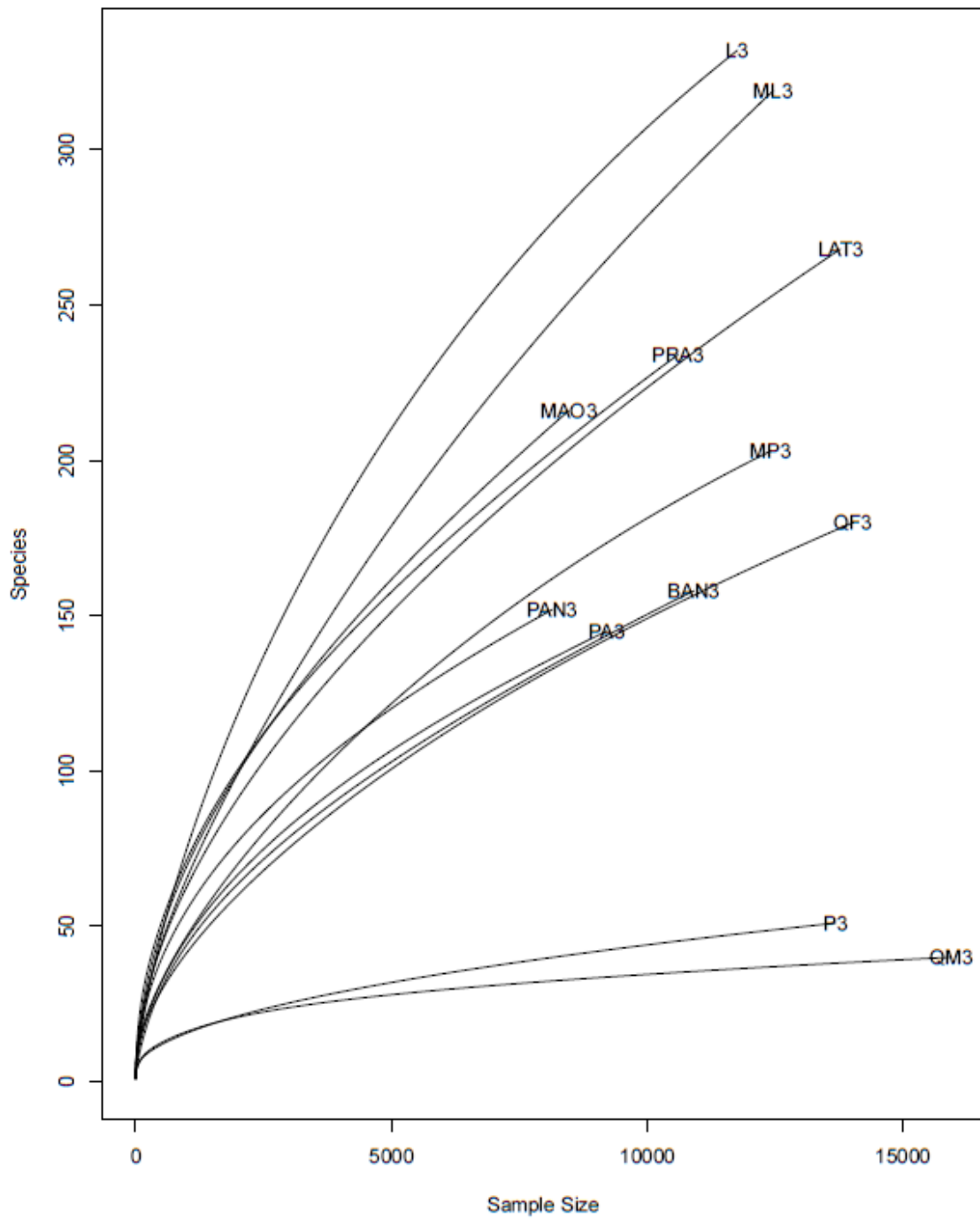


Figura 35. Curva de rarefação por produtor- Produtor 3

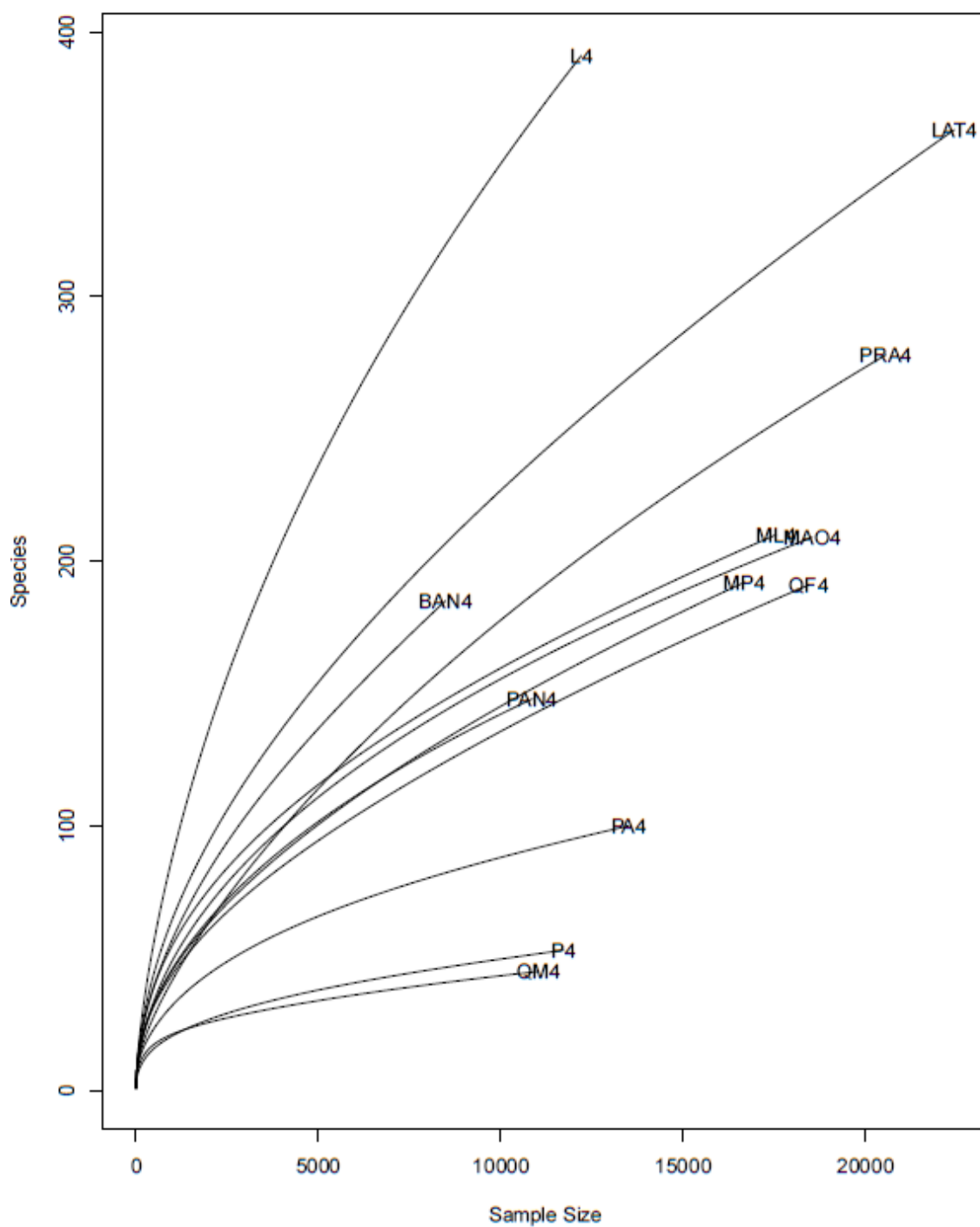


Figura 36. Curva de rarefação por produtor- Produtor 4

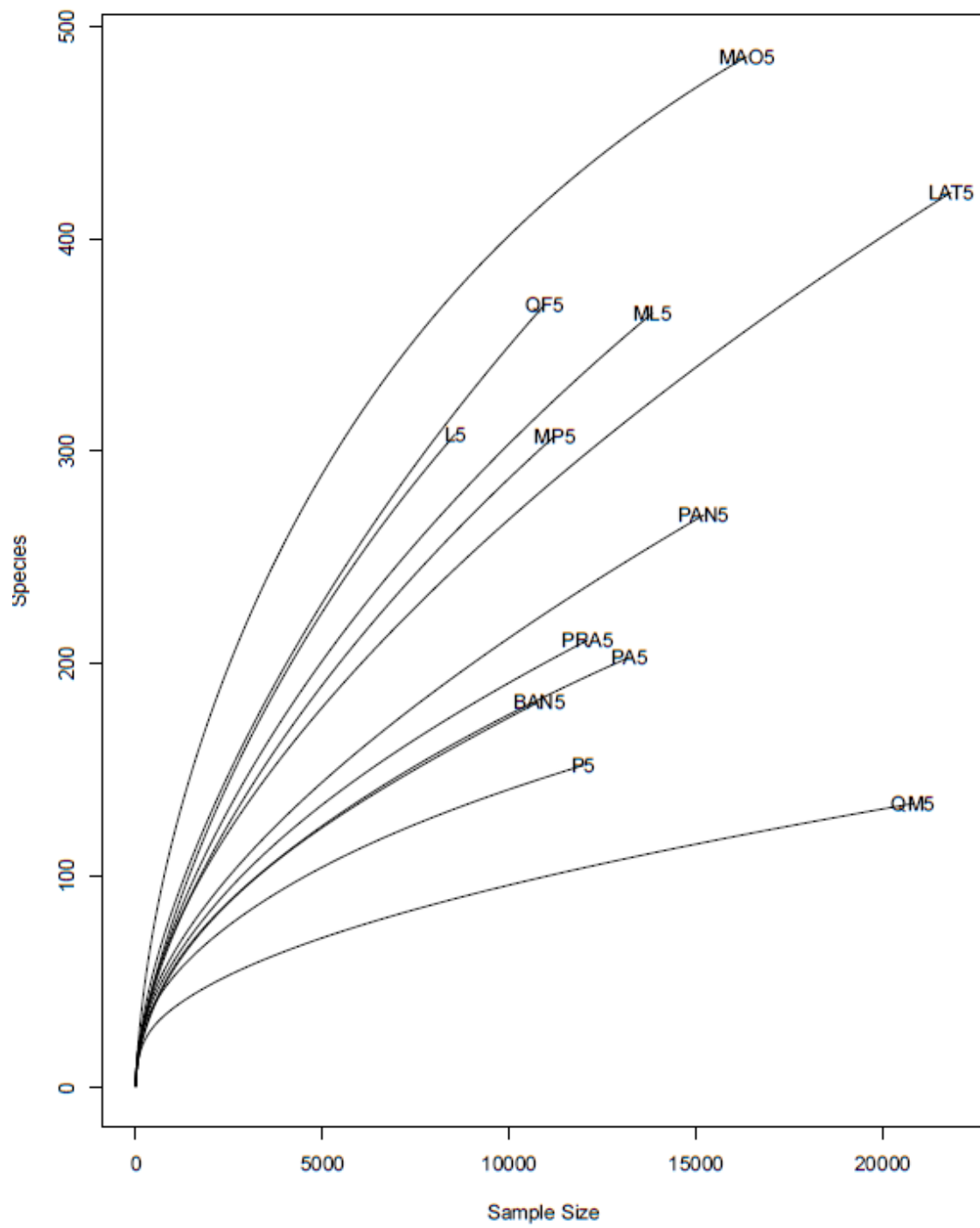


Figura 37. Curva de rarefação por produtor- Produtor 5

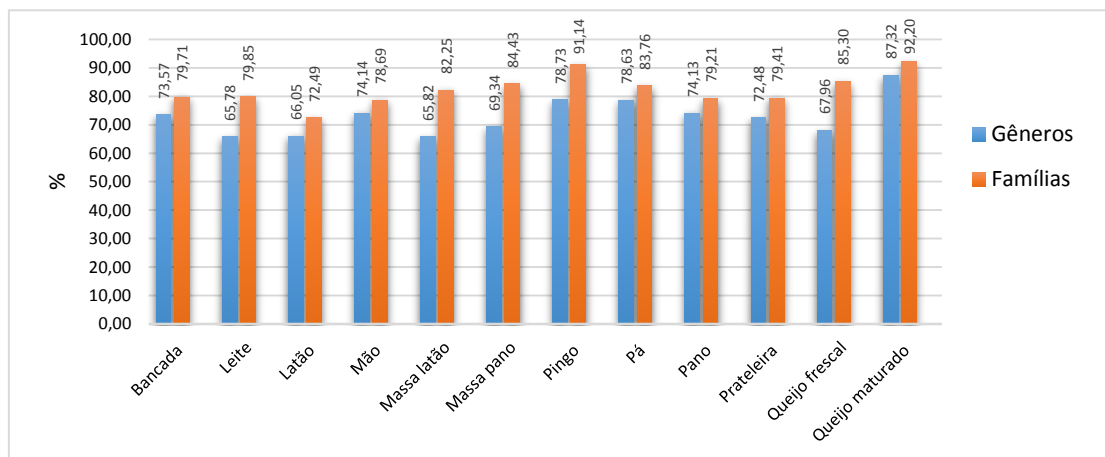


Figura 38: Porcentagem de OTUs identificadas por tipo de amostra.

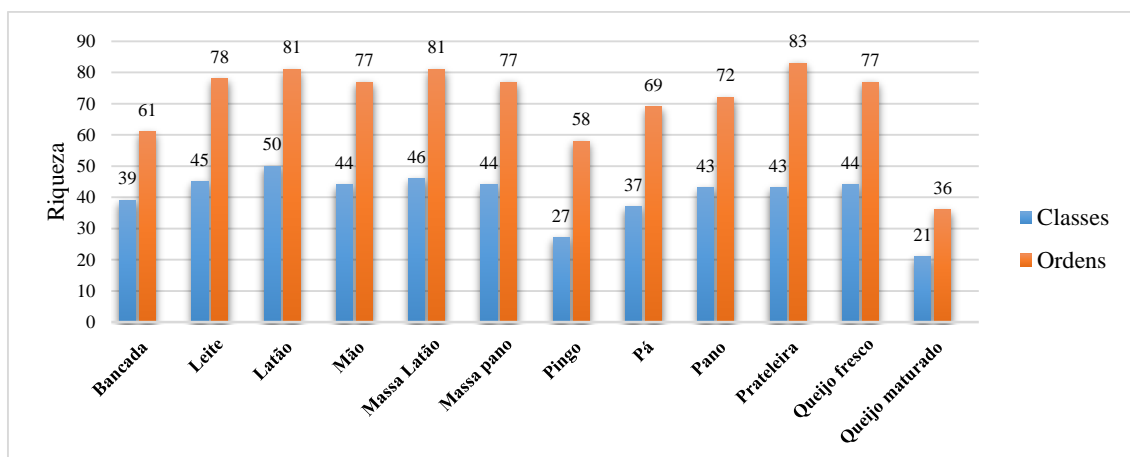


Figura 39: Número de classes e ordens identificadas por tipo de amostra

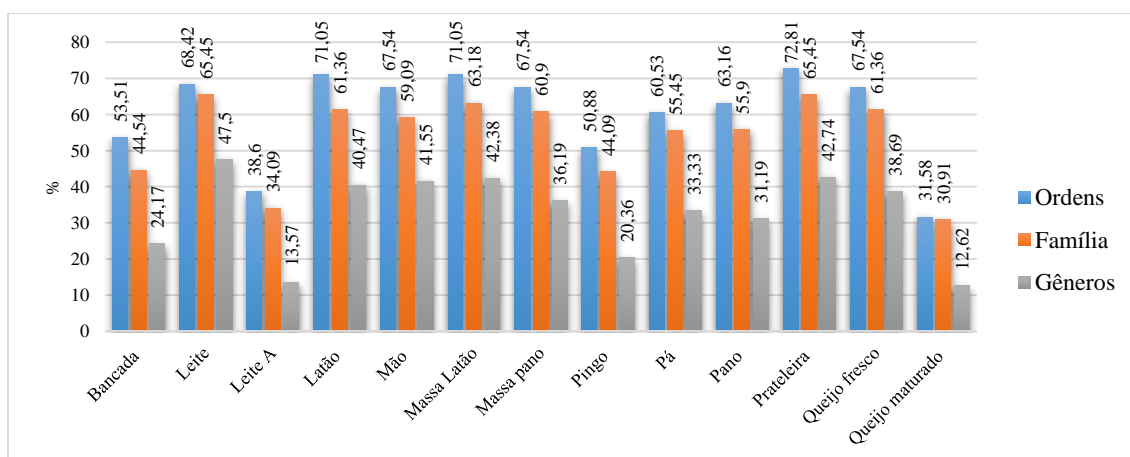


Figura 40: Porcentagens de ordens, famílias e gêneros identificados por tipo de amostra

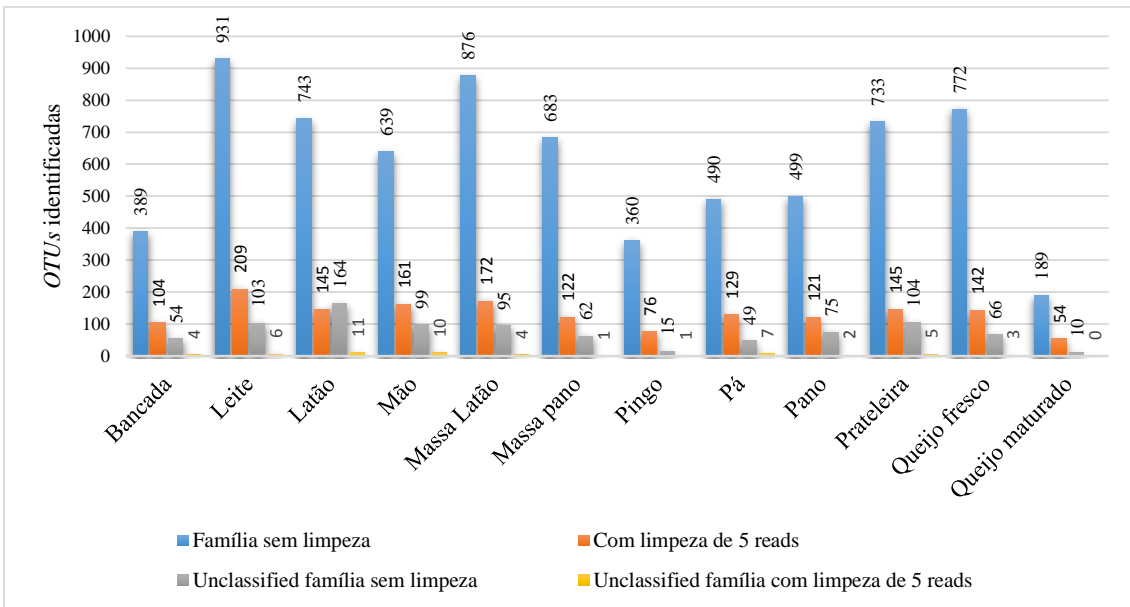


Figura 41: Distribuição de famílias por amostra sem limpeza e com limpeza de 5 reads

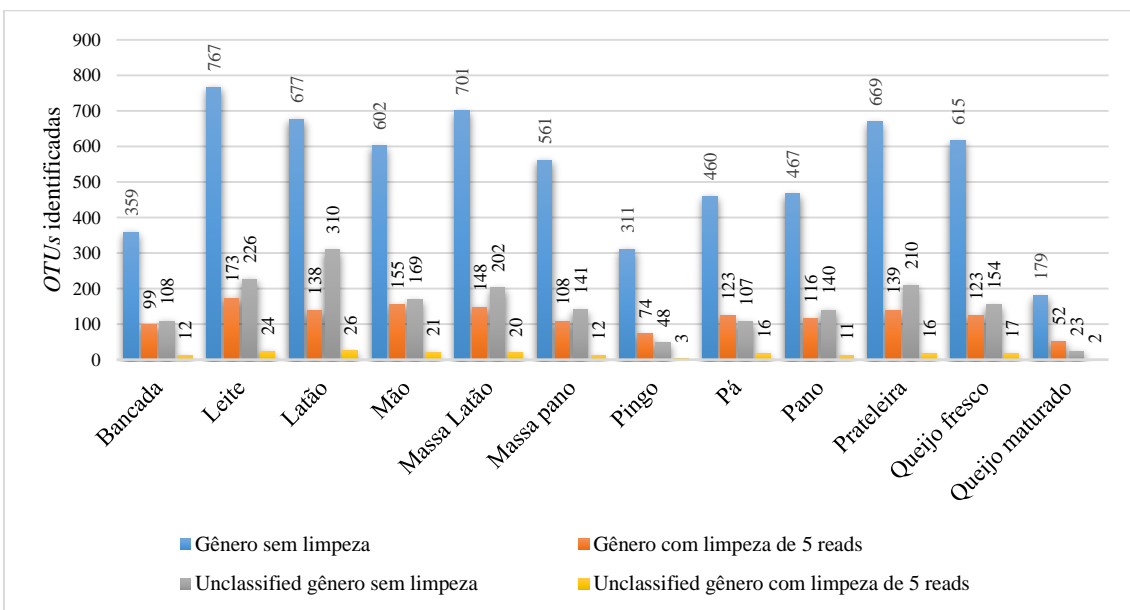


Figura 42: Distribuição de gêneros por amostra sem limpeza e com limpeza de 5 reads