

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NAS PRINCIPAIS
FASES DE PRODUÇÃO DE QUEIJO COLONIAL E DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ALGUMAS ENZIMAS LÍTICAS**

PRISCILLA VIEIRA DE SOUZA

Orientador: Prof^(a) Marisa da Costa

Porto Alegre

Junho/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NAS PRINCIPAIS
FASES DE PRODUÇÃO DE QUEIJO COLONIAL E DETERMINAÇÃO DA
CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ALGUMAS ENZIMAS LÍTICAS**

Priscilla Vieira de Souza
Bacharel em Biomedicina

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia de
alimentos.

Orientador(a): Prof^(a). Marisa da Costa

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Junho/2017.

“É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe”

Epicteto

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer à minha orientadora prof Marisa da Costa, pelo acolhimento, pela paciência, dedicação e todos ensinamentos que me passou neste período de dois anos. Meu respeito, gratidão e admiração pelo exemplo de profissional que és.

Aos meus pais pela educação e por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos e estudar sempre.

Aos colegas de laboratório, em especial aos amigos Christopher Yerena e Mauricio Ramírez, pela ajuda em momentos de aperto.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela contribuição para meu aprendizado e crescimento pessoal.

À colega Cristina Bergmann Zaffari pela parceria por ter concedido as amostras e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Fabiano Barreto coordenador do Laboratório de resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários, pelo tempo dedicado e auxílio na identificação das cepas com o método de MALDI-TOF.

Aos meus melhores amigos Adelita Pimentel Aguir e Fábio Schorn por todos os anos de amizade, pela paciência e por sempre torcerem para o meu melhor, esta conquista é nossa!

Às professoras Mercedes Passos Geimba (DeMIP-ICBS), Marjo Cadó Bessa (PUC-RS) e Patricia Valente da Silva (PPGMAA), membros da banca, pela gentileza de terem aceito participar da avaliação do meu trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NAS PRINCIPAIS FASES DE PRODUÇÃO DE QUEIJO COLONIAL E DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ALGUMAS ENZIMAS LÍTICAS

Autor: Priscilla Vieira de Souza

Orientador(a): Prof^(a). Marisa da Costa

RESUMO

Queijo é o nome genérico para um produto alimentar que é resultado da fermentação láctica do leite. Durante o processo de maturação do queijo, é necessária a presença de diversos microrganismos como bactérias e fungos, que contribuem de forma positiva ou negativa, por meio da liberação das suas enzimas. O objetivo do trabalho foi identificar bactérias e leveduras isoladas em algumas etapas de produção de queijo colonial e avaliar a capacidade de produção de enzimas líticas por estes microrganismos. Foram analisadas 60 amostras de bactérias e 24 de leveduras isoladas em trabalho anterior. Os microrganismos foram identificados por MALDI-TOF e/ou sequenciamento do gene RNA16S ou região ITS. A espécie bacteriana que predominou nas amostras foi *Lactococcus lactis* e as leveduras identificadas em maior número foram *Candida guilliermondii*, *C. pararugosa* e *Trichosporon coremiiforme*. A maior atividade lítica dos microrganismos identificados foi na temperatura de 30° C. A maior diversidade de espécies foi verificada no leite *in natura* e no queijo pronto. Proporcionalmente foi verificado maior número de cepas com atividade de lipase pelas leveduras e maior atividade proteolítica pelas bactérias. As leveduras apresentaram maior porcentagem de formação de coágulo no Litmus Milk e na fermentação da lactose do que as bactérias. Menor atividade de caseínase e lipase foi observada a 5°C demonstrando a importância da refrigeração no controle da atividade microbiana.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Junho/2017.

IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS PRESENT IN THE MAIN STAGES OF COLONIAL CHEESE PRODUCTION AND DETERMINATION OF THE PRODUCTION CAPACITY OF SOME LYTIC ENZYMES

Author: Priscilla Vieira de Souza

Advisor: Prof^(a). Marisa da Costa

ABSTRACT

Cheese is the generic name for a food resulting from milk fermentation. During the cheese maturation process, there are a variety of microorganisms such as bacteria and fungi, which contribute in a positive or negative manner by the releasing of its enzymes. The objective of this work was to identify bacteria and yeasts isolated in some stages of production of Colonial cheese and verify their hability for the production of lytic enzymes. A total of 60 bacteria and 24 yeasts collected in a previous work were analyzed. The microorganisms were identified by MALDI-TOF and/or 16SRNA or ITS genes sequencing. The bacterium *Lactococcus lactis* was the species most predominant in the samples and *Candida guilliermondii*, *C. pararugosa* and *Trichosporon coremiiforme* were the most frequent yeasts identified. The highest lytic activity was observed at 30° C for bacteria and yeasts. A greater diversity of species was verified inrow milk and in cheese ready to eat. Yeasts showed more hability to lipase activity, and proteolytic activity was higher within bacteria. Yeasts had the highest percentage of clot formation in Litmus Milk and fermentation of lactose than bacteria. Lower proteinase and lipase activity was observed at 5°C demonstrating a refrigeration to control microbial activity.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Jun, 2017.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	OBJETIVOS	03
2.1	Objetivo Geral	03
2.2	Objetivo Específico 1	03
2.3	Objetivo Específico 2	03
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1	Leite	04
3.2	Queijo	07
3.2.1	História do Queijo	07
3.2.2	Definição e Classificação	08
3.2.3	Queijo Colonial	09
3.3	Bactérias Mesófilas, Psicrotróficas, Leveduras e o Queijo	10
3.4	Atividade Enzimática de Bactérias e de Leveduras Psicrotróficas	12
3.5	Métodos de Identificação de Microrganismos	14
3.5.1	Identificação Clássica	14
3.5.2	Identificação Molecular - MALDI-TOF	14
3.5.3	Identificação Molecular- Sequenciamento	15
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Isolados Microbianos	17
4.2	Cultivo à 5°C	17
4.3	Identificação de Bactérias e Leveduras	18
4.3.1	Testes Morfológicos, Bioquímicos e Fisiológicos	18
4.3.2	MALDI-TOF	18
4.3.3	Sequenciamento	19
4.3.3.1	Extração de DNA pelo método de fervura para bactérias	19
4.3.3.2	Extração de DNA com acetato de potássio para leveduras	19
4.3.3.3	PCR Bactérias Mesófilas e Psicrotróficas	20
4.3.3.4	PCR Leveduras	21
4.3.3.5	Eletroforese	21
4.3.3.6	Purificação dos amplificadores	21

4.3.3.7	Sequenciamento das bactérias e leveduras.....	22
4.4	Testes para detecção de produção de enzimas liticas.....	22
4.4.1	Teste da Lipase.....	23
4.4.2	Teste da Caseinase	23
4.4.3	Teste da DNase.....	23
4.4.4	Teste do Litmus Milk	24
4.4.5	Fermentação da Lactose.....	24
4.4.6	Teste da Lecitinase	24
4.5	Análise dos dados	24
4.6	Descarte de Resíduos	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Identificação dos Isolados	26
5.2	Verificação do crescimento das cepas isoladas sob refrigeração	33
5.3	Determinação da capacidade de produção de enzimas liticas.....	35
5.3.1	Lipólise	35
5.3.2	Proteólise	38
5.3.3	Teste do Litmus Milk	41
5.3.4	Teste de Fermentação da Lactose.....	43
6.	CONCLUSÕES	45
7.	REFERÊNCIAS.....	46
8.	APÊNDICES	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de espécies de bactérias Gram-positivas encontradas em cada etapa de produção do queijo colonial utilizando MALDI-TOF e/ou sequenciamento do RNA 16S	27
Tabela 2. Identificação de espécies de bactérias Gram-negativas encontradas em cada etapa de produção do queijo colonial utilizando MALDI-TOF e/ou sequenciamento do RNA 16S	27
Tabela 3. Identificação de espécies de leveduras encontradas em cada etapa de produção do queijo colonial utilizando MALDI-TOF e/ou sequenciamento da região ITS.	29
Tabela 4. Bactérias e leveduras que cresceram sob refrigeração.	34
Tabela 5. Bactérias e leveduras positivas no teste da Lipase somente a 30°C.	37
Tabela 6. Bactérias e leveduras positivas no teste da Lipase somente na temperatura de 5°C.	37
Tabela 7. Bactérias positivas no teste da Lipase em ambas temperaturas (5 e 30°C).	38
Tabela 8. Bactérias e leveduras positivas no teste da caseína somente a 30°C.	40
Tabela 9. Bactérias positivas no teste da caseína em ambas temperaturas (5 e 30°C).	40
Tabela 10. Bactérias e leveduras no Litmus Milk a 30°C.	42
Tabela 11. Bactérias e leveduras positivas no teste de fermentação da lactose a 30°C.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de cérebro e coração
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid”
GYP	Glicose, extrato de levedura e peptona.
HCl	Ácido Clorídrico
IN	Instrução Normativa
ITS	“Internal Transcribed Spacer”
MALDI-TOF	“Matrix-assisted laser desorption/ionization”
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
PCA	Ágar contagem em placas “ágar plate count”
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase- Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Rio Grande do Sul
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Taq	Enzima Taq polimerase
TRIS HCl	Tris(Hidroximetil)Aminometano
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO

Utilizar o leite de alta qualidade, tanto microbiologicamente como quimicamente, é essencial para a fabricação de um queijo também de boa qualidade (ICMSF, 2005). E um dos fatores determinante da taxa de crescimento bacteriano no leite não refrigerado é a temperatura (LÓPEZ et al., 2014). Os principais microrganismos predominantes são os aeróbios mesófilos, responsáveis pela fermentação da lactose e a capacidade de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes (IZIDORO et al., 2013; MONTEL et al., 2014). A proteólise do leite também pode ocorrer através da atividade de proteases naturais, afetando negativamente o processo de produção de queijos (COELHO et al., 2012). Outro grupo de bactérias envolvidas com contaminação do leite são as psicrotróficas. As psicrotróficas, por definição, são mesófilas capazes de se multiplicar em baixas temperaturas. A contaminação do leite por bactérias psicrotróficas é considerada o fator mais crítico e que influencia na manutenção da qualidade do leite refrigerado (IZIDORO et al., 2013). As superfícies dos tetos e os equipamentos de ordenha são as principais fontes de psicrotróficos no leite durante a sua produção. Durante o crescimento de bactérias psicrotróficas presentes no leite pode ocorrer a fermentação de carboidratos e/ou a degradação de proteínas e lipídeos (NORNBERG et al., 2009).

Leveduras também aparecem como contaminantes comuns em leite cru. Suas características como tolerância em baixo pH, altas concentrações de sal e a capacidade de crescer em ácidos orgânicos explicam a sua ocorrência em queijos (VASEK et al., 2013). A presença de leveduras intensamente proteolíticas pode resultar em queijos malcheirosos que lembram o cheiro de ovos podres e é frequentemente associada com a presença de pontos brancos na superfície dos queijos (MELVILLE et al., 2011). A atividade lipolítica pode levar à formação de sabores e aroma de ranço devido à presença de ácidos graxos livres (BORELLI et al., 2006). O tempo de vida de prateleira de queijos e o surgimento de alterações neste produto podem ser afetados pela presença dos fatores citados acima, em maior ou menor grau (COELHO et al., 2012; IZIDORO

et al., 2013; AYDEMIR et al., 2015).

No Brasil já foram feitos alguns estudos que mostraram altas contagens de bactérias mesófilas em leite cru, ou seja, antes da produção do queijo (PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2008). No entanto ainda não há nenhum trabalho que fale sobre a presença e características destas bactérias e leveduras em queijo Colonial, que é um queijo produzido nas áreas rurais do Rio Grande do Sul. A microbiota presente em um alimento influencia no desenvolvimento das características organolépticas do produto final. Este trabalho visa conhecer qual a microbiota (bacteriana e leveduriforme) aeróbia mesófila presente nas principais etapas de produção do queijo colonial, bem como a verificação da capacidade de produção de enzimas por estes microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar isolados de bactérias e leveduras, isoladas em trabalho anterior, presentes nas principais fases da produção de queijo colonial e a capacidade de produção de enzimas líticas.

2.2 Específico 1

Identificar as bactérias e leveduras isoladas nas principais fases de produção do queijo colonial.

2.3 Específico 2

Testar a capacidade de produção de enzimas das bactérias e leveduras identificadas nas temperaturas de 5 e 30°C.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de animais sadios, bem alimentados e descansados (BRASIL, 2011). O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto, em média, por 87% de água e 13% de sólidos totais, distribuídos da seguinte forma: 3% a 3,5% de proteínas totais, 3,5% a 4% de gordura, 5% de lactose, além de 0,7% de minerais e vitaminas (MONTANHINI, 2012). Assim o leite é um substrato rico tornando-se ideal para o crescimento de microrganismos e, sob boas condições de conservação e manipulação, a microbiota predominante é Gram-positiva (MENEZES et al., 2014). A microbiota intrínseca do leite gira em torno de 10^3 unidades formadoras de colônia (UFC/mL), é proveniente do úbere, dos canais de leite da vaca e, também, dos equipamentos utilizados durante a produção. A diversidade e quantidade de microrganismos encontrados no leite e seus derivados também é o reflexo dos cuidados de higiene ao longo de todo processo produtivo (SANTOS, 2007). Bactérias, fungos e vírus são os principais microrganismos envolvidos com a contaminação do leite. Dois grandes grupos de bactérias podem se desenvolver no leite: as mesófilas e as psicotróficas.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com o objetivo de melhorar a qualidade do leite no país e aumentar as exportações de produtos lácteos, publicou inicialmente a Instrução Normativa (IN) 51, em 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002) que regulamenta a identidade e qualidade do leite cru refrigerado. A IN 51 foi alterada e complementada pela IN 62, de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011). A IN62/2011 regulamentou a produção, identidade e qualidade do Leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado, além de regulamentar a coleta e transporte de leite cru. O leite cru deve ser mantido refrigerado na propriedade rural e deve atingir a temperatura de 4°C em tanques de expansão ou 7°C em tanques de imersão, em um período não superior à 3h

após o término da ordenha. A permanência do leite nas propriedades poderá ser de, no máximo, 48h, sendo recomendado como ideal um período de tempo não superior a 24h. O leite deve ser coletado em caminhões providos de tanques isotérmicos e encaminhado aos estabelecimentos industriais para o processamento. Neste tocante, permite-se que o leite cru refrigerado sofra uma oscilação de até 3°C da temperatura original, não sendo permitido que ultrapasse 10°C ao ser recebido na plataforma de recepção da indústria (BRASIL, 2011). Todo este cuidado na refrigeração do leite após a ordenha tem como objetivo diminuir a multiplicação de microrganismos aeróbios mesófilos que podem apresentar atividade enzimática, causando a modificação dos constituintes do leite, principalmente pela fermentação da lactose (LUIZ et al., 2010). No entanto, estocar o leite em baixas temperaturas favorece o crescimento de outro grupo de microrganismos, os psicotróficos, que se desenvolvem muito bem na faixa dos mesófilos, de 20 a 45°C, mas também são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (TONDO & BARTZ, 2011).

A deterioração do leite ocorre devido à liberação e atividade das enzimas líticas, como as lipases e proteases (LÓPEZ et al., 2014). As lipases, por exemplo, possuem a capacidade de hidrolisar os triglicerídeos constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, como o capríco, butírico, cáprico e caprílico, que são responsáveis pela rancificação de queijos e formação de odores desagradáveis no leite (AYDEMIR et al., 2015). Produtores de queijo enfrentam diversos problemas de perdas de rendimento em decorrência da atividade de proteases bacterianas e de fermentação da lactose (TOFALO et al., 2015).

Segundo Izidoro et al. (2013), entre as enzimas produzidas por psicotróficos, as lipases são consideradas mais importantes que as proteases no que diz respeito à alteração de sabor e odor em queijos. Isso ocorre porque essas enzimas são insolúveis em água, sendo assim elas são absorvidas pelas moléculas de gordura, ficando retidas na massa do queijo, enquanto as proteases são solúveis e acabam sendo perdidas no soro do leite. Outra influência das enzimas liberadas pelas bactérias psicotróficas é que podem afetar a produção de queijos, modificando a taxa de fermentação das bactérias

láticas (AYDEMIR et al., 2015). A ação das proteases pode, em alguns casos, aumentar os teores de aminoácidos e peptídeos, estimulando assim o crescimento das bactérias láticas (PINTO et al., 2006). Desta maneira, se amostras de leite cru forem mantidas sob refrigeração por longos períodos de estocagem, o controle destas bactérias psicotróficas é muito mais importante na matéria prima, do que após o processamento (ARCURI et al., 2008).

Moreira & Montanhini (2014) verificaram a contaminação do leite na ordenha por microrganismos proteolíticos e lipolíticos e constataram que 44% das cepas isoladas apresentaram atividade lipolítica, enquanto 11% das cepas apresentaram atividade proteolítica. Sabe-se que a presença dessas enzimas no leite cru influencia diretamente na qualidade do produto final, pois as mesmas geram alterações de cor e odor no leite, perda da consistência pela formação do coágulo para fabricação de queijos e a geleificação do leite longa vida (CHEN et al., 2003; NORBERG et al., 2009). Segundo Aydemir et al. (2015), durante o processamento do queijo tanto psicotróficos como os mesófilos presentes na matéria prima e insumos adicionados influenciam na maturação do queijo pela produção das enzimas líticas. Esta atividade enzimática dependerá da composição do queijo e insumos, da microbiota inicial (quantidade e tipos microbianos), do pH, da temperatura e do tempo de exposição.

A contaminação do leite por fungos pode representar um risco para o consumidor, além dos reflexos negativos na produção de subprodutos que também devem ser considerados (SPANAMBERG et al., 2009). Isso porque alterações nas características físicas e organolépticas podem influenciar na qualidade e no tempo de prateleira dos derivados lácteos (FLEET, 1990). É importante salientar a ação das leveduras como organismos de deterioração de alimentos, principalmente em leites fermentados e queijos (FERREIRA & VILJOEN, 2003). Os problemas mais comumente causados por leveduras são produção de gás, descolorações, alteração no sabor e flavor e mudanças na textura (GKATZIONIS et al., 2014). A adição de ingredientes em alguns derivados lácteos como açúcar, frutas, xaropes e outros produtos constituem um substrato nutritivo para o crescimento destes microrganismos (CEUGNIEZ et al.,

2015). Por outro lado, sabe-se que a presença destes microrganismos é de fundamental importância durante as etapas de produção de queijos, pois contribuem no processo de maturação e desenvolvimento de sabor (GKATZIONIS et al., 2014).

Vários estudos já avaliaram a presença de fungos em leite, encontrando uma diversidade de espécies como *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Geotrichum* sp., *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia* sp., *Pichia guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp. (SPANEMBERG et al., 2004; BAI et al., 2010; AL-OTAIBI, 2012; QVIRIST et al., 2016).

3.2 Queijo

3.2.1 História do queijo

O queijo é um dos alimentos mais antigos registrados em toda história da humanidade. A arte da fabricação de queijos teve o seu início há milhares de anos antes do nascimento de Cristo (FOX et al., 2004 apud PAULA et al., 2009). Acredita-se que o queijo tenha surgido no Iraque, em torno de 8000 anos atrás, após várias tentativas de armazenar o leite por longos períodos (ICMSF, 2005). Os egípcios estão entre os primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram no leite e no queijo fonte importante de sua alimentação (PERRY, 2004).

No Brasil, o queijo chegou no século 18, na região de Serro Frio, Minas Gerais, na tentativa dos portugueses de obter um alimento igual ao tipo Serra, comum em Portugal. Eles utilizaram leite de vaca ao invés de leite de ovelhas e assim surgiu o famoso Queijo de Minas. O queijo então ganhou destaque e, de Minas Gerais para os outros estados do Brasil, hoje são produzidas mais de 700 variedades (PERRY, 2004). Segundo Montel (2014) independente de como é feito, o queijo é um produto em constante modificação, a qual está relacionada com uma comunidade microbiana cuja atividade afeta e influencia o queijo pelas mudanças químicas. A adição de culturas “starters” no queijo auxilia também na produção de compostos diacetil, que influenciam no

sabor e aroma do queijo. A presença de outros microrganismos durante o processo de produção também irá influenciar e trazer características que serão próprias para cada tipo de queijo (HASSAN & FRANK, 2001).

3.2.2 Definição e Classificação

Queijo é o nome genérico para um produto alimentar fermentado à base de leite, produzido de diversas formas e diferentes sabores em todo mundo (FOX et al., 2004). De acordo com a Portaria nº 73/90 (BRASIL, 1990) queijo é o produto fresco ou curado, de consistência variável, obtido por coagulação e dessoramento do leite ou do leite total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído e, também, da nata, do leite, bem como da mistura de alguns ou de todos estes produtos, incluindo o lactosoro, sem ou com adição de outros gêneros alimentícios. Esta Portaria estabelece ainda a classificação dos queijos e determina os ingredientes que podem ser adicionados durante a sua fabricação. De acordo com Fox et al. (2004), o processo de fabricação do queijo pode ser dividido em diversas etapas:

- Transformação do leite cru ou pasteurizado em coalhada fresca por acidificação: adição de culturas comerciais de bactérias ácido lácticas;
- Coagulação: precipitação da caseína;
- Desidratação: retirada do soro;
- Molde: colocação em formas;
- Salga: adição da salmoura;
- Maturação: etapa onde se dá o desenvolvimento das características do queijo que está sendo produzido.

As características sensoriais da maioria dos queijos são resultado da fermentação do leite (PAULA et al., 2009). Sendo assim, durante o processo de maturação do queijo é necessária a presença de diversos microrganismos, como bactérias, bolores e leveduras, que contribuem de forma positiva durante o processo, através da liberação das suas enzimas (MONTEL et al., 2014). As

leveduras podem desempenhar um papel benéfico conferindo sabor durante o amadurecimento na produção de queijos. Todavia sua presença também pode causar a deterioração do produto, alterando sabor, textura e a coloração se o número de microrganismos e condições de manufatura não forem controlados (GALINARI et al., 2014).

3.2.3 Queijo Colonial

O queijo Colonial é um produto artesanal produzido no sul do Brasil. É uma prática comum a produção informal de queijos nas propriedades rurais e sua qualidade microbiológica tem sido pesquisada (SCHMITT et al., 2011). O caráter informal deste tipo de produção, na maioria dos casos não contempla as exigências sanitárias vigentes e o leite utilizado para produzir estes queijos pode inclusive não sofrer tratamento térmico (OLIVEIRA et al., 2012). Além do risco de doenças, a presença de microrganismos de origens diversas pode resultar em alterações físico-químicas no produto, influenciando na eficiência dos processos utilizados no seu beneficiamento e nas suas características sensoriais (MARTINS & REIS, 2012).

Em um estudo feito por Zegarra et al. (2009), foram demonstradas as condições precárias de higiene em que o queijo era produzido nas propriedades estudadas. *E. coli* foi isolada em contagens acima da legislação em diferentes etapas da produção, incluindo leite e queijo, indicando que a contaminação pode ter ocorrido antes, durante ou após a produção. A presença deste microrganismo no queijo, tem significado relevante, uma vez que as bactérias do grupo coliforme, além de responsáveis por toxinfecções, são consideradas como os principais agentes associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce (ALMEIDA & FRANCO, 2003). Não existem estudos que mostrem qual é a microbiota presente no queijo colonial e que tipo de atividade estes microrganismos podem produzir ao longo das etapas de produção do mesmo.

3.3 Bactérias Mesófilas, Psicotróficas, Leveduras e o Queijo

A microbiota do queijo é muito variada, tanto entre diferentes tipos como dentro de um mesmo tipo de queijo, e ela está diretamente relacionada com a microbiota do leite e do ambiente no qual o queijo é produzido (PAULA et al., 2009).

A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos é usada como indicador da população bacteriana presente em uma amostra, em temperaturas de incubação entre 15 e 45°C, com temperatura média de 36°C (TONDO & BARTZ, 2011). A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos indica se a limpeza, desinfecção e o controle de temperatura durante os processos de tratamento, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada, e é um dos indicadores microbiológicos de qualidade mais comumente utilizado (ICMSF, 1982). Os problemas com a produção de queijos artesanais no Brasil estão relacionados com as condições precárias do leite produzido, das inadequadas condições de fabricação e da inexistência ou ineficácia do sistema de refrigeração ao longo desta cadeia produtiva. Estas condições agravam a situação e criam condições de desenvolvimento e contaminação de microrganismos em diferentes etapas (SCHIMITT et al., 2011). Melo et al. (2009) avaliaram a qualidade microbiológica do queijo tipo minas e observaram que o produto testado apresentou uma elevada população de bactérias aeróbias mesófilas. Este resultado demonstrou a condição higiênico-sanitária insatisfatória do ambiente no qual este queijo foi produzido. Zaffari et al. (2007) também avaliaram a qualidade bacteriológica de queijos artesanais. Das amostras analisadas, todas apresentaram contagens de coliformes 35°C acima da legislação. Um total de 84% das amostras apresentou contagens de coliformes a 45°C acima do previsto como limite máximo a ser encontrado em queijos. Também isolaram *Listeria monocytogenes* de alguns queijos. A presença destes microrganismos constitui perigo de infecção aos consumidores.

Psicotróficos são microrganismos capazes de se desenvolver em temperaturas inferiores a 7°C (TONDO & BARTZ, 2011). A maioria desses microrganismos é mesófilo (apresentam temperatura ótima de multiplicação ente

20 e 30°C) capazes de se adaptar ao frio através da alteração do seu metabolismo (MONTANHINI, 2012). *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. são as bactérias mais envolvidas na alteração do leite e seus derivados, por apresentarem cepas psicotróficas e produtoras de enzimas termorresistentes (COSTA et al., 2001; AIRES et al., 2009; BAGLINIÈRE et al., 2012). Decimo et al. (2014) estudaram 80 cepas bacterianas psicotróficas isoladas de diferentes leites de tanques a granel do noroeste da Itália, destinadas à produção de queijo Grana Padano. *Pseudomonas* sp. foram os contaminantes mais comuns, sendo *P. fluorescens* a espécie isolada predominante, juntamente com Enterobactérias, principalmente *Serratia marcescens*. Das 80 amostras analisadas, 50% das cepas psicotróficas apresentaram alguma atividade enzimática. A atividade lipolítica foi mais predominante, seguido de atividades proteolíticas e lecitinases. A presença de bactérias psicotróficas no leite têm sido motivo de crescente preocupação para indústria de produtos lácteos, devido aos prejuízos econômicos e aspectos anti-tecnológicos que estas bactérias e suas enzimas causam no produto e seus derivados (PINTO et al., 2006).

As leveduras são contaminantes naturais encontrados no queijo, em superfícies molhadas, leite derramado e soro. A maior fonte é a salmoura cuja qualidade é de fundamental importância, tendo em vista que pode constituir-se também como uma fonte de contaminação (LISITA, 2005). Assim, queijos tratados em salmouras são os mais suscetíveis ao desenvolvimento de leveduras (ZACARCHENCO et al., 2011).

Almeida et al. (2011) avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas de leveduras isoladas de queijo coalho. A espécie *Issatchenkia orientalis* foi isolada com maior frequência dos queijos fabricados com leite cru, seguido das espécies *Yarrowia lipolytica* e *Geotrichum candidum*, isolados de queijos produzidos com leite pasteurizado. Amostras de *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia* e *Kodamaea ohmeri* também foram isoladas. *Yarrowia lipolytica* apresentou-se como melhor produtora de enzimas lipolíticas e proteolíticas.

3.4 Atividade enzimática de bactérias e de leveduras psicrotróficas

O processo de fabricação do queijo começa com a seleção química e microbiológica do leite (GONZÁLEZ et al., 2016). Para a obtenção de um produto adequado é primordial que o leite escolhido seja de boa qualidade e livre de antimicrobianos (CALAMARI et al., 2015). A armazenagem sob refrigeração de leite cru antes do tratamento térmico na indústria de laticínios pode promover o crescimento de microrganismos psicrotróficos, que são conhecidos por sua capacidade de produzir enzimas termorresistentes (proteases e lipases) que afetam a eficiência de utilização do leite e a qualidade dos produtos fabricados (MACHADO et al., 2016). As atividades enzimáticas estão diretamente relacionadas com a microbiota do leite, das bactérias presentes na cultura *starter* e dos microrganismos que serão inclusos por contaminação ao longo do processo de produção. A importância destas atividades enzimáticas estará relacionada à quantidade de determinados microrganismos, sua capacidade de crescimento e utilização dos componentes do leite. Esta atividade pode ser benéfica, auxiliando a maturação e produzindo sabor e odor característicos, bem como deletéria, se predominarem as atividades que possam modificar sabor e/ou odor do produto (ÂNGELO et al., 2014). Muitas destas enzimas são produzidas por *Pseudomonas fluorescens*, uma bactéria psicrotrófica frequentemente encontrada no leite (BAGLINIÈRE et al., 2012). Como as enzimas hidrolíticas desta bactéria geralmente não são inativadas pela pasteurização ou mesmo pelo tratamento à temperatura ultraelevada (UHT), sua presença pode causar graves problemas na indústria de laticínios. Por exemplo, causando o desenvolvimento de sabores estranhos e a hidrólise de proteínas do leite. Isso resulta na diminuição de rendimento durante a produção do queijo, redução de prazo de validade, perda de estabilidade ao calor e geleificação de leite UHT, tornando assim estes alimentos inadequados para o consumo (BAGLINIÈRE et al., 2012; MACHADO et al., 2016). Entretanto o processo de formação do sabor de queijos é extremamente complexo e resulta de um equilíbrio entre os compostos do metabolismo da lactose, proteínas e lipídeos (YVON & RIJNEN, 2001). Os compostos oriundos destas reações podem originar sabores desejáveis ou

indesejáveis (SILVA et al., 2006).

As leveduras também podem contribuir para o desenvolvimento do sabor de queijos através da produção de etanol, etilacetato, acetaldeído e etil butirato, resultantes da fermentação da lactose (ŠURANSKÀ et al., 2016). Um número elevado de leveduras é observado em queijos e acredita-se fazer uma contribuição significativa para o processo de maturação (GKATZIONIS et al., 2014). Sua presença pode ser atribuída à capacidade da levedura de crescer a temperaturas baixas, podendo assimilar ácidos orgânicos, como ácido succínico, ácido láctico e ácido cítrico, produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas e resistir a elevadas concentrações de sal e à limpeza com alguns compostos sanitizantes (CEUGNIEZ et al., 2015). A origem destes microrganismos no queijo é complexa, elas aparecem como contaminantes naturais do ar, do leite cru, da água, da salga e das superfícies diversas de manipulação (MELVILLE et al., 2011). As leveduras crescem bem tanto nos estágios iniciais da fabricação, quanto no período de maturação (CEUGNIEZ et al., 2015). *Yarrowia lipolytica* é a espécie conhecida por sua forte atividade proteolítica e lipolítica, possui a capacidade de predominar sobre as leveduras que ocorrem naturalmente e é frequentemente encontrada em produtos lácteos (NAKAGAWA et al., 2004; CEUGNIEZ et al., 2015).

As bactérias que foram analisadas neste estudo foram isoladas de queijos e utensílios de duas empresas produtoras de queijo colonial (Zaffari, 2017). Elas foram obtidas de placas utilizadas para a contagem de bactérias e fungos mesófilos. E, na época, não foram identificadas, apenas isoladas e congeladas em glicerol para estudo posterior.

3.5 Métodos de Identificação de Microrganismos

3.5.1 Identificação Clássica

Existem técnicas convencionais de cultivo e isolamento de microrganismos que são comumente empregadas. Os métodos clássicos para

identificação de microrganismos baseiam-se em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. As características morfológicas (estruturais) fornecem dados como a forma, arranjo, presença de flagelo, tipo de parede, etc. Para cada tipo de microrganismo, existem diversos testes fisiológicos e/ou bioquímicos para sua identificação (KRIEG et al., 1986; MACFADDIN, 2000). A visualização e o cultivo são, em geral, as técnicas mais utilizadas para se realizar diagnóstico microbiológico por serem estas técnicas mais simples, requerem menor infraestrutura e possuem menor custo. A desvantagem destes métodos de identificação é que alguns microrganismos podem não estar viáveis e outros não cultiváveis, além do grande número de testes de identificação, da imprecisão e de problemas na interpretação, o que acaba favorecendo a chance de erro.

3.5.2 MALDI-TOF

O método diagnóstico MALDI-TOF tem se mostrado uma ferramenta padrão para a identificação microbiana, rápida e confiável. Ele consiste em uma técnica de espectrofotometria de massa, que detecta moléculas de massa maior, como as proteínas. O teste baseia-se na detecção de um grande espectro de proteínas, podendo então discriminar melhor as espécies (PASTERNAK, 2012; CALDERARO et al., 2014; KATO et al., 2016).

A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* e consiste em um sistema onde há uma placa com uma matriz polimérica na qual o material biológico é colocado. Esse material é irradiado com um laser onde haverá vaporização da amostra e ionização das moléculas, que são então aspiradas e levadas a um detector através de um tubo de vácuo. Conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente. Através de um gráfico que gera picos diferentes para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um gráfico específico. Estes dados obtidos através dos gráficos que representam estas leituras são comparados à uma base algorítmica que contém um grande número de espécies de relevância clínica, principalmente (BIZZINI, 2010; HRABÁK et al., 2013; KATO et al., 2016).

A vantagem deste método é que fornece uma identificação rápida com um mínimo de preparação da amostra, uma grande economia financeira e de tempo. Além disso, a técnica tem sido utilizada devido à sua capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas de biomoléculas e, ainda, por apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (KATO et al., 2016).

Por outro lado, o custo para obtenção do aparelho é elevado, e por vezes esta técnica exige a construção de uma biblioteca suplementar, tendo em vista que os bancos de dados comerciais possuem, na sua maioria, espectros de referência voltados a microrganismos de importância clínica.

3.5.3 Identificação Molecular

Desde a década de 80 tem sido possível estudar a ecologia e a diversidade de microrganismos por meio de técnicas de biologia molecular (ZILLI et al., 2003 apud AMANN et al., 2001). O princípio da identificação molecular é a aplicação de biomarcadores para detecção e identificação de microrganismos (HEAD et al., 1998). A identificação de espécies através do sequenciamento de DNA é a base para a taxonomia microbiana. A classificação de microrganismos tem sido empregada através da análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas (MUYZER, 1993). O RNA ribossomal é o biomarcador comumente utilizado por ser uma macromolécula altamente conservada entre as bactérias. O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S é considerado como método de referência de identificação bacteriana e tem sido usado com finalidade filogenética e taxonômica (WOESE, 1987).

No caso das leveduras, os genes do RNA18S e o gene RNA28S do são separados por regiões denominadas sequências internas transcritas, que separam estes dois genes. Estas regiões podem ser amplificadas com oligonucleotídeos específicos permitindo a análise de diferentes níveis taxonômicos (FUNGARO, 2000).

O sequenciamento de DNA é a etapa que permite a determinação da ordem das bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina na molécula de DNA. Em 1977, Maxam e Gilbert descreveram o sequenciamento de DNA pelo método de degradação química. Através de um processo químico que quebra a molécula de DNA em nucleotídeos específicos, o DNA pode ser sequenciado. Ainda em 1977, Sanger et al., descreveram um novo método para determinar as sequências de nucleotídeos do DNA utilizando a síntese enzimática de uma fita complementar, cujo crescimento é interrompido pela adição de dois análogos dos di-desoxinucleotídeos normais, que atuam como inibidores específicos da terminação da cadeia da DNA polimerase.

Como vantagem em relação aos métodos clássicos, os métodos moleculares são mais rápidos e precisos, porém mais caros. A desvantagem é que nem todos os microrganismos foram descritos, desta forma algumas espécies ainda não podem ser identificadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados Microbianos

Neste trabalho foram utilizados isolados bacterianos e de leveduras obtidas após quantificação de bactérias aeróbias mesófilas e leveduras em amostras das principais etapas de produção do queijo colonial (ZAFFARI et al., 2017).

Inicialmente havia 100 isolados de bactérias e 60 de leveduras que foram isoladas e mantidas congeladas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e glicerol 30% em temperatura de -20° C (ZAFFARI, 2017). Os isolados foram identificados com numeração de acordo com as coletas que foram realizadas. Destas, foram recuperadas e utilizados 60 isolados de bactérias e 24 de leveduras. A recuperação das bactérias foi feita por meio de cultivo inicial em caldo BHI (Kasvi) a 30°C e reisolamento de todas as cepas em ágar padrão para contagem (PCA Acumedia). As leveduras foram recuperadas em caldo GYP (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%) e reisolamento em ágar GYP (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%). Após o isolamento, todas as cepas foram testadas quanto à capacidade de crescimento a $\pm 5^{\circ}$ C, para identificação das cepas psicotróficas.

4.2 Cultivo à 5°C

As bactérias e leveduras foram semeadas em ágar PCA e GYP, respectivamente, e incubadas sob refrigeração à 5°C por 48h para verificação das cepas psicotróficas. Foi utilizada uma cepa controle de *Listeria* sp. (cepa isolada de presunto).

4.3 Identificação das Bactérias e Leveduras

As bactérias foram caracterizadas inicialmente por uma triagem utilizando-se os testes presuntivos de identificação clássica e após foi feita a identificação das espécies por MALDI-TOF e pelo sequenciamento, no caso da impossibilidade de identificação pelo MALDI-TOF. Foram utilizados os genes do RNA16S e a região intergênica ITS1-5.8S-ITS2 para o sequenciamento de bactérias e leveduras, respectivamente.

4.3.1 Testes Morfológicos, Bioquímicos e Fisiológicos para as bactérias

Todas as bactérias passaram por uma triagem inicial com os seguintes testes: coloração de Gram, catalase, oxidação-fermentação da glicose e teste da oxidase (gram-negativos). Após esta triagem foram efetuados outros testes de acordo com o tipo de bactéria conforme MacFaddin (2000) e Holt (1994) (apêndice 2).

4.3.2 MALDI-TOF

As cepas de bactérias e leveduras foram preparadas no laboratório de bacteriologia animal (DeMIP ICBS) e encaminhadas para identificação pelo método MALDI-TOF no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários, em parceria com o Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul, Ponta Grossa, RS. Cada teste era feito em triplicata para cada isolado. E quando não ocorria a identificação, os testes eram repetidos mais duas vezes, no mínimo.

Uma alçada de cada colônia era misturada em um tubo contendo 300µL de água ultra-pura e homogeneizada em agitador (Vórtex) por 20 segundos. Após esta etapa foram adicionados 900µL de etanol absoluto, homogeneizado em vórtex por 20s e então centrifugado a 11.000g por 2 min. O

sobrenadante foi desprezado e o tubo deixado secar à temperatura ambiente por 2 a 3 min. Foi adicionado 25µL de ácido fórmico, homogeneizado por 20s. Após foi adicionado 25µL de acetonitrila e homogeneizado por mais 20s. As amostras foram então centrifugadas a 11.000g por mais 2 min e 1µL do sobrenadante de cada amostra foi pipetado em triplicata em uma placa MTP 384 TARGET PLATE GROUND STEEL BC, e deixado secar em temperatura ambiente. Por fim, 1µL da solução de HCCA (ácido α -Cyano-4-hydroxycinnamic 10 mg/mL, acetonitril 50%, água 47.5%, ácido trifluoroacético 2.5%) foi pipetada em cada amostra e deixado secar em temperatura ambiente. Por fim a placa era inserida no Equipamento Bruker, Autoflex Speed, no Software Aquisição: Flex Control 3.4 e os dados foram tratados no banco de dados MALDI Biotyper 3.1.

4.3.3 Sequenciamento

4.3.3.1 Extração de DNA pelo método de fervura para bactérias

As amostras foram cultivadas em PCA e após crescimento transferiu-se uma alçada da colônia em 100 µL de água ultra-pura em microtubo de 1,5mL e ferveu-se por 5 min uma vez. Imediatamente a amostra foi transferida diretamente para o gelo onde foi mantida por mais 5 min. Após esta etapa foi feita centrifugação a 11.000g por 5 min. O sobrenadante foi conservado em microtubos e congelado a -20°C (Riyaz-UI-Hassan et al., 2008).

4.3.3.2 Extração de DNA com acetato de potássio para leveduras

O DNA de leveduras foi extraído com base no protocolo proposto por Osorio-Cadavid et al. (2009) com algumas modificações na fase inicial, que segue: cada isolado foi cultivado em ágar GYP a 36°C durante 18 horas. A biomassa foi transferida para um microtubo e ressuspensa em 400 µL de tampão

de lise (NaCl 0,5 M, EDTA 10 mM, SDS a 2%, Tris-HCl 50 mM, pH 8) e incubada durante 60 min a 65°C. Foi adicionado imediatamente 0,2mL de acetato de potássio 5M (pH 4,8), ressuspendido por 30s e colocado em banho de gelo por 30 min. Após foi centrifugado a 11.000g por 5 min e o sobrenadante transferido para outro tubo. Foi adicionado então 1mL de isopropanol e agitado suavemente por 5 min, em temperatura ambiente. Foi então centrifugado a 11.000g por 10 min e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 0,5mL de etanol 70% e centrifugou-se a 11.000g por 5 min, e o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi deixado secar à temperatura ambiente e após ressuspendido em 50µL de TE (TRIS-EDTA pH 7,4). As amostras foram então conservadas a -20°C.

4.3.3.3 PCR das Bactérias Mesófilas e Psicrófilas

A PCR foi feita de acordo com Franco et al. (2016). Fragmentos do gene RNA16S foram amplificados usando os oligonucleotídeos 515F e 806R, previamente identificados como adequados para bactérias e arqueias (BATES et al., 2011). A amplificação foi realizada em uma solução de amplificação de 20 µL, consistindo em: 8,9µL de água ultra-pura, 2µL de DNA genômico, 1,5mM de MgCl₂, 0,1µM de cada oligonucleotídeo, 200µM dos quatro dNTPs (Ludwig Biotec), 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2µL tampão de reação 10X. Estes oligonucleotídeos amplificam 291 pares de base da região hipervariável V3-V4 do gene RNA16S. A amplificação foi realizada no Termociclador ProFlex PCR System (byosystems®) de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguida por 25 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C, 1 min a 72°C e um ciclo final a 72°C durante 6 min. Para o sequenciamento foram feitas inicialmente avaliações morfológicas (morfologia celular e colonial) e testes fisiológicos-bioquímicos de todas as cepas bacterianas para observar a similaridade entre os isolados. Os isolados que apresentavam resultados incongruentes no MALDI-TOF foram sequenciados.

4.3.3.4 PCR Leveduras

Todos os isolados foram identificados por amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 com os oligonucleotídios ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). A amplificação foi realizada em uma solução de amplificação de 25µL, consistindo em 13,9µL de água ultra-pura, 5µL de DNA genômico, 3mM de MgCl₂, 0,64 pmoles/µL de cada oligonucleotídeo, 10uM dos quatro dNTPs (Ludwig Biotec), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5µL tampão de reação 1X. A amplificação foi realizada no Termociclador ProFlex PCR System (byosystems®) de acordo com o seguinte programa: Um ciclo inicial a 94°C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C durante 15s, 55°C durante 45s, 72°C durante 90s e um ciclo de extensão final a 72°C durante 6 min.

4.3.3.5 Eletroforese

Os produtos de PCR tanto para as bactérias como para as leveduras foram examinados por eletroforese em um gel de agarose a 0,5%, a 70V, durante 60 min e corados com GelRed 0,5% para visualização sob luz ultravioleta. A captura de imagem digital foi feita utilizando o Transiluminador L-PIX image, Loccus biotecnologia. O tamanho dos fragmentos foi visualizado através da comparação com o marcador de peso molecular 100pb (Ludwig).

4.3.3.6 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR para cada amostra de DNA foram purificados utilizando o kit de purificação PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, EUA) e, em seguida, quantificados no espectrofotômetro (NanoDrop Lite Spectrophotometer Thermo Fischer).

4.3.3.7 Sequenciamento das bactérias e leveduras

Após purificação e quantificação dos fragmentos de DNA, todos os produtos de PCR foram encaminhados para sequenciamento na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas - Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi utilizado o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados com 5,0 pmol do oligonucleotídeo 5'-NNNNNNNNNNNN-3' e 1 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1min, seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

A edição e comparação foi feita no GenBank pelo programa Blast em busca de sequências similares, como no mínimo 99% de homologia.

4.4 Testes para Detecção de Produção de Enzimas Líticas pelas Bactérias e Leveduras

A determinação da hidrólise da caseína e produção de lipase foram realizadas conforme metodologia descrita por Ben-Gigirey et al. (2000). DNase, Litmus milk, Lecitinase e Fermentação da Lactose foram executados conforme MacFaddin (2000). Todos os testes foram executados em duas temperaturas: 5 e 30°C. A presença de halo foi considerada positiva independente do tamanho.

Foram usadas cepas controle de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235). Não foram obtidas cepas controle de leveduras, sendo as bactérias obtidas citadas acima usadas como controle.

4.4.1 Teste da Lipase

Para a avaliação da atividade lipolítica, as cepas foram semeadas em ágar tributirina (0,5% proteose de peptona, 2,5% peptona de caseína, 0,3% extrato de levedura, 2% ágar) acrescido de 1% de tributirina. Após incubação à 30°C e 5°C por 48h, verificou-se a formação de halo translúcido em torno da colônia, o tamanho do halo foi calculado medindo o diâmetro total (colônia + halo) e após subtraindo o diâmetro da colônia (BEN-GIGIREY et al., 2000).

4.4.2 Teste da Caseinase

Para avaliar a atividade proteolítica, as cepas foram semeadas em ágar leite. O ágar foi preparado com ágar padrão em placas (PCA) acrescido de 10% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Após incubação a 30°C e 5°C por 48h, verificou-se a formação de halo translúcido em torno da colônia, o tamanho do halo foi calculado medindo o diâmetro total (colônia + halo) e após subtraindo o diâmetro da colônia (BEM-GIGIREY et al., 2000).

4.4.3 Teste da DNase

Os isolados foram semeados em ágar DNase (Acumedia), e incubadas à 30°C e 5°C por 48h. Posteriormente, foi acidificado com HCl 1N para a revelação da prova. A presença nítida de halo claro na parte inferior e em volta da colônia foi considerada positiva (MACFADDIN, 2000).

4.4.4 Teste do Litmus Milk

Os isolados foram semeados em tubos contendo Litmus Milk (Fluka) e incubadas a 30°C e 5°C por 48h. Quando ocorre a fermentação da lactose e/ou dextrose com produção de ácido, o indicador do meio torna-se rosa. Se a lactose não for fermentada e as proteínas forem usadas, a solução ficará alcalina e mais azul. A caseína do leite pode ser digerida. Isto irá coagular o leite para formar uma coalhada (um sólido). Outra reação possível é a de peptonização, quando a caseína é metabolizada até aos aminoácidos individuais. Esse último processo resulta em um líquido claro não leitoso, normalmente de cor escura (marrom).

4.4.5 Fermentação da Lactose

Os isolados foram semeados em caldo lactose (Acumedia) com tubo de Durham. Após incubação em 5 e 30°C por 48h, se houve formação de gás e/ou acidificação, o teste foi considerado positivo.

4.4.6 Teste da Lecitinase

Os isolados foram semeados em ágar Baird Parker (Acumedia) e se houve a formação de halo opaco em torno da colônia após incubação a 30°C e 5°C, o teste foi considerado positivo.

4.5 Análise dos dados

Os dados foram avaliados de forma qualitativa, divididos em positivos e negativos, calculados a porcentagem de positivos e apresentados em %.

4.6 Descarte de resíduos

Todos os produtos biológicos foram autoclavados antes do descarte. Após autoclavação, os produtos biológicos foram descartados no lixo orgânico. Plásticos e papéis foram descartados no lixo reciclável e os produtos químicos foram encaminhados para tratamento pelo Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos do Instituto de Química da UFRGS. Produtos como luvas, géis e máscaras foram encaminhados para incineração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos isolados

Dos 60 isolados de bactérias, foram observadas 7 espécies de Gram-positivas e três de Gram-negativas (Tabelas 1 e 2). Dos 24 isolados de leveduras foram observadas quatro espécies (Tabelas 3). Nos apêndices 1 e 2 podemos observar os resultados dos testes de identificação dos microrganismos.

Todas as cepas de bactérias e leveduras foram testadas pelo MALDI-TOF. Os isolados cuja identificação não foi possível pelo MALDI-TOF foram sequenciados. O teste de MALDI-TOF identificou 92% dos isolados de bactérias, sendo que todos os isolados não identificados eram do gênero *Paenibacillus*, que são bactérias ambientais, e por este motivo não são localizadas no banco de dados.

Das 24 cepas de leveduras, somente 46% das cepas foram identificadas pelo teste do MALDI-TOF, sendo que nenhum dos isolados de *Trichosporon coremiiforme* foi identificado e seis dos oito isolados de *Candida pararugosa* também não foram identificados. Em todas estes isolados não identificados foram observados bons espectros de leituras em todas as repetições. Existem relatos de dificuldade de identificação de bactérias esporuladas Gram-positivas pelo MALDI-TOF o que foi também observado em nosso trabalho. A maior dificuldade de identificação das leveduras se deve ao fato de que o banco de dados utilizado pelo MALDI-TOF não possui uma grande diversidade de dados de fungos e a maioria dos pesquisadores vai inserindo ao banco perfis de espécies ainda não presentes no mesmo (WEIG et al., 2011; BECKER et al., 2014). Como foram feitos sequenciamentos somente de um representante de cada tipo morfológico diferente, pode ser que estes isolados estejam identificados erradamente e sejam de outras espécies. O sequenciamento de cada um destes isolados deverá ser feito novamente para confirmar a identificação.

Tabela 1. Identificação de espécies de bactérias gram-positivas

encontradas em cada etapa de produção do queijo colonial utilizando os testes MALDI-TOF e/ou sequenciamento do RNA16S.

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Bacillus</i> sp.	1,2,6,7,8	5	-*	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	4	-	1	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	5,21,28,90,91	5	-	-	-
<i>Lactococcus. lactis</i>	3,9,10,11,12,41,42	-	10	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	44,100,101	-	-	5	-
<i>Lactococcus lactis</i>	17,18,26,34,46	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	16,19,20,27,47,81,	-	-	-	8
<i>Paenibacillus</i> sp.	96, 109	-	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	102,107,108	-	-	3	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	105,110	-	-	-	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	39	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	23,24,43	-	3	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35	-	-	1	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	36,37,38	-	-	-	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	29,40	2	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	30,31	-	2	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,32,33	-	-	3	-
Total de bactérias isoladas em cada etapa		13	16	12	13

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Tabela 2. Identificação de espécies de bactérias Gram-negativas encontradas em cada etapa de produção do queijo colonial utilizando os testes MALDI-TOF e/ou sequenciamento do RNA16S.

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Citrobacter freundii</i>	13	-*	-	1	-
<i>Klebsiella</i> sp.	14	-	-	1	-
<i>Klebsiella</i> sp.	15	-	-	-	1
<i>Raoutella</i> sp.	83,85,98	3	-	-	-
Total de bactérias isoladas em cada etapa		3	0	2	1

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Quando positiva a identificação do microrganismo pelo método

MALDI-TOF foram obtidos os mesmos resultados para gênero e espécie observados após sequenciamento, que é considerado o teste padrão ouro. O método MALDI-TOF tem sido apontado como um meio eficiente e rápido na identificação de microrganismos e esta técnica permite diagnósticos microbiológicos mais complexos (PASTERNAK, 2012). A utilização deste método realmente se apresentou bastante rápido, prático e mais barato, desconsiderando o custo inicial da compra do sistema. Mas ainda pudemos observar que ele apresenta problemas na identificação de alguns isolados devido, provavelmente, à ausência de dados de microrganismos menos usuais à clínica médica, caso de nossos isolados. Por exemplo, o banco de dados do método MALDI-TOF possuía em 2016 um baixo número de espécies de leveduras (em torno de 193 espécies) e as que constavam eram de origem clínica. Também alguns autores relataram problemas de identificações errôneas por este método (LALLEMAND et al, 2017).

Nesse estudo houve predomínio da microbiota Gram-positiva, especialmente da espécie *Lactococcus lactis*. A presença de *L. lactis* em todas as etapas de preparo do queijo, comparada com as outras espécies encontradas, sugere sua capacidade de competir com o restante da microbiota. O predomínio de bactérias lácticas nas composições microbianas de queijos artesanais já foi relatado por outros autores (LEROY & DE VUYST 2004; EI-BARADEI et al., 2007; ERCOLINI et al., 2008).

A presença de *L. lactis* em queijos deve-se ao fato desta bactéria fazer parte da microbiota do animal, do tambo e por ser empregada como cultura “starter”. Elas produzem grande quantidade de ácido láctico, causando a acidificação do leite e promovendo as reações de amadurecimento do queijo, através da liberação de enzimas intracelulares hidrolíticas, após a autólise (BERESFORD et al., 2001).

Tabela 3. Identificação de espécies de Leveduras encontradas em cada etapa de produção do queijo colonial utilizando os testes MALDI-TOF e/ou sequenciamento da região ITS.

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Candida</i> sp.	1A,1C,34L1,49 L1	4	-*	-	-
<i>Candida</i> sp.	75L2,75L3	-	-	-	2
<i>Candida pararugosa</i>	51L1,55L1,55L 2,55L3	4	-	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	59L1,59L2,60L 1,60L2,60L3, 72L1	-	-	-	6
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2L	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	52L1 57L1,57L2,57L 3, 58L1,58L2,58L	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	3	-	-	-	6
Total de leveduras isoladas em cada etapa		10	0	0	14

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Feirtag e McKay (1987) relataram pela primeira vez este fenômeno para Lactococos e associaram sua atividade lítica ao desenvolvimento do sabor acentuado no queijo. Para avaliar as questões organolépticas, Peláez & Requena (2005) pesquisaram um grupo de bactérias ácido lácticas e relataram que estes microrganismos têm um papel central na formação de sabores típicos de muitos queijos artesanais. Estes microrganismos contribuem para o aroma e o sabor específico, e único, de muitas variedades de queijos. São também conhecidos pelo seu efeito antimicrobiano pela produção de ácidos orgânicos e de bacteriocinas (DELVES-BROUGHTON et al., 1996; Di CAGNO et al., 2008; SKELIN et al., 2012). Sob este aspecto, alguns autores já testaram a atividade de bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas e relataram inibição de espécies como *L. monocytogenes*, importante patógeno oportunista encontrado contaminando alimentos (FLÓREZ & MAYO 2006; UNLU et al., 2015;

SCATASSA et al., 2015; HEREDIA-CASTRO et al., 2015; MACALUSO et al., 2016). Podemos observar que *L. lactis* estava presente no leite, antes da adição da cultura “starter”, o que confirma a presença dos microrganismos já no ambiente de fabricação.

Ruggirello et al. (2016) avaliaram a persistência e a viabilidade deste microrganismo durante a fabricação e amadurecimento de queijos, onde as amostras também foram analisadas em diferentes etapas (leite após inoculação, coalhada após corte, coalhada após prensagem e drenagem, queijo imediatamente após o salga do queijo durante seis meses). As populações de *L. lactis* foram detectadas em todos os queijos até o sexto mês de maturação, confirmando a presença de células viáveis durante todo o processo de amadurecimento, inclusive nos estádios tardios. Esses resultados demonstram a importância de se avaliar a possível produção de enzimas líticas por estes microrganismos, já que eles são relatados com frequência durante a produção de queijos.

Outros cocos Gram-positivos (*Staphylococcus saprophyticus* e *S. warneri*, *S. xylosus*) também foram encontrados nas etapas de fabricação do queijo analisadas neste estudo. Estafilococos é o principal grupo de bactérias que habitam a pele, membranas mucosas de seres humanos, outros mamíferos e aves. Podem ser isolados também a partir de uma grande variedade de fontes ambientais como solo, água, ar, plantas, alimentos e superfícies de utensílios (VOS et al., 2009). Dos 15 isolados de estafilococos deste estudo, sete eram coagulase positivo. A espécie coagulase positiva mais relacionada com intoxicação alimentar é *S. aureus* e a presença destes estafilococos coagulase positivos em amostras de leite e queijos (em contagens acima do permitido) já foi relatada por outros autores (KONGO et al., 2008; FRECE et al., 2016). Nenhum dos isolados de estafilocos deste estudo cresceu sob-refrigeração. Resultado semelhante foi relatado por de Araujo et al. (2017), onde os autores avaliaram o crescimento de *S. aureus* no queijo coalho e constataram que as amostras de queijo armazenadas a 12°C apresentaram maior crescimento do que as armazenadas sob refrigeração. Kümmel et al. (2016) também testaram amostras de diferentes etapas do processo de fabricação de queijo para rastrear

a presença de *S. aureus* do leite até o produto final. Este microrganismo foi encontrado no leite e também nas etapas de processamento deste queijo na indústria de produtos lácteos estudada. O controle de *S. aureus* é de grande importância econômica na indústria de laticínios, e a alta prevalência de *S. aureus* em amostras de queijos adverte sobre a necessidade de reduzir os níveis de contaminação desde o leite utilizado para produção de queijos, assim como o monitoramento e controle da produção (FRECE et al., 2016).

Bacillus sp. foram encontrados no leite e na coalhada e *Paenibacillus* sp. nas etapas de pós-salga e queijo. Martinez et al. (2017) também relataram a presença de espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* sp. em seu estudo com leite concentrado. Fotou et al. (2011) relatou contagens de *Bacillus* sp. em leite cru de ovelha em 29% das amostras analisadas. *Paenibacillus*, anteriormente pertencente ao gênero *Bacillus*, são encontrados principalmente em solos e águas, são produtores de enzimas extracelulares, antibióticos e compostos antifúngicos (VOS et al., 2009). Representantes do gênero *Bacillus* são contaminantes comuns do leite que podem causar deterioração e alterações de sabor de produtos lácteos pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas (Okshevsky et al., 2017). Do ponto de vista microbiológico, o maior problema da contaminação de queijos por bactérias formadoras de esporos como o gênero *Bacillus* é que estes microrganismos são resistentes ao calor e capazes de sobreviver no leite após a pasteurização (Buňková L & Buňka F, 2017).

A presença de bactérias do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* neste estudo reforça a importância da utilização de boas práticas de fabricação para evitar a presença destes microrganismos que podem causar alterações no produto final.

No grupo de bactérias Gram-negativas, foram identificadas as espécies *Klebsiella* sp., *Citrobacter freundii* e *Raoutella* sp. São Enterobactérias encontradas em diversos ambientes e já foram relatadas por outros autores em queijos (TULIO et al., 2015; PINTO et al., 2015). Durante as etapas de processamento de queijos, uma maneira de reduzir o número de Enterobactérias a fim de evitar problemas no produto final é controlar a etapa de maturação e temperatura da estocagem, realizar correta pasteurização do leite e a higiene

dos utensílios, ambiente e de quem vai manipular este produto.

No presente estudo, as leveduras foram encontradas nas etapas do leite e do queijo, sendo as espécies *Candida* sp, *C. pararugosa* e *Trichosporon coremiiforme* as identificadas em maior número. *Candida* sp. e *C. pararugosa* são leveduras amplamente distribuídas no ambiente e, também, fazem parte da microbiota da pele e de mucosas de seres humanos (KURTZMAN et al., 2011). As leveduras frequentemente fazem parte da microbiota de queijos devido à sua capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis e de metabolizar os constituintes do leite. Estes microrganismos desempenham um papel significativo na deterioração dos produtos bem como no amadurecimento de algumas variedades de queijo (IRLINGER & MOUNIER, 2009).

Entre as contribuições positivas das leveduras para a produção de queijo, a capacidade de contribuir para o desenvolvimento de sabor e textura está bem estabelecida. Tal característica está diretamente atribuída à sua capacidade de fermentar a lactose, produzir compostos aromáticos e suas atividades proteolíticas e lipolíticas (WESTALL & FILTENBORG, 1998). No entanto, o crescimento excessivo de leveduras e a deterioração dos produtos têm sido relatada por diversos autores e podem causar sabor frutado, produção de gás, descoloração e alterações na textura (WESTALL & FILTENBORG, 1998; JACQUES & CASAREGOLA, 2008). Aponte et al. (2010) observaram que as espécies de leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* representam parte da microbiota natural e contribuem para as características organolépticas em seu estudo feito com queijo mozzarella de búfala.

A presença de *Candida*. sp. e *C. pararugosa* no queijo é provavelmente causada pela contaminação do leite, pelo ar, roupas, mãos, aparelhos e equipamentos com os quais o queijo entra em contato durante o processo de produção (SUZZI et al., 2000). Outros autores já relataram a presença de esta espécie em seus estudos feitos com queijos e leite (SANTOS & MARIN 2005; DELAVENNE et al., 2011; GIANNINO et al., 2011). Seis isolados de *T. coremiiforme* foram encontrados no queijo, e apenas um no leite. *T. coremiiforme* é uma levedura de origem ambiental e tem sido isolada de solos,

águas e amostras clínicas. Estudos têm sido realizados com esta levedura devido à sua capacidade de utilizar uma gama de substratos, havendo grande interesse industrial na utilização de células de *Trichosporon* sp. em processos de biorremediação, metabolizando compostos poluentes (KURTZMAN et al., 2011). Há poucos relatos da presença de *T. coremiiforme* em queijos. Somente Padilla et al. (2014) relataram pela primeira vez a presença desta levedura em queijos. Um único isolado de *Rhodotorula mucilaginosa* foi encontrada no leite. Esta levedura é encontrada em ambientes terrestres e aquáticos e frequentemente isolada de seres humanos. Esta espécie tem sido considerada um patógeno emergente frequentemente associada a infecções em humanos (KURTZMAN et al., 2011).

A ocorrência de poucas espécies de leveduras confirma que o ecossistema do queijo é caracterizado por condições e composição que promovem a seleção de uma microbiota uniforme e bem definida (JAKOBSEN & NARVHUS, 1996).

5.2 Verificação do crescimento das cepas isoladas sob refrigeração (5°C)

Com relação ao crescimento sob refrigeração, os resultados são apresentados na tabela 4.

Das 60 bactérias e 24 leveduras reisoladas inicialmente, somente três cepas de bactérias e 14 cepas de leveduras cresceram sob-refrigeração (5°C). O leite e queijo foram as etapas onde se encontrou mais cepas com crescimento sob-refrigeração, sendo o queijo pronto para consumo o que apresentou maior número de isolados. As leveduras apresentaram uma maior atividade psicrotrófica quando comparadas com as bactérias.

Tabela 4. Bactérias e leveduras que cresceram sob refrigeração

Espécie	Identificação Cepa	N° de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Bacillus</i> sp.	6	1	.*	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	4	-	1	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	5	1	-	-	-
<i>Candida</i> sp.	34L1,49L1	2	-	-	-
<i>Candida</i> sp.	75L2,75L3	-	-	-	2
<i>Candida pararugosa</i>	51L1,55L1	2	-	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	59L1,59L2,60L1	-	-	-	3
	57L1,57L2,57L3,58L				
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1,58L2	-	-	-	5
Total de microrganismos isolados em cada etapa		6	1	0	10

* - indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Corbo et al. (2001) caracterizaram cepas de leveduras isoladas de leite de origem animal e de queijos, e relataram que os isolados mais prevalentes (*Trichosporon cutaneum*, *Candida catenulata* e *Y. lipolytica*) também mostraram aptidão psicrotrofica.

Das bactérias psicrotroficas, *Bacillus* sp. cresceu em duas etapas iniciais da produção do queijo (coalhada e no leite). Importante salientar que esta bactéria não foi isolada nas amostras do produto final. A qualidade de um produto está diretamente relacionada com a qualidade da matéria-prima empregada na sua elaboração. A microbiota inicial influencia na qualidade do leite cru e conseqüentemente nos produtos com ele fabricados. Altas contagens de psicrotroficos antes da fabricação de produtos lácteos frequentemente são causadas por técnicas inadequadas do manuseio do leite cru. Vários estudos comprovaram a presença de psicrotroficos em leite cru refrigerado (PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2008; STULOVA et al., 2010; ANGELO et al., 2014). Estes microrganismos, através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas, produzem substâncias indesejáveis e que podem alterar o produto final (HANTSIS-ZACHAROV & HALPERN, 2007; GAUCHER et al., 2008; IZIDORO et al., 2013; ANGELO et al., 2014). Alguns autores têm demonstrado que as proteases termoestáveis produzidas mesmo por baixo número de *Pseudomonas*

fluorescens, por exemplo, podem ativar o sistema plasmina no leite e acelerar a proteólise em queijos (STULOVA et al., 2010; DE JONGHE et al., 2011). Interessante observar que esta espécie não foi isolada de nenhuma etapa de processamento analisada, embora seja considerada frequente em leite e queijos.

Um grande número de leveduras apresentou crescimento em baixa temperatura e a maioria foi isolada do produto final. Talvez elas possam estar contribuindo com as características organolépticas do queijo colonial.

5.3 Determinação da capacidade de produção de enzimas líticas

Foi testada a capacidade de produção de enzimas de todas as bactérias e leveduras identificadas nas principais etapas de produção do queijo colonial nas temperaturas de 5 e 30°C.

Nenhuma das cepas, tanto de bactérias quanto de leveduras apresentou atividade de DNase e lecitinase nas duas temperaturas testadas.

A metodologia utilizada para verificação da produção de lipase e caseinase foi através da medição de halo de acordo com a bibliografia utilizada. Como não foi testada a atividade lipolítica e proteolítica e sim apenas a presença ou ausência de lipólise e proteólise, a formação de halo de qualquer tamanho foi considerada positiva em ambos os testes.

5.3.1 Lipólise

A maior produção de lipase por bactérias e leveduras foi na temperatura de 30°C (Tabelas 5, 6 e 7). Nenhuma levedura apresentou lipólise à 5°C. Este fato era esperado, pois as cepas utilizadas neste trabalho foram isoladas em trabalho anterior em temperatura de mesófilos. Das 24 leveduras, 19 (79%) apresentaram lipólise somente a 30°C e a maioria isolada do queijo. Das 60 cepas de bactérias, 18 (30%) foram lipolíticas somente a 30°C, quatro (7%) somente à 5°C e 10 (17%) em ambas as temperaturas. Das 28 cepas de

L. lactis, oito (13%) foram lipolíticas somente a 30°C, duas (3%) a 5°C e três (5%) em ambas as temperaturas.

As espécies *L. lactis* e *S. saprophyticus* foram as únicas espécies com cepas isoladas em todas as etapas de produção do queijo colonial e apresentaram cepas lipolíticas em todas as etapas da produção do queijo e nas duas temperaturas testadas (Tabelas 5 e 7). *L. lactis* é uma das bactérias ácido lácticas encontradas na microbiota do leite e, também, é normalmente utilizada como cultura *starter* de muitos fermentos, explicando assim sua presença em todas as etapas (ALEGRÍA et al., 2009). A capacidade de lipólise destes microrganismos no queijo e capacidade de crescer em ambas as temperaturas sugere que, mesmo durante o tempo de vida de prateleira e até mesmo sob refrigeração eles continuam viáveis. A hidrólise dos triglicerídios do leite pode acarretar na formação de sabores desagradáveis no queijo se houver a presença de outros microrganismos indesejáveis com alta atividade lipolítica (IRLINGER & MOUNIER 2009; TOFALO et al., 2015; ESTEBAN-TORRES et al., 2016).

Bezerra (2015) fez um estudo da proteólise, lipólise e perfil volátil de queijo coalho adicionado de bactérias probióticas (bactérias lácticas). Ele verificou que as culturas lácticas, independente do tipo, quando adicionadas aos queijos de coalho, apresentaram ação lipolítica durante o armazenamento, provocando a redução dos ácidos graxos de cadeia longa e aumento dos ácidos graxos de cadeia curta. Os ácidos liberados influenciaram diretamente nos compostos do aroma peculiar do produto, principalmente, o aroma característico de queijo de leite caprino, com aumento dos ácidos caprílico, caproico e cáprico.

Proporcionalmente as leveduras apresentaram maior número de cepas lipolíticas quando comparadas às bactérias (79% de leveduras lipolíticas e 30% bactérias lipolíticas à 30°C). Todas as espécies encontradas (*C. pararugosa*, *T. coremiiforme* e *R. mucilaginoso*) apresentaram cepas lipolíticas à 30°C, mas não à 5°C.

Tabela 5. Bactérias e leveduras positivas no teste Lipase somente à 30°C

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Bacillus</i> sp.	6,7,8	3	.*	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	14	-	-	1	-
<i>Klebsiella</i> sp.	15	-	-	-	1
<i>Lactococcus lactis</i>	5,21	2	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	10,11,42,44	-	4	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	18	-	-	1	-
<i>Lactococcus lactis</i>	47	-	-	-	1
<i>Raoutella</i> sp.	98	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	38	-	-	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	-	1	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,33	-	-	2	-
<i>Candida</i> sp.	34L1	1	-	-	-
<i>Candida</i> sp.	75L2,75L3	-	-	-	2
<i>Candida pararugosa</i>	51L1,55L1,55L2,55L3	4	-	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	59L1,59L2,60L1,60L2	-	-	-	4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	52L1	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	57L1,57L2,57L3,58L1,	-	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	58L2,58L3	-	-	-	6
Total de microrganismos isolados em cada etapa		13	5	4	15

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Tabela 6. Bactérias positivas no teste Lipase somente na temperatura de 5°C

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Lactococcus lactis</i>	41	*-	1	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	96	-	-	-	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	105	-	-	-	1
<i>Raoutella</i> sp.	85	1	-	-	-
Total de microrganismos isolados em cada etapa		1	1	0	2

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Outros autores relataram atividade lipolítica de algumas espécies de leveduras como *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*,

P. guilliermondii, *P. fermentans* e *S. cerevisiae* em queijos (ROOSTITA et al., 1996; FERREIRA & VILJOEN 2003; FADDA et al., 2004; SPANEMBERG et al., 2009; GOLIĆ et al., 2013; ATANASSOVA et al., 2016). Considerando que o leite e o queijo, em todas suas etapas de produção são mantidos em temperaturas abaixo de 10°C, as leveduras identificadas neste estudo não devem causar efeitos nocivos ao produto. Já as 14 cepas de cinco espécies de bactérias apresentaram atividade lipolítica à 5°C. O papel do *L. lactis* é esperado na maturação do queijo. As outras espécies *Paenibacillus* sp., *R.* sp, *S. saprophyticus* e *S. aureus* talvez possam ter um papel negativo, embora não seja possível afirmar pois não foram feitas análises sensoriais ou de rendimentos nestes queijos.

Tabela 7. Bactérias positivas no teste Lipase em ambas temperaturas (5 e 30°C)

Espécie	Identificação Cepa	N° de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Lactococcus lactis</i>	28,91	2	-*	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	34	-	-	1	-
<i>Raoutella</i> sp.	83	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	39	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	24	-	1	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35	-	-	1	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	36	-	-	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	29	1	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	-	1	-	-
Total de bactérias isoladas em cada etapa		5	2	2	1

*- indica ausência de cepa isolada nesta etapa

5.3.2 Proteólise

Das 10 espécies de bactérias identificadas nas principais etapas de produção do queijo colonial, oito apresentaram proteólise somente à 30°C,

sendo 35 cepas isoladas com esta característica. Também algumas cepas (12%) de *B. sp.*, *K. sp.*, *L. lactis*, *S. saprophyticus* e *S. aureus* apresentaram proteólise tanto à 30°C quanto à 5°C, representando 12% do total de cepas identificadas. Associadas aos resultados de lipólise observa-se que o maior número de isolados positivos é presente na temperatura de 30°C, o que reforça a importância da refrigeração a fim de evitar danos ao produto.

Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentadas as espécies de microrganismos que apresentaram proteólise somente em temperatura de 30°C, e em ambas as temperaturas (5 e 30°C).

L. lactis é a espécie que novamente predomina sob quase todas as etapas de produção do queijo, e sob as duas temperaturas testadas. A proteólise pode ocorrer no leite, na sua coagulação induzida enzimaticamente e na maturação do queijo. A proteólise tem sido apontada como responsável pelo desenvolvimento do sabor e da textura da maioria dos tipos de queijos (LAW, 1987; FOX, 1989). Diversos autores relataram a presença de bactérias que causam a proteólise em outros tipos de queijos (SPANEMBERG et al., 2009; ALBENZIO et al., 2010; MURTAZA et al., 2014; TRANI et al., 2016).

A presença e a capacidade de *L. lactis* de persistir na maturação tardia mostra provavelmente o papel tecnológico deste microrganismo na maturação do queijo, com um possível impacto na formação de sabor. Muitos fermentos industriais são produzidos a partir de cepas de *L. lactis* e utilizados como cultura “starter” para produção de queijos. Sob este aspecto, Hayaloglu et al. (2005) avaliaram a influência de culturas starter de *Lactococcus* em queijo branco e concluíram que o uso de diferentes bactérias nestas culturas causa diferenças significativas na qualidade do queijo e, também, que cada cultura iniciadora contribui para a proteólise em um grau diferente. Bezerra (2015) também utilizou cultura “starter” de *Lactococcus* sp. para avaliar proteólise de queijo coalho e constatou que a utilização da combinação de culturas influenciou a proteólise, proporcionando maior teor de proteína solúvel, maior índice proteolítico de profundidade e maior liberação de aminoácidos no primeiro dia após o processamento.

Tabela 8. Bactérias e leveduras positivas no teste da caseína somente à 30°C

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Bacillus</i> sp.	2,6,7,8	4	-*	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	1	1	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	13	-	-	1	-
<i>Lactococcus lactis</i>	5,28	2	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	3.,10,11,12,42,44,100,101	-	8	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	17,18,26,34,46	-	-	5	-
<i>Lactococcus lactis</i>	16,20,47,81,96,109	-	-	-	6
<i>Paenibacillus</i> sp.	108	-	-	1	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	110	-	-	-	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	39	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	24	-	1	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	29	1	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	-	1	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	-	-	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	-	1	-	-
<i>Candida</i> sp.	34L1	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	57L2,58L2	-	-	-	2
Total de microrganismos isolados em cada etapa		10	11	8	9

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Tabela 9. Bactérias positivas no teste da caseína em ambas as temperaturas (5 e 30°C)

Espécie	Identificação Cepa	Nº de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Bacillus</i> sp.	4	-*	1	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	15	-	-	-	1
<i>Lactococcus lactis</i>	9,41	-	2	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	19	-	-	-	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	43	-	1	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	-	1	-	-
Total de microrganismos isolados em cada etapa		0	5	0	2

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

Nenhum microrganismo apresentou atividade na caseína apenas à 5°C. Das leveduras isoladas, uma cepa de *C. sp.* e *T. coremiiforme* apresentaram proteólise somente à 30°C. Outros autores também relataram em seus estudos a atividade proteolítica de *Candida sp.* e *Trichosporon coremiiforme* em leite e queijos (MELVILLE et al., 2011; PADILLA et al., 2014). Assim como as bactérias, algumas espécies de leveduras já foram estudadas com relação à sua atividade como culturas adjuntas. Dias et al. (2012) avaliaram o efeito da adição do *Geotrichum candidum*, como cultura adjunta, na aceitação e composição do queijo tipo Camembert. Concluíram que um aumento na concentração desta levedura levou a um aumento da média de aceitação dos provadores. Por outro lado, Atanassova et al. (2016) comprovaram que seis isolados de *K. lactis* e três isolados de *P. guilliermondii* peptonizaram o leite pasteurizado após 48 h de incubação. Esta capacidade de peptonizar o leite pasteurizado relacionado com uma alta atividade proteolítica não é favorável para a utilização destas leveduras na fabricação de queijo, devido a prováveis perdas de rendimento.

Desta forma, mais estudos devem ser feitos para avaliar o papel da presença destas bactérias e leveduras em queijo colonial e se afetam de fato as características organolépticas e de rendimento no produto final.

5.3.3 Teste do Litmus Milk

Litmus milk é um meio complexo que diferencia os microrganismos com base nas suas múltiplas reações. Este meio possui vários componentes que podem ser metabolizados: glicose, lactose e caseína (MACFADDIN, 2000). Quando a caseína é digerida pelos microrganismos, isto coagula o leite e forma uma coalhada. Esta foi a reação observada em todos os microrganismos que foram positivos neste teste, com exceção da cepa 108, um *Paenibacillus sp.* na etapa de pós salga, que fermentou a lactose e produziu ácido, e da cepa 105, também *Paenibacillus sp.* no queijo, que utilizou as proteínas do meio tornando este alcalino (Tabela 10). A formação de coalhada é esperada pela ação de

bactérias como *L. lactis*, que são bactérias ácido lácticas presentes em fermentos utilizados na produção de queijos. Este é o primeiro trabalho que avalia a atividade de microrganismos no meio Litmus Milk, e os resultados encontrados demonstram a importância de mais estudos sobre o comportamento de microrganismos neste meio e seus efeitos nas características organolépticas e de rendimento em queijos.

Tabela 10. Bactérias e leveduras positivas no Litmus Milk a 30°C

Espécie	Identificação Cepa	N° de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Bacillus</i> sp.	6,8	2	-*	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	4	-	1	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	15	-	-	-	1
<i>Lactococcus lactis</i>	5,21,90	3	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	12,41,100,101	-	4	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	26,46	-	-	2	-
<i>Lactococcus lactis</i>	20	-	-	-	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	107,108	-	-	2	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	105	-	-	-	1
<i>Raoutella</i> sp.	83	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	39	1	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	23,24,43	-	3	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35	-	-	1	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	36	-	-	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	29	1	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	-	1	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,32	-	-	2	-
<i>Candida</i> sp.	34L1	1	-	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	51L1,55L1,55L2	3	-	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	59L1,59L2,60L1,60L2	-	-	-	4
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2L	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	52L1	1	-	-	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	57L1,57L2,58L2	-	-	-	3
Total de microrganismos isolados em cada etapa		14	9	7	11

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

No teste do Litmus Milk houve grande discordância com os resultados de caseínase em placa. Das 38 cepas positivas no teste em placa somente 18 foram positivas no Litmus Milk. Em contrapartida oito cepas negativas no teste em placa foram positivas no Litmus Milk. O teste em placa apresentou maior eficiência.

Nenhum microrganismo apresentou qualquer atividade no Litmus Milk na temperatura de 5°C. *L. lactis* e *S. saprophyticus* foram as bactérias com maior atividade e presentes em todas as etapas de produção. As leveduras positivas em maior número nesse teste foram as espécies *C. pararugosa* e *T. coremiiforme*, nas etapas do leite e queijo.

5.3.4 Teste de Fermentação da Lactose

Das 10 espécies de bactérias identificadas, cinco delas apresentaram cepas com capacidade de fermentação da lactose. Das quatro espécies de leveduras, três apresentaram cepas com capacidade de fermentação da lactose (Tabela 11).

Tabela 11. Bactérias e leveduras positivas no teste de fermentação da lactose a 30°C

Espécie	Identificação Cepa	N° de cepas isoladas em cada etapa de produção			
		Leite	Coalhada	Pós-salga	Queijo
<i>Citrobacter freundii</i>	13	-*	-	1	-
<i>Klebsiella</i> sp.	14	-	-	1	-
<i>Lactococcus lactis</i>	12	-	1	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	26	-	-	1	-
<i>Lactococcus lactis</i>	19,20,27	-	-	-	3
<i>Paenibacillus</i> sp.	102,108	-	-	2	-
<i>Raoutella</i> sp.	85,98	2	-	-	-
<i>Candida</i> sp.	75L2,75L3	-	-	-	2
<i>Candida pararugosa</i>	55L2,55L3	2	-	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	60L1,60L2	-	-	-	2
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	57L1,58L2	-	-	-	2
Total de microrganismos isolados em cada etapa		4	1	5	9

*- indica ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa

L. lactis foi a bactéria com maior positividade na fermentação da lactose, foi encontrado um isolado positivo na etapa da coalhada, um na pós salga e prevalecendo com maior número de isolados na etapa do queijo. Este resultado é esperado, já que a fermentação da lactose pela ação destas bactérias utilizadas em culturas *starter* é desejada para levar à formação da coalhada na etapa inicial de preparo do queijo colonial.

Interessante observar que das 28 cepas de *L. lactis* isoladas, somente cinco fermentaram a lactose e nenhuma delas isolada do leite. Das leveduras positivas neste teste, as espécies de *Candida* sp., *C. pararugosa* e *Trichosporon coremiiforme* também prevaleceram na etapa do queijo.

Os resultados demonstram que as cepas isoladas não eram fermentadoras da lactose, e esta atividade lítica só foi observada na temperatura de 30°C, reforçando ainda mais a importância da refrigeração para o controle destes microrganismos.

6. CONCLUSÕES

Todas as 60 bactérias (16 cepas no leite, 16 na coalhada, 14 na pós salga e 14 no queijo) e 24 leveduras (10 cepas no leite e 14 no queijo) nas principais fases de produção do queijo colonial foram identificadas. *Lactococcus lactis* foi a espécie com maior número de cepas identificadas entre as bactérias e *Candida pararugosa* entre as leveduras.

Foi realizada uma triagem dos microrganismos pelo método de microbiologia clássica, que foram posteriormente identificadas usando MALDI-TOF e/ou sequenciamento. O método MALDI-TOF apresentou deficiência principalmente na identificação de leveduras por não possuir um banco de dados ainda completo com microrganismos ambientais.

A maior atividade lítica dos microrganismos identificados foi na temperatura de 30°C e a maior diversidade de espécies foi verificada no leite e no queijo. Nos testes enzimáticos realizados, as bactérias demonstraram maior atividade proteolítica, enquanto que as leveduras foram mais lipolíticas e também apresentaram maior porcentagem de formação de coágulo no Litmus Milk e na fermentação da lactose.

Os testes realizados em temperaturas de 5°C demonstram a importância da refrigeração no controle da atividade microbiana.

7. REFERÊNCIAS

- Agustini BC. 2014. **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- Aires GSB, Walter EHM, Junqueira VCA, Roig SM, Faria JAF. 2009. *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. *J Food Prot.* 72(6):1301-5.
- Albenzio M, Santillo A, Caroprese M, Marino R, Trani A, Faccia M. 2010. Biochemical patterns in ovine cheese: influence of probiotic strains. *J Dairy Sci.* 93(8):3487-3496.
- Alegría A, Alvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol.* 30;136(1):44-51.
- Almeida AC, Arruda FVF, Souza MA, Malett S, Jacques N, Casaregola S, Morais JM, Gusmão NB. 2011. **Avaliação da tolerância ao cloreto de sódio e produção de enzimas hidrolíticas de leveduras isoladas de queijo coalho**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Almeida PMP, Franco RM. 2003. Avaliação bacteriológica de queijo tipo minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e coliformes fecais. *Rev Hig Aliment.* v. 17(11): 79-85.
- Al-Otaibi MM. 2012. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts from Sameel milk: A Saudi traditional fermented milk. *Int J Dairy Sci.* 7(4) :73–83.
- Amann R, Fuchs B M, Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Curr Opin Biotechnol.* 12(3): 231-236.
- Ângelo FF, Ribeiro CS, Oliveira I, Araujo TF, Cardarelli HR. 2014. Bactérias psicrótróficas em leite cru refrigerado. *Rev cient med vet.* 1679-7353.
- Aponte M, Pepe O, Blaiotta G. 2010. Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. *J Dairy Sci.* 93(6): 2358-2361.
- Arcuri EF, Silva PDL, Brito MAVP, Brito JRF, Lange CC, Magalhães MMA. 2008. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrótróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Cienc Rur.* 38(8): 2250-2255.
- Atanassova MR, Fernandez-Otero C, Rodrigues-Alonso P, Fernández-No IC, Garabal JI, Centeno JA. 2016. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 53(Pt B):172-181.
- Aydemir O, Harth H, Weckx S, Dervişoğlu M, De Vuyst L. 2015. Microbial communities involved in Kasar cheese ripening. *Int J Food Microbiol.* 46:587-595.
- Baglinière F, Tanguy G, Jardin J, Matéos A, Briard V, Rousseau F, Robert B, Beaucher B, Humbert G, Dary A, Gaillard JL, Amiel C, Gaucheron F. 2012. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: implications for the stability of casein

- micelles of uht milks during their storage. *Food Chem.* 135(4): 2593-603.
- Bai M, Qing M, Guo Z, Zhang Y, Chen X, Bao QS, Zhanq H, Sun TS. 2010. Occurrence and dominance of yeast species in naturally fermented milk from the tibetan plateau of China. *Can J Microbiol.* 56(9): 707–714.
- Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, Detandt M, Hendrick M. 2014. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol.* 52(8): 826-834.
- Ben-Gigirey B, Vieites JM, Villa TG, Barros-Velazquez J. 2000. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *Int J Food Microbiol.* 57: 19-31.
- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 5(5): 908-917.
- Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J.* 11: 259–274.
- Bezerra TKA. 2015. **Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Paraíba.
- BRASIL. Portaria nº 7390 de 1 de fevereiro de 1990. Ministerios do Planejamento e da Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1 fev. 1990.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2002.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 dez. 2011.
- Bizzini A, Greub G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 16(11):1614-1619.
- Borelli BM, Ferreira EG, Lacerda ICA, Franco GR, Rosa CA. 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J Microb Biot.* 22(11): 1115–1119.
- Buňková L, Buňka F. 2017. Microflora of precessed cheese and the factors affecting it. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(11): 2392-2403.
- Calamari L, Gobbi L, Russo F, Cappelli FP. 2015. Pattern of γ -glutamyl transferase activity in cow milk throughout lactation and relationships with metabolic conditions and milk composition. *J Anim Sci.* 93(8): 3891-900.
- Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, Germini D, Medici MC, Chezzi C, De Conto F. 2014. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep.* 4:6803.
- Carpaj N, Willems RJ, Bonten MJ, Fluit AC. 2011. Comparison of the identification of coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and tufsequencing. *Eur J Clin*

- Microbiol Infect Dis. 30(10): 1169–72.
- Carvalho MCG, Silva DCG. 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. 735 Cienc Rur. 40(3): 735-744.
- Ceugniesz A, Drider D, Jacques P, Coucheney F. 2015. Yeast diversity in a traditional French cheese "Tomme d'orchies" reveals infrequent and frequent species with associated benefits. Food Microbiol. 52:177-184.
- Chen L, Daniel RM, Coolbear T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powder. Int Dairy J. 13(40): 255-275.
- Coelho KO, Mesquita AJ, Machado PF, Oliveira AN, Souza CM, Meyer PM. 2012. Níveis de células somáticas sobre a proteólise do queijo Mussarela. Rev Bras Saúde Prod Anim. 13(3): 682-693.
- Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M, Sinigaglia M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. Int J Food Microbiol. 69(1-2): 147-152.
- Costa M, Gómez MF, Molina LH, Romero A. 2001. Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración. ArchLatioam Nutri. Alan 5(4): 371-375.
- De Araujo VG, de Oliveira AMD, Dantas DFN, de Souza JMB, da Costa LM, da Conceição ML, Schaffner DW, Souza EL. 2017. Predicting and modelling the growth of potentially pathogenic bacteria in coalho cheese. J Food Prot. 80(7): 1172-1181.
- Decimo M, Morandi S, Sivetti T, Brasca M. 2014. Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. J Food Sci. 79(10): M2081-2090.
- De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, Messens W, Landshoot A, De Vos P. 2011. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. Appl Environ Microbiol. 77(2): 460-470.
- Delavenne E, Mounier J, Asmani K, Jany JL, Barbier G, Le Blay G. 2011. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. Int J Food Microbiol. 151(2): 247-251.
- Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholz J. 1996. Applications of the bacteriocin nisin. Int J. 69: 193–202.
- Dias G, Tavares GM, Carvalho AF, Furtado MM. 2012. Influência do uso de cultura adjunta nas características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo Camembert. Rev Inst Adolfo Lutz. 71(3): 500-506.
- Di Cagno R, Surico RF, Siragusa S, De Angelis M, Paradiso A. 2008. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. Int J Food Microbiol. 127: 220–228.
- El-Baradei G, Delacroix-Buchet AS, Ogier JC. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. Appl Environ Microbiol 73: 1248–1255.
- Ercolini D, Frisso G, Mauriello G, Salvatore F, Coppola S. 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. Int J Food Microbiol. 124: 164–170.
- Esteban-Torres M, Reverón I, Santamaría L, Mancheño JM, De-las-Rivas B, Muñoz R. The Lp_3561 and Lp_3562 Enzymes Support a Functional Divergence Process in the Lipase/Esterase Toolkit from *Lactobacillus plantarum*. 2016. Front Microbiol. 7:1118.
- Fadda ME, Mossa V, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S. 2004. Occurrence and

- characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int J Food Microbiol.* 15;95(1): 51-59.
- Feirtag JM, McKay LL. 1987. Thermoinducible lysis of temperature-sensitive *Streptococcus cremoris* strains. *J Dairy Sci* 70(9): 1779–1784.
- Ferreira AD, Viljoen BC. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured cheddar cheese. *Int J Food Microbiol.* 86(1-2): 131-140.
- Fleet GH. 1990. Yeasts in dairy products, A Review. *J Appl Bacteriol.* 68: 199-211.
- Flórez AB, Mayo B. 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol.* 110: 165–171.
- Fotou K, Tzora A, Voidarou Ch, Alexopoulos A, Plessas S, Avgeris I, Bezirtzoglou E, Akrida-Demertzi K, Demertzis PG. 2011. Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe.* 17(6): 315-319.
- FOX PF. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. 1989. *J Dairy Sci.* 72: 1379-1400.
- Fox PF, Mcsweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. 2004. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.** Volume 2. Major Cheese Groups. Published by Elsevier Academic Press. 3rd ed. 434p.
- Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2016. Characterization of the faecal bacterial community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). *FEMS Microbiol Ecol.* 92(3): fiw029.
- Frece J, Vrdoljak M, Filipčić M, Jelić M, Čanak I, Jakopović Ž, Pleadin J, Gobin I, Dragičević TL, Markov K. 2016. Microbiological quality and variability of natural microbiota in croatian cheese maturing in lambskin sacks. *Food Technol Biotechnol.* 54(2): 129-134.
- Fungaro MHP. 2000. PCR na Micologia. *Bioteχνologia Ciência e Desenvolvimento,* 14: 12-16.
- Galinari E, Nóbrega JE, Andrade NJ, de Lucas Fortes Ferreira CL. 2014. Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. *Braz J Microbiol.* 45(2): 713–720.
- Garabal JI, Rodríguez-Alonso P, Centeno JA. 2008. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). *LWT Food Sci. Technol.* 41:1452–1458.
- Gaucher I, Mollé D, Gagnaire V, Gaucheron F. 2008. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids.* 22: 130-143.
- Giannino JN, Buffoni E, Massone M, Feligini ML. 2011. Internal transcribed spacer as a target to assess yeast biodiversity in Italian Taleggio PDO cheese. *J Food Sci.* 76(7):M511-514.
- Gkatzionis K, Yunita D, Linforth RST, Dickinson M, Dodd CER. 2014. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *Int J Food Microbiol.* 177: 109–116.
- Golić N, Cadež N, Terzić-Vidojević A, Suranská H, Beganović J, Lozo J, Kos B, Sušković J, Raspor P, Topisirović L. 2013. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *Int J Food*

- Microbiol. 166(2): 294-300.
- González-Córdova AF, Yescas C, Ortiz-Estrada AM, Rosa-Alcaraz MA, Hernández-Mendonza A, Vallejo-Córdoba B. 2016. Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *J Dairy Sci.* 99: 3250–3262.
- Hantsis-Zacharov E, Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol.* 73: 7162-7168.
- Hassan AN.; Frank JF. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Ed.). **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Decker, 2001.
- Hayaloglu AA, Guven M, Fox PF, McSweeney PL. 2005. Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish White-brined cheese during ripening. *J Dairy Sci.* 88(10): 3460-3474.
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecol.* 35: 1-21.
- Heredia-Castro PY, Méndez-Romero JI, Hernández-Mendonza A, Acedo-Félix E, González-Córdoba AF, Vallejo-Córdoba B. 2015. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *J Dairy Sci.* 98(12): 8285-8293.
- Hrabák J, Chudáckova E, Walková R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 26(1): 103-114.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for foods. **Técnicas de análisis microbiológico**. Second Edition, 1982.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for foods. **Microbial Ecology of food commodities**. Second Edition, 2005.
- Irlinger F, Mounier J. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 20: 142-148.
- Izidoro TB.; Pereira JG, Soares VM, Pinto JPAN. 2013. Effect of psychrotrophic growth on the milk fat fraction at different temperatures of storage. *J Food Sci.* 78(4): 615-618.
- Jacques N, Casaregola S. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *Int J Food Microbiol.* 126: 321-326.
- Jakobsen M, Narvhus J. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy J.* 6: 755-768.
- Kato TO, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. 2016. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*. *PLoS One.* 11(7): e0159730.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. 1997. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Lippincott. Filadélfia, USA. pp. 1395.
- Kongo JM, Gomes AP, Malcata FX. 2008. Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. *J Food Prot.* 71(5): 986-992.
- Krieg NR, Holt JG. 1986. Bergey's **MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**.

- VOL.1. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. p.1-964.
- Kümmel J, Stessl B, Gonano M, Walcher G, Bereuter O, Fricker M, Grunert T, Wagner M, Ehling-Shulz M. 2016. *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Front Microbiol.* 13(7): 1603.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. 2011. **The yeasts, a taxonomic study.** Volume I. Elsevier BV.
- Lallemand E, Arvieux C, Coiffier G, Polard J-L, Albert J-D, Guggenbuhl P, Jolivet-Gougeon A. Use of MALDI-TOF mass spectrometry after liquid enrichment (BD Bactec™) for rapid diagnosis of bone and joint infections. 2017. *Res Microbiol.* 168: 122-129.
- Law BA. 1987. Proteolysis in relation to normal and accelerated chesse ripening. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology, general aspects.** London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1.
- Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol.* 15: 67–78.
- Lisita MO. 2005. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios.** Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- López CC, Serio A, Paparella A, Martuscelli M, Corsetti A, Tofalo R, Suzzi G. 2014. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Int J Food Microbiol.* 42: 117-121.
- Luiz JD, Simões BN, Tamostu SR, Casale A-AL, Walter SEH. 2010. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Arch Latinoam Nutri.* 60 (3): 261-269.
- MacFaddin JF. 2000. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.** Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. 480p.
- Macaluso G, Fiorenza G, Gaglio R, Mancuso I, Scatassa ML. 2016. In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional sicilian cheese making. *Int J Food Saf.* 5(1): 5503.
- Machado SG, Heyndrickx M, De Block J, Devreese B, Vandenberghe I, Van Coillie E. 2016. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. *Int J Food Microbiol.* 222: 65-71.
- Martins ES, Reis NEV. 2012. Determinação de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal. *Rev Bras Tecnol Agroind.* 06(02): 842- 851.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 560-4.
- Martinez BA, Stratton J, Bianchini A. 2017. Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *J Dairy Sci.* 100(2): 919-932.
- Melo ACM, Alves LMC, Costa FN. 2009. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo minas padrão comercializado na cidade de São Luis, MA. *Arq. Inst. Biol.* 76(4): 547-551.
- Melville PA, Benites NR, Ruz-Perez M, Yokoya E. 2011. Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk. *J Dairy Res.* 78(4): 385-390.

- Menezes MFC, Simeoni CP, Etchepare MA, Huerta k, Bortoluzzi DP, Menezes CR. 2014. Microbiota e conservação do leite. Rev Gest Edu Tecnol Amb - REGET – 18: 76-89.
- Montanhini MTM. 2012. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Bacillus cereus* isolados em produtos lácteos com relação ao seu comportamento psicrotrófico.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná.
- Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, Bethier F. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int J Food Microbiol. 177:136-154.
- Moreira NV, Montanhini MTM. 2014. Contaminação do leite na ordenha por microorganismos proteolíticos e lipolíticos. Rev Bras Hig Anim. 8(2): 29 -38.
- Murtaza MA, Ur-Rehman S, Anjum FM, Huma N, Hafiz I. 2014. Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 54(10): 1309-1321.
- Muyzer G, Wall EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 59(3): 695-700.
- Nakagawa T, Nakaoka T, Taniguchi S, Miyaji T, Tomizuka N. 2004. Isolation and characterization of psychophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. Lett Appl Microbiol. 38(5): 383-387.
- Nolte FS. & Caliendo AM. 2003. **Molecular detection and identification of microorganisms**, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press, Washington.
- Nornberg MFBL, Friedrich RSC, Weiss RDN, Tondo EC, Brandelli A. 2009. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. Int J D Technol. 63(1): 41-46.
- Okshevsky M, Regina VR, Marshall IP, Schreiber L, Meyer RL. 2017. Draft genome sequence of *Bacillus* sp. FMQ74, a dairy-contaminating isolate from raw milk. 2017. Genome Announc. 5(4): e01512-16.
- Oliveira DF, Bravo CEC, Tonial IB. 2012. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. Arq Bras Med Vet Zootec. 64 (2): 521-523.
- Osorio-Cadavid E, Ramírez M, López WA, Mambuscay LA. 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. Rev colomb biotecnol. 11(1): 125–131.
- Padilla B, Manzanares P, Belloch C. 2014. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. Food Microbiol. 38: 160-166.
- Paim TG, Reiter KC, Oliveira CF, d'Azevedo PA. 2013. Desempenho da metodologia por MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram-positivos isolados na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil. J Infect Control. 2(2): 112-116.
- Pasternak J. 2012. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. Einstein (Sao Paulo).10(1): 118-119.
- Paula JCJ, Carvalho AF, Furtado MM. 2009. Princípios básicos de fabricação de queijo: do Histórico à salga. Rev Inst Latic. "Cândido Tostes". 64: 19-25.

- Peláez C, Requena T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int Dairy J.* 15: 831–844.
- Perry KSP. 2004. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova.* 27(2): 293-300.
- Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MC. 2006. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Cien Tecnol Alim.* 26(3): 645-651.
- Pinto CLO, Machado SG, Martins ML, Vanetti MCD. 2015. Identificação de bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. *Rev Inst Lat Cândido T.* 70(2): 105-116.
- PORTARIA nº 73/90 (1990) de 1 de fevereiro. *Diário da República nº 27– I Série.* p. 436-438.
- Qvirist LA, De Fillipo C, Strati F, Stefanini I, Sordo M, Andlild T, Felis GE, Mattarelli P, Cavalieri D. 2016. Isolation, identification and characterization of yeasts from fermented goat milk of the yagnob valley in Tajikistan. *Front Microbiol.* 7:1690.
- Ranque S, Normand AC, Cassagne C, Murat JB, Bourgeois N, Dalle F, Toussaint-G M, Fourquet P, Hendrickx M, Piarroux R. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses.* 7(3): 135-140.
- Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi GN. 2008. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* 25(3): 452-459.
- Roostita R, Fleet GH. 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int J Food Microbiol.* 31(1-3): 205-219.
- Ruggirello M, Cocolin L, Dolci P. 2016. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiol.* 59:112-118.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12): 5463–5467.
- Santos MV, Fonseca LFL. 2007. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade de Leite.** Pirassununga: Ed. Manole, 314 p.
- Santos RC, Marin JM. 2005. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia.* 159: 251-253.
- Scatassa ML, Gaglio R, Macaluso G, Francesca N, Ranadazzo W, Cardamone C, Di Grigoli A, Moschetti G, Settanni L. 2015. Transfer, composition and technological characterization of the lactic acid bacterial populations of the wooden vats used to produce traditional stretched cheeses. *Food Microbiol.* 52: 31-41.
- Schmitt CI, Cereser ND, Bohrz DAS, Noskoski L. 2011. Contaminação do queijo colonial de produção artesanal comercializado em mercados varejistas do Rio Grande do Sul. *Veterinária Notícias. Universidade de Cruz Alta.* 17(2): 111-116.
- Silva CRB, Nabuco AC, Moretti BR, Penna ALB. 2006. Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato. *Rev Inst. Adolfo Lutz.* 65(3): 199-203.
- Silveira EL. 2004. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticaba, São Paulo.
- Skelin A, Mrkonjić Fuka M, Čanžek Majhenič A, Redžepović S, Samaržija D. 2012. Phenotypic and genotypic characterization of indigenous *Lactobacillus*

- community from traditional Istrian ewe's cheese. *Food Technol Biotech.* 50: 362–370.
- Sonnenberg R, Nolte AW, Tautz D. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology.* 4:6. doi: 10.1186/1742-9994-4-6.
- Spanamberg A, Ramos JP, Leoncini O, Alves SH, Valente P. 2009. High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. *Acta Sci Vet.* 37(2): 133-141.
- Spanamberg A, Hartfelder C, Fuentefria AM, Valente P. 2004. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in southern Brazil. *Acta Sci Vet.* 32(3): 195-199.
- Stulova I, Adamberg S, Krisciunaite T, Kampura M, Blank L, Laht TM. 2010. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Lett Appl Microbiol.* 51: 683-690.
- Suranská H, Raspor P, Uroić K, Golić N, Kos B, Mihajlović S, Begović J, Šušković J, Topisirović L, Čadež N. 2016. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional White pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. *Folia Microbiol (Praha).* 61(6): 455-463.
- Suzzi G, Lombardi A, Lanorte MT, Caruso M, Andrighetto C, Gardini F. 2000. Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water buffalo Mozzarella cheese. *J Appl Microbiol.* 88: 117-123.
- Tofalo R, Schirone M, Fasoli G, Perpetuini G, Patrignani F, Manetta AC, Lanciotti R, Corsetti A, Martino G, Suzzi G. 2015. Influence of pig rennet on proteolysis, organic acids content and microbiota of Pecorino di Farindola, a traditional Italian ewe's raw milk cheese. *Int J Food Microbiol.* 175: 121-127.
- Tondo EC, Bartz S. 2011. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos.** Porto Alegre: Sulina.
- Trani A, Gambacorta G, Loizzo P, Cassone A, Faccia M. 2016. Short communication: Chemical and sensory characteristics of Canestrato di Moliterno cheese manufactured in spring. *J Dairy Sci.* 99(8): 6080-6085.
- Tulio MSF, Campos ACLP, Feitoza AFD, Milo IS, Fagan EP. 2015. Pesquisa e identificação de enterobactérias isoladas de queijos artesanais comercializados em feiras – livres e mercados municipais nos estados de São Paulo e Paraná. V Jornada de Iniciação Científica da UENP. Universidade Estadual do Norte do Paraná/Campus Luiz Meneghel.
- Ünlü G, Nielsen B, Ionita C. 2015. Production of Antilisterial Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Dairy-Based Media: A Comparative Study. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 7(4): 259-274.
- Vasek OM, Mazza SM, Giori GS. 2013. Physicochemical and microbiological evaluation of corrientes artisanal cheese during ripening. *Food Sci Technol (Campinas)* 33(1): 151-160.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2009. Volume 3: The Firmicutes.
- Walker M, Rapley R. 1999. (Tradução Fernando Salvador Moreneo). **Guia de rotas na tecnologia do gene.** São Paulo: Editora Ateneu.
- Weig OBM, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Kuhns M. 2011. Improved clinical

- laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 17: 1359-1365.
- Westall S, Filtenborg O. 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiol.*15: 215-222.
- White T, Burns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in *PCR Protocols*, eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (San Diego: Academic Press), p. 315–322.
- Woese CR. 1987. **Bacterial Evolution**. *Microbiological Reviews*. 51(2): p. 221-271. American Society for Microbiology.
- Yam BZ, Khomeiri M, Mahounak AS, Jafari SM. 2015. Isolation and identification of yeasts and lactic acid bacteria from local traditional fermented camel milk, Chal. *J Food Process. Technol.* 6:460. doi: 10.4172 /2157-7110.1000460.
- Yvon M, Rijnen L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J.* 11(4/7): 185-201.
- Zacarchenco PB, Trento FKHS, Spadoti LM, Gallina DA, Sitva-élves AT. 2011. Bolors e leveduras em queijos. *Revista TecnoLat (ITAL)*. II(8): 92-99.
- Zaffari CB, Mello JF, Costa M. 2007. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria.* 37(3): 862-867.
- Zaffari CB. 2017. **Avaliação higiênico-sanitária e identificação genotípica de *Staphylococcus* sp. no processamento do queijo colonial produzido em agroindústrias familiares do Rio Grande do Sul**. Tese de doutorado em andamento.
- Zegarra JJQ, Botteon RCCM, Oliveira BCRS, Botteon PTL, Souza MM. 2009. Pesquisa de microorganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. *Cien Anim Bras.* 10(1): 312-321.
- Zilli JE, Rumjanek NG, Xavier GR, Coutinho HLC, Neves MCP. 2003. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília.* 20(3): 391-411.

APÊNDICE 1

Listagem de bactérias e leveduras isoladas de várias etapas da produção do queijo Colonial, identificadas pelos métodos de MALDI-TOF MS e/ou Sequenciamento parcial do gene RNA16Sr*

Nº da amostra	Etapa	MALDI TOF (Escore)	Sequenciamento RNA 16S (% homologia)	Identificação
1	leite	2.096	99	<i>Bacillus</i> sp.
2	leite	2.105	NE	<i>Bacillus</i> sp.
5	leite	2.290	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
6	leite	2.055	NE	<i>Bacillus</i> sp.
7	leite	2.121	99	<i>Bacillus</i> sp.
8	leite	2.086	99	<i>Bacillus</i> sp.
21	leite	2.250	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
28	leite	2.382	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
29	leite	2.110	97	<i>Staphylococcus aureus</i>
39	leite	2.115	NE	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
83	leite	2.549	100	<i>Raoutella ornithinolytica</i>
85	leite	2.438	NE	<i>Raoutella ornithinolytica</i>
90	leite	1.893	99	<i>Lactococcus lactis</i>
91	leite	2.238	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
98	leite	2.360	NE	<i>Raoutella ornithinolytica</i>
1A	leite	2.109	NE	<i>Candida guilliermondii</i>
1C	leite	1.945	NE	<i>Candida guilliermondii</i>
2L**	leite	1.922	99	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>
34L1	leite	2.062	NE	<i>Candida guilliermondii</i>
49L1	leite	2.182	NE	<i>Candida guilliermondii</i>
51L1	leite	1.988	NE	<i>Candida</i> sp.
52L1	leite	ENC	NE	Não identificada
55L1	leite	ENC	NE	<i>Tricosporum</i> sp.
55L2	leite	ENC	NE	<i>Tricosporum</i> sp.

APÊNDICE 1 Continuação...

Nº da amostra	Etapa	MALDI TOF (Escore)	Sequenciamento RNA 16S (% homologia)	Identificação
55L3	leite	ENC	NE	Não identificada
3	coalhada	2.387	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
4	coalhada	2.112	NE	<i>Bacillus mycoides</i>
9	coalhada	2.339	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
10	coalhada	2.338	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
11	coalhada	2.338	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
12	coalhada	2.163	96	<i>Lactococcus lactis</i>
23	coalhada	2.072	99	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
24	coalhada	2.271	100	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
30	coalhada	2.137	NE	<i>Staphylococcus warneri</i>
31	coalhada	2.60	99	<i>Staphylococcus warneri</i>
40	coalhada	2.216	99	<i>Staphylococcus xylosus</i>
41	coalhada	2.285	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
42	coalhada	2.337	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
43	coalhada	2.029	96	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
44	coalhada	2.311	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
100	coalhada	2.360	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
101	coalhada	2.006	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
13	pós salga	2.301	99	<i>Citrobacter freundii</i>
14	pós salga	2.523	NE	<i>Klebsiella varicola</i>
17	pós salga	3.337	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
18	pós salga	2.301	96	<i>Lactococcus lactis</i>
25	pós salga	2.341	NE	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
26	pós salga	2.341	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
32	pós salga	2.045	NE	<i>Staphylococcus warneri</i>
33	pós salga	2.163	NE	<i>Staphylococcus warneri</i>
34	pós salga	2.172	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
35	pós salga	2.348	100	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
46	pós salga	2.390	NE	<i>Lactococcus lactis</i>

APÊNDICE 1 Continuação...

Nº da amostra	Etapa	MALDI TOF (Escore)	Sequenciamento RNA 16S (% homologia)	Identificação
102	pós salga	2.563	99	<i>Paenibacillus humicus</i>
107	pós salga	2.363	NE	<i>Paenibacillus humicus</i>
108	pós salga	2.502	NE	<i>Paenibacillus humicus</i>
15	queijo	2.427	NE	<i>Klebsiella varicola</i>
16	queijo	2.246	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
19	queijo	2.308	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
20	queijo	2.332	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
27	queijo	2.311	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
36	queijo	2.042	96	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
37	queijo	2.042	NE	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
38	queijo	2.071	NE	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
47	queijo	2.228	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
81	queijo	2.359	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
96	queijo	2356	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
105	queijo	2.571	99	<i>Paenibacillus humicus</i>
109	queijo	2.326	NE	<i>Lactococcus lactis</i>
110	queijo	2.528	NE	<i>Paenibacillus humicus</i>
57L1	queijo	ENC	NE	Não identificada
57L2	queijo	ENC	NE	Não identificada
57L3	queijo	ENC	NE	Não identificada
58L1	queijo	ENC	NE	Não identificada
58L2	queijo	ENC	NE	Não identificada
58L3	queijo	ENC	100	<i>Trichosporon coremiiforme</i>
59L1	queijo	2.344	NE	<i>Candida pararugosa</i>
59L2	queijo	2.347	100	<i>Candida pararugosa</i>
60L1	queijo	ENC	NE	Não identificada
60L2	queijo	ENC	NE	Não identificada
60L3	queijo	ENC	NE	<i>Trichosporon</i> sp.
72L1	queijo	2.003	NE	<i>Candida pararugosa</i>
75L2	queijo	2.084	100	<i>Candida pararugosa</i>

APÊNDICE 1**Continuação**

Nº da amostra	Etapa	MALDI TOF (Escore)	Sequenciamento RNA 16S (% homologia)	Identificação
75L3	queijo	2.091	NE	<i>Candida guilliermondii</i>

* Tabela atualizada após a defesa da dissertação. Cepas não identificadas. Não foi possível o reisolamento.

** Em negrito: isoldados que foram sequenciados até o momento.

APÊNDICE 2

Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos feitos com bactérias e leveduras isoladas de várias etapas da produção do queijo Colonial

Nº da amostra	Gelad. ¹ 5°C	Lipase 30°C (mm)	Lipase 5°C (mm)	Casein ² . 30°C (mm)	Casein ² . 5°C mm	Lac. ³ 30°C	Litmus milk 30°C	Gram ⁴	End. ⁵	Cat. ⁶	OF ⁷	Coag. ⁸	Hem. ⁹	TSI	SIM	SIM	SIM	Ureia	C.. 10
															H ₂ S	mot	Indol		
1	N ¹¹	N	N	1	N	N	N	b GN	NV ¹²	NF ¹³	NF	NF	NF	AA ¹⁴	P ¹⁵	N	N	P	N
2	N	N	N	1	N	N	N	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	AA	P	N	N	P	N
5	P	1	N	5	N	N	COA ¹⁶	cb GP	NV	N	NN ¹⁷	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
6	P	1,5	N	5	N	N	COA	b GP	P	P	NF	NF	NF	NF	P	NF	NF	NF	NF
7	N	1	N	4	N	N	N	b GP	NV	NF	NF	NF	NF	AA	P	N	N	N	N
8	N	2	N	5	N	N	COA	b GP	P	P	NF	NF	NF	NF	P	N	NF	NF	NF
21	N	4	N	N	N	N	COA	cb GP	NV	P	PP ¹⁸	NF	NF	NF	N	M ¹⁹	N	NF	NF
28	N	2	1	3	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
29	N	4	1	2	N	N	COA	c GP	NV	P	NN	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
39	N	2	1	4	N	N	COA	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
83	N	1,5	1	N	N	N	COA	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	AA	NF	N	N	N	N
85	N	N	1	N	N	P	N	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	AA- Alc ²⁰	P	N	N	N	P
90	N	N	N	N	N	N	COA	c GP	NV	P	NN	N	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
91	N	3	1	N	N	N	N	c GP	NV	P	NN	N	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
98	N	1,5	N	N	N	P	N	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	AA	P	N	N	N	N
1A	N	N	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
1C	N	N	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
2L	N	2	N	N	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
34L1	P	2	N	4	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
49L1	P	N	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
51L1	P	1	N	N	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
52L1	N	2	N	N	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
55L1	P	2	N	N	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
55L2	N	2	N	N	N	P	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
55L3	N	1	N	N	N	P	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

APÊNDICE 2 Continuação...

Nº da amostra	Gelad. ¹ 5°C	Lipase 30°C (mm)	Lipase 5°C (mm)	Casein ² . 30°C (mm)	Casein ² . 5°C mm	Lac. ³ 30°C	Litmus milk 30°C	Gram ⁴	End. ⁵	Cat. ⁶	OF ⁷	Coag. ⁸	Hem. ⁹	TSI	SIM H ₂ S	SIM mot	SIM Indol	Ureia	C.. ¹⁰
3	N	N	N	2	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
4	P	N	N	1	2	N	COA	b GP	NV	P	NF	NF	NF	NF	P	N	NF	NF	NF
9	N	N	N	1	4	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
10	N	2	N	4	N	N	N	cb GP	NV	P	PP	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
11	N	2	N	5	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
12	N	N	N	2	N	P	COA	c GP	NV	N	NF	N	N	NF	NF	NF	NF	NF	NF
23	N	N	N	N	N	N	COA	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
24	N	2	1	4	N	N	COA	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
30	N	4	1	3	N	N	COA	c GP	NV	P	NN	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
31	N	1	N	3	3	N	N	c GP	NV	P	NN	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
40	N	N	N	1	N	N	N	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
41	N	N	1	2	1	N	COA	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
42	N	2	N	1	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
43	N	N	N	1	1	N	COA	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
44	N	3	N	2	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
100	N	N	N	2	N	N	COA	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
101	N	N	N	1	N	N	COA	c GP	NV	P	NN	N	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
13	N	N	N	4	N	P	N	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	AA	P	N	N	N	N
14	N	1	N	N	N	P	N	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	Alc-Alc	N	N	N	P	P
17	N	N	N	2	N	N	N	cb GP	NV	P	PP	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
18	N	2	N	3	N	N	N	cb GP	NV	P	PP	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
25	N	3	N	1	N	N	COA	c GP	NV	P	NN	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
26	N	N	N	2	N	P	COA	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
32	N	N	N	N	N	N	COA	c GP	NV	P	NN	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
33	N	4	N	N	N	N	N	c GP	NV	P	NN	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
34	N	2	2	2	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
35	N	3	1	N	N	N	COA	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
46	N	N	N	2	N	N	COA	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
102	N	N	N	N	N	P	N	cb GP	NV	P	FP	NF	NF	NF	P	N	N	NF	NF
107	N	N	N	N	N	N	COA	cb GP	NV	P	FP	NF	NF	NF	P	N	N	NF	NF

APÊNDICE 2 Continuação...

Nº da amostra	Gelad. ¹ 5°C	Lipase 30°C (mm)	Lipase 5°C (mm)	Casein ² . 30°C (mm)	Casein. ² 5°C mm	Lac. ³ 30°C	Litmus milk 30°C	Gram ⁴	End. ⁵	Cat. ⁶	OF ⁷	Coag. ⁸	Hem. ⁹	TSI	SIM	SIM	SIM	Ureia	C.. ¹⁰
															H ₂ S	mot	Indol		
108	N	N	N	3	N	P	ROSA	cb GP	NV	P	FP	NF	NF	NF	P	N	N	NF	NF
15	N	1	N	3	3	N	COA	b GN	NV	NF	NF	NF	NF	Alc-Alc	P	N	N	P	P
16	N	N	N	3	N	N	N	c GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
19	N	N	N	2	1	P	N	c GP	NV	N	NF	NF	N	NF	NF	NF	NF	NF	NF
20	N	N	N	1	N	P	COA	cb GP	NV	P	PP	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
27	N	N	N	N	N	P	N	c GP	NV	N	NF	NF	N	NF	NF	NF	NF	NF	NF
36	N	2	1	N	N	N	COA	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
37	N	N	N	N	N	N	N	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
38	N	1	N	N	N	N	N	c GP	NV	P	PP	P	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
47	N	3	N	5	N	N	N	cb GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	N	N	N	NF	NF
81	N	N	N	1	N	N	N	c GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
96	N	N	1	2	N	N	N	c GP	NV	N	NN	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
105	N	N	1	N	N	N	AZUL	cb GP	NV	P	FP	NF	NF	NF	P	N	N	NF	NF
109	N	N	N	1	N	N	N	c GP	NV	N	FP	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
110	N	N	N	1	N	N	N	cb GP	NV	P	FP	NF	NF	NF	P	N	N	NF	NF
57L1	P	5	N	N	N	P	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
57L2	P	4	N	2	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
57L3	P	2	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
58L1	P	2	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
58L2	P	2	N	1	N	P	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
58L3	N	1	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
59L1	P	1,5	N	N	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
59L2	P	4	N	N	N	N	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
60L1	P	1	N	N	N	P	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
60L2	N	1	N	N	N	P	COA	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
60L3	N	N	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
72L1	N	N	N	N	N	N	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
75L2	P	2	N	N	N	P	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
75L3	P	2	N	N	N	P	N	lev	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

APÊNDICE 2 Continuação...

- 1.** Crescimento a 5°C em geladeira. **2.** Teste de proteinase. Ágar leite desnatado; **3.** Teste de Fermentação da lactose; **4.** Morfologia após coloração de Gram: c+coco, b+bacilo, cb= cocobacilo, lev=levedura, GN=gram negativa, GP Gram positiva; **5.** Visualização de endósporo; **6.** Prova da Catalase; **7.** Teste de Oxidação-Fermentação Glicose; **8.** Teste da Coagulase em tubo; **9.** Teste de hemólise, sangue ovino; **10.** C, Teste de citrato. **11.** Negativo para o teste. **12.** não visualizado; **13.** Não executado. **14.** AA=. ácido base-ácido bisel. **15.** Positivo para o teste. **16.** Coagulação. **17.** NN=negativo para oxidação e para fermentação. **18.** PP= Positivo para oxidação e para fermentação. **19.** Motilidade positiva. **20.** alcalino-alcalino.