

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

GIOVANNA BRUNA KOIDE

**Caracterização microbiológica do queijo Colonial artesanal de Seara-SC baseada em metodologias clássicas e metataxonômica**

Florianópolis

2022

Giovanna Bruna Koide

**Caracterização microbiológica do queijo Colonial artesanal de Seara-SC baseada em metodologias clássicas e metataxonômica**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Florianópolis da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Farmacêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Silvani Verruck.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Koide, Giovanna Bruna

Caracterização microbiológica do queijo Colonial artesanal de Seara-SC baseada em metodologias clássicas e metataxonômica / Giovanna Bruna Koide ; orientadora, Silvani Verruck, 2022.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Queijo Colonial artesanal . 3. Análise microbiológica clássica. 4. Análise metataxonômica. 5. Microorganismos. I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Giovanna Bruna Koide

**Caracterização microbiológica do queijo Colonial artesanal de Seara-SC baseada em metodologias clássicas e metataxonômica**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia.

Florianópolis, 27 de julho de 2022.

---

Prof<sup>ta</sup>. Liliete Canes Souza Cordeiro, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenadora do Curso

**Banca examinadora**

---

Prof<sup>ta</sup>. Silvani Verruck, Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Marília Miotto, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>ta</sup>. Isabela Maia Toaldo Fedrigo, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

Esse trabalho é dedicado aos meus pais, amigos e aos meus familiares que perdi durante esse ano: meu avô (*in memoriam*) e minha prima-tia (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais, Dilce Dirlei Trombetta Koide e Otávio Matimoto Koide, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, estando comigo nos bons e maus momentos.

A minha irmã Mélanie Victória Koide que está sempre comigo não importa o que aconteça, me apoiando e aconselhando sempre que preciso.

A todos os meus amigos que estão sempre presentes e que torcem pelo meu sucesso, em especial para aqueles que fizeram parte dessa jornada, Douglas Coutinho e Karoline Zermiani, obrigada por todos esses anos, sentirei saudades.

A minha orientadora, Silvani Verruck, que aceitou ser minha orientadora, prestou ajuda sempre que precisei e teve paciência para auxiliar nesse trabalho.

A mestranda, Vanessa Cortina Zanetti, que me ajudou e me auxiliou quando eu precisei.

A todos os professores que passaram por mim durante a graduação, nada disso seria possível sem o ensinamento de cada um.

Aos meus colegas, pelos momentos de estudos, ajudas e alegrias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro nas análises deste trabalho, sob termo de outorga nº 2021TR001446.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para que isso se tornasse possível.

E por fim, agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina por todos os ensinamentos durante esses anos de graduação.

## RESUMO

Queijos artesanais são amplamente produzidos e consumidos no Brasil e no mundo. É um alimento que além da popularidade, também é de bastante importância para aqueles que dependem da renda através da comercialização desse alimento. Na região Sul, um dos queijos artesanais mais comuns é o queijo artesanal Colonial. O queijo artesanal Colonial, por ser produzido a partir de leite cru pode apresentar uma microbiota abundante. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi compreender melhor a ecologia bacteriana e fúngica do queijo artesanal Colonial produzido na região de Seara-SC, utilizando de ferramentas microbiológicas clássicas e da metataxonômica ao longo de 21 dias de maturação. Na microbiologia clássica foram realizadas as análises de bactérias aeróbias mesófilas, bactérias ácido lácticas, Enterobacteriaceae, bolores e leveduras, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* e toxina estafilocócica. Além disso, para a análise metataxonômica a identificação das bactérias foi realizada através do sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. Já para a identificação dos fungos foi utilizado o sequenciamento da região ITS1, sendo realizada a amplificação dos *primers* ITS1 e ITS2. Na análise microbiológica clássica, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e toxina estafilocócica estavam ausentes. Porém, a ecologia microbiana complexa deste tipo de produto acarretou altas contagens (média de todos os dias de maturação avaliados) de microrganismos aeróbios mesófilos (7,88 log UFC/g), bolores e leveduras (6,74 log UFC/g), bactérias ácido lácticas (8,36 log UFC/g), Enterobacteriaceae (4,81 log UFC/g), *E. coli* (4,33 log UFC/g) e *S. coagulase positiva* (3,23 log UFC/g). Na análise metataxonômica de bactérias foram identificados 4 filos, 34 gêneros e 69 espécies nas amostras. Sendo as espécies *Lactococcus sp.* (45,87%), *Corynebacterium variabile* (14,70%), *Staphylococcus saprophyticus* (11,76%) e *Citrobacter freundii* (7,36%) as mais abundantes, considerando todas as amostras. Houve uma grande porcentagem de bactérias ácido lácticas encontradas nas amostras, principalmente nos dias 1 (CFd1), 14 (CFd14) e 21 (CFd21) de maturação. As espécies encontradas pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Weissella*. Dentro estes, *Lactococcus spp.* foi o mais abundante, apresentando valores de 61,48%, 75,92% e 45,76%, em CFd1, CFd14 e CFd21, respectivamente. Para fungos, foram identificados 2 filos, 25 gêneros e 38 espécies. As espécies mais abundantes foram *Diutina catenulata* (93,98%), *Kodamaea ohmeri* (1,85%), *Geotrichum candidum* (0,87%), *Candida intermedia* (0,56%), uncultured *Galactomyces* (0,75%), *Debaryomyces hansenii* (0,48%) e *Kluyveromyces marxianus* (0,39%). O uso de ferramentas mais avançadas, no qual se fez um sequenciamento genético, permitiu identificar quais as espécies que mais predominam na microbiota do queijo Colonial artesanal durante 21 dias de maturação, obtendo uma compreensão mais avançada da ecologia bacteriana deste produto.

**Palavras-chave:** 1. Microbiologia de alimentos 2. Metagenômica 3. Metataxonômica 4. Queijo artesanal.

## ABSTRACT

Artisanal cheeses are widely produced and consumed in Brazil and worldwide. It is a food that, in addition to its popularity, is also of great importance for those who depend on income through the marketing of this food. In the South region, one of the most common artisanal cheeses is Colonial artisanal cheese. Colonial artisanal cheese, as it is produced from raw milk, may have an abundant microbiota. Therefore, the objective of this work was to better understand the bacterial and fungal ecology of artisanal Colonial cheese produced in the region of Seara-SC, using classic and metataxonomic microbiological tools over 21 days of maturation. In classical microbiology, analyzes of mesophilic aerobic bacteria, lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae, molds and yeasts, *Escherichia coli*, coagulase positive Staphylococci, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and staphylococcal toxin. In addition, for the metataxonomic analysis, the identification of bacteria was performed through high-performance sequencing of the V3/V4 regions of the 16S rRNA gene. For the identification of fungi, the sequencing of the ITS1 region was used, with the amplification of the ITS1 and ITS2 primers being performed. In the classic microbiological analysis, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and staphylococcal toxin were absent. However, the complex microbial ecology of this type of product resulted in high counts (average of all evaluated maturation days) of mesophilic aerobic microorganisms (7.88 log CFU/g), molds and yeasts (6.74 log CFU/g), lactic acid bacteria (8.36 log CFU/g), Enterobacteriaceae (4.81 log CFU/g), *E. coli* (4.33 log CFU/g) and *S. coagulase positive* (3.23 log CFU/g). In the metataxonomic analysis of bacteria, 4 phyla, 34 genera and 69 species were identified in the samples. As the species *Lactococcus* sp. (45.87%), *Corynebacterium variabile* (14.70%), *Staphylococcus saprophyticus* (11.76%) and *Citrobacter freundii* (7.36%) were the most abundant, considering all samples. There was a large percentage of lactic acid bacteria found in the samples, mainly on days 1 (CFd1), 14 (CFd14) and 21 (CFd21) of maturation. The species found belong to the genera Enterococcus, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Weissella*. Within these, *Lactococcus* spp. was the most abundant, presenting values of 61.48%, 75.92% and 45.76%, in CFd1, CFd14 and CFd21, respectively. For fungi, 2 phyla, 25 genera and 38 species were identified. The most abundant species were *Diutina catenulata* (93.98%), *Kodamaea ohmeri* (1.85%), *Geotrichum candidum* (0.87%), *Candida intermedia* (0.56%), uncultured *Galactomyces* (0.75%), *Debaryomyces hansenii* (0.48%) and *Kluyveromyces marxianus* (0.39%). The use of more advanced tools, in which genetic sequencing is carried out, made it possible to identify which species predominate in the microbiota of artisanal Colonial cheese during 21 days of maturation, obtaining a more advanced understanding of the bacterial ecology of this product.

**Keywords:** 1. Food microbiology 2. Metagenomics 3. Metataxonomics 4. Artisanal cheese.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Processo de produção do Queijo Colonial artesanal. ....	15
<b>Figura 2:</b> Espécies de bactérias encontradas nas amostras CFd1, CFd7, CFd14 e CFd21 através da análise metataxonômica.....	34
<b>Figura 3:</b> Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com um dia de maturação (CFd1).....	35
<b>Figura 4:</b> Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com sete dias de maturação (CFd7). ....	38
<b>Figura 5:</b> Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com quatorze dias de maturação (CFd14).....	40
<b>Figura 6:</b> Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com vinte e um dias de maturação (CFd21).....	41
<b>Figura 7:</b> Fungos mais encontrados nas amostras CFd1, CFd7, CFd14 e CFd21 através da análise metataxonômica. ....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resultados das análises físico-químicas das amostras de queijo Colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação. ....	27
<b>Tabela 2:</b> Resultados das análises microbiológicas das amostras de queijo Colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação. ....	28

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
2.1	QUEIJO COLONIAL.....	14
2.2	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS NA MICROBIOTA DOS QUEIJOS.....	17
2.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	19
2.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	20
2.5	ANÁLISE METATAXÔNOMICA.....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
	OBJETIVO GERAL.....	24
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	AMOSTRAS .....	25
4.2	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	25
4.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA CLÁSSICA .....	25
4.4	ANÁLISE METATAXONÔMICA .....	26
4.5	BIOINFORMÁTICA.....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
5.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	27
5.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA CLÁSSICA .....	27
5.3	ANÁLISE METATAXONÔMICA DE BACTÉRICAS.....	33
5.4	ANÁLISE METATAXONÔMICA DE FUNGOS.....	42
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Queijos são produtos amplamente comercializados e consumidos no Brasil, sendo que muitos deles são produzidos artesanalmente, no qual são divididos conforme a sua região de origem. Para a região Norte tem-se o queijo Marajó, para a região Centro-Oeste há o queijo Caipira, para a região Nordeste os queijos Coalho e de Manteiga, para o Sudeste o queijo Minas artesanal e por fim, na região Sul tem-se o queijo Serrano e o queijo Colonial (KAMIMURA *et al.*, 2019a). Esses queijos possuem uma grande importância para a economia do país, além de serem importantes para a renda de famílias que depende da comercialização e consumo desses tipos de queijos (SILVA, 2016). Na região Sul os queijos artesanais mais comuns são o Colonial e o Serrano. Para a sua produção deve ser utilizado o leite cru, sendo que cada um possui seu método de produção específico, contudo o mais utilizado é o leite cru em conjunto com uma cultura de soro natural (KAMIMURA *et al.*, 2019a; 2019b). Produtos artesanais possuem métodos que são passados de geração em geração, através de técnicas tradicionais.

O queijo Colonial artesanal tem uma longa tradição de produção e consumo no Sul do Brasil. Esse tipo de produto possui uma microbiota específica, típica da região em que são produzidos, essa microbiota é constituída por cepas dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, principalmente. São muito importantes para o produto, pois garantem a segurança e características sensoriais específicas nos queijos (KAMIMURA *et al.*, 2019b). Portanto, para proteger o aspecto tradicional desses produtos, é essencial entender a ecologia microbiana durante a fermentação, estudando as mudanças dinâmicas que ocorrem, além de selecionar culturas *starters* autóctones que poderiam ser usadas na sua produção. Além disso, muitas cepas bacterianas e fúngicas ainda não foram devidamente identificadas e caracterizadas. Essas cepas podem oferecer potenciais benefícios a saúde do consumidor, bem como serem importantes atores na segurança dos produtos artesanais (ASSIS, 2010).

Para identificar e caracterizar bactérias e fungos existentes nos queijos pode-se fazer análises através de técnicas microbiológicas clássicas (BERESFORD *et al.*, 2001). Pode-se utilizar métodos bioquímicos clássicos quantitativos e qualitativos, como por exemplo, contagem padrão em placas, citometria de fluxo, microscopia direta, teste da redutase, entre outros (CASSOLI, 2005; NUNES, 2017; SANT ‘ANNA, 2019). As técnicas de identificação podem ser dependentes de cultivo (análises clássicas) ou independentes. As análises clássicas apresentam desvantagens em relação as independentes, pois o crescimento é limitado por conta da ausência de meios de culturas específicos, como também apresenta dificuldade de recuperação de alguns dos microrganismos por fatores intrínsecos ( $a_w$ , pH) e extrínsecos

(umidade, temperatura). Os métodos mais utilizados para determinação total de microrganismos através de métodos de cultura e isolamento em leite e em produtos lácteos são: Contagem de Placas (CPP) para microrganismos viáveis, Número Mais Provável (NMP), Contagem por Microscopia Direta (CMD) e redução de corantes. A técnica de contagem de placas é a mais utilizada, principalmente para determinação do número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC) nos alimentos analisados (SANT'ANNA, 2019).

Esses métodos tradicionais possuem algumas vantagens por serem bem estabelecidos, contudo são mais trabalhosos, e parte dos microrganismos presentes no alimento podem não ser recuperados em sua totalidade devido à fastidiosidade. Além disso, podem ocorrer falhas operacionais, obtendo resultados errôneos, no qual pode ser causado pela alta temperatura do ágar fundido que é utilizado para semear por profundidade e possui riscos de contaminação ou por haver muitas etapas no preparo e semeadura (NERO *et al.*, 2000). Sabendo disso, outras técnicas que utilizam de sequenciamento genético foram surgindo, a fim de facilitar a identificação dos microrganismos (SANGER *et al.*, 1975).

Neste sentido, as técnicas de sequenciamento completo ou parcial do genoma microbiano representam uma mudança na maneira como os produtos artesanais podem ser compreendidos e produzidos. De fato, a aplicação da metataxonômica permite uma compreensão detalhada da ecologia microbiana presente nestes produtos. Desta forma, o conhecimento aprofundado dos mecanismos por trás dos processos biológicos aumentará o controle e a modulação da fermentação/maturação para obter produtos com as propriedades organolépticas desejadas, além de impulsionar o setor, incentivando a regionalidade intrínseca desses produtos.

No entanto, a falta de cuidados com as Boas Práticas de Fabricação (BPFs) durante a produção e processamento pode facilitar o crescimento de microrganismos patogênicos nos queijos artesanais (CAMPOS *et al.*, 2018). Sabendo disso, pode-se encontrar alguns microrganismos na microbiota, como: Enterobacteriaceae, bolores e leveduras, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* (GALLO *et al.*, 2020; LOURENCO *et al.*, 2020). Da mesma forma, como ocorre com os microrganismos benéficos que podem ser identificados e isolados dos queijos artesanais, a análise genotípica também pode ser uma importante aliada para a identificação de patógenos (RIBEIRO *et al.*, 2016). Sendo assim, este estudo utilizou metodologias clássicas e a abordagem metataxonômica para caracterizar microbiologicamente o queijo Colonial artesanal.

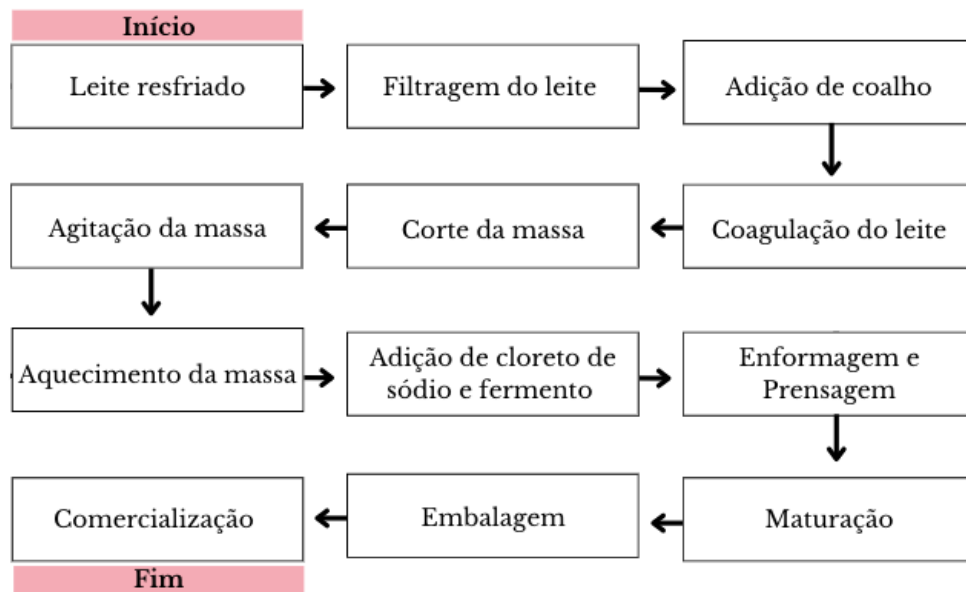
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Queijo Colonial

O queijo Colonial inicialmente era feito pelos açorianos, mas com a vinda dos imigrantes italianos e alemães houve uma produção por parte desses povos no Brasil. No começo esses imigrantes estavam na Serra Gaúcha, depois passam a estar mais presentes no Vale do Taquari. A partir do século XX, eles começam a ir para o oeste de Santa Catarina, formam colônias e produzem o queijo nessas regiões, em razão disso o queijo foi batizado como “Colonial”. Inicialmente era fabricado para consumo familiar, juntamente com outros alimentos, como biscoitos, geleias, produtos suínos e massas (KAMIMURA *et al.*, 2019b). É um queijo muito comum nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, produzido a partir de leite cru, com a característica de possuir uma crosta dura ou semidura, com a massa por dentro mais macia e cremosa, amarelada e podendo ter furos. Apresenta um sabor levemente aromático e picante, sendo um queijo considerado semigordo. Além disso, à temperatura alta é um queijo que derrete e a temperatura ambiente é um queijo fácil de ser cortado (KAMIMURA *et al.*, 2019b).

Para o processo de produção do queijo Colonial artesanal são necessários 3 ingredientes considerados obrigatórios, sendo eles: leite cru, coalho ou coagulante e cloreto de sódio. Além desses, tem-se os opcionais, os quais são: fermento lácteo (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), vinho ou outra bebida que seja permitida, corante natural, tempero/condimento, alimento inteiro ou em pedaços e outras substâncias alimentícias naturais (SANTA CATARINA, 2021). Para a elaboração do queijo Colonial artesanal, segundo a Lei nº 18.250, de 10 de novembro de 2021, Art. 7º, utiliza-se leite cru, podendo ter leite de duas ordenhas sequenciais (desnate do leite quando utilizado junção de leite de duas ordenhas sequenciais é opcional), pode-se salgar o leite, na massa ou na superfície do queijo (a seco ou em salmoura), massa pode ser crua ou semicozida, prensagem manual ou mecanizada, a maturação em temperatura ambiente ou com refrigeração/climatização de no mínimo 5°C em no mínimo 5 dias para garantia da inocuidade microbiológica, pode-se utilizar utensílios de madeira e a realização do tratamento da casca pode ser feito com corante de forma natural ou alimentícia, mas é opcional (Figura 1) (SANTA CATARINA, 2021).

**Figura 1:** Processo de produção do Queijo Colonial artesanal.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Por esses produtos não passarem por processos de pasteurização, eles possuem uma legislação própria, que permite que o produto seja produzido. Segundo a Instrução Normativa nº 57/2011, art. 1º resolve: “Art. 1º. Permitir que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto (MAPA, 2011a).

Em 2013 produziu-se a Instrução Normativa nº 30/2013 que além de flexibilizar o processo de certificação para queijeiros artesanais, também definiu que o período de maturação pode ser feita após a avaliação dos estudos pelo serviço de fiscalização estadual e/ou municipal, industrial e sanitária reconhecido pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal - SISBI/POA; permitiu também a comercialização pelos produtores, desde que os bovinos tenham controle contra a brucelose e tuberculose pelos órgãos estaduais de Defesa Sanitária Animal há pelo menos 3 anos a partir da data de publicação da Instrução Normativa e implantou o Programa de Controle da Mastite com a realização de exames para detecção da doença, mas sem periodicidade pré-fixada (MAPA, 2013). O leite cru precisa ser processado imediatamente ou armazenado corretamente, além da necessidade de realização de exames de mastite nos animais, pois pode ser a principal fonte de *Staphylococcus aureus* nos queijos, como também de *Escherichia coli* (CARVALHO *et al.*, 2019).

Além disso, para a produção artesanal do queijo Colonial a partir do leite cru, há ainda outras exigências necessárias. Segundo a lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018, relacionada com a produção e comercialização dos queijos artesanais do Estado de Santa Catarina, é importante que a água utilizada para a produção seja potável e clorada (pode utilizar água não clorada desde que comprovado que não há contaminação microbiológica através de análises na água a cada 4 meses), reservatório devidamente higienizados (no mínimo a cada semestre) e é necessário realizar as análises microbiológicas e físico-químicas na água utilizada para a produção do queijo (SANTA CATARINA, 2018). Outro aspecto importante é em relação ao próprio leite que vai ser utilizado, sendo necessário tomar os devidos cuidados com os animais, realizando exames corretamente, obtendo boas condições de higiene e o leite passar por um processo de filtração antes de qualquer processo. (SANTA CATARINA, 2018).

Ainda na mesma Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018, é estabelecido os cuidados essenciais para a produção e comercialização, no qual é imprescindível certos cuidados, como: utilizar leite cru que seja de alta qualidade e que tenha um controle de zoonoses nesses animais (para brucelose e tuberculose); utilização de água potável e clorada e uma boa prática de ordenha e fabricação para uma boa qualidade dos queijos, com padrões microbiológicos corretos (CARVALHO *et al.*, 2019). Outro ponto importante para que seja produzido um queijo de qualidade sem que haja algum problema, são as próprias queijarias, sendo que segundo a Seção III da lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018 resolve: “Art. 8º. A queijaria deve dispor de ambientes adequados para: recepção do leite, higienização de mãos e calçados (barreira sanitária), fabricação, maturação (quando aplicável), embalagem, estocagem (quando necessário), expedição e almoxarifado.” Além disso, são necessárias as boas práticas de ordenha e fabricação, com práticas de higiene pessoal, a utilização de uniformes adequados, toucas e calçados próprios e limpos, como também realização de exames anualmente (SANTA CATARINA, 2018).

Os queijos artesanais precisam do selo de inspeção, posto isso, em 2018, a Lei n.º13.680, de 14 de junho de 2018 cria um selo estadual “ARTE”, que identifica os produtos artesanais que podem ser comercializados no país (BRASIL, 2018).

Segundo a Lei nº 18.250 de 10 de novembro de 2021, o queijo Colonial artesanal precisa ter consistência macia, firme ou dura e textura elástica, amanteigada ou quebradiça, sendo de cor amarelada, com sabor ligeiramente ácido ou amendoado e odor lácteo, no formato redondo, quadrado ou retangular, com peso variável de 0,4 kg a 8 kg e quando utilizado algum ingrediente opcional, deve ter a mesma cor deste ingrediente (SANTA CATARINA, 2021).



No começo de julho deste ano (2022), foi publicada a Instrução Normativa nº 161 de 1º de julho de 2022, atualizando as listas de padrões microbiológicos de alimentos. Sendo assim, para a categoria dos queijos, enterotoxinas estafilocócicas e *Salmonella spp.* devem ser ausentes, estafilococos coagulase positiva apresenta limite tolerável de  $10^3$  UFC/g e *Escherichia coli* para queijos com umidade igual ou superior a 46%, apresenta limite máximo de  $10^3$  UFC/g (ANVISA, 2022).

## 2.2 Microrganismos encontrados na microbiota dos queijos

As espécies de *Lactobacillus* são anaeróbicas facultativas, Gram-positivas, fermentadoras de lactose, microaerófilas, geralmente de catalase negativa, não formam esporos e apresentam variação da morfologia, podendo ser encontrada como cocobacilos ou pequenos bastonetes. Esse gênero é mais encontrado em produtos lácteos, como iogurtes, kefir, queijo e soro de leite coalhado e são consideradas como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (SILVA, 2016; JESEWSKA-FRACKOWIAK *et al.*, 2018).

*Leuconostoc* são cocos Gram-positivos que apresentam capacidade de produzir bacteriocinas, apresentando atividade contra a *Listeria monocytogenes*. É um gênero heterofermentativo, ou seja, são fermentadoras de glicose, produzem ácido lático, etanol e CO<sub>2</sub>. Não são consideradas patogênicas, sendo muito utilizadas para a fermentação, porém possuem a capacidade de deteriorar alimentos rapidamente. Juntamente com *Lactococcus* são utilizados para produção de sabor e melhoria da textura, através da produção de gás em queijos (D'ANGELO *et al.*, 2017; FRANCO, 2008). Enquanto isso, *Lactococcus* são bactérias bacilo Gram-positivas, catalase-negativa e produtoras de ácido lático a partir da glicose, ou seja, são homofermentativas (FRANCO, 2008).

Por outro lado, queijos artesanais também estão suscetíveis a apresentarem microrganismos patogênicos em sua composição, principalmente quando as Boas Práticas de Fabricação (BPFs) não são cuidadosamente levadas em consideração durante a sua produção (CAMPOS *et al.*, 2018). Sabendo disso, há diversos microrganismos que podem ser encontrados na microbiota do queijo artesanal, sendo eles: Enterobacteriaceae, bolores e leveduras, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp* (GALLO *et al.*, 2020; LOURENCO *et al.*, 2020).

A família dos Enterobacteriaceae é a maior e mais variada, compreendendo bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, em forma de bastonete e não formam esporos. Há algumas bactérias que são capazes de produzir ácido e gás através do consumo de lactose,

consideradas bactérias coliformes, muito utilizadas como indicadores higiênicos-sanitários nas indústrias de alimentos e água. Por ser bem ampla, na família Enterobacteriaceae há cepas que não são patogênicas, entretanto algumas podem causar doenças, ou seja, o crescimento dessas bactérias pode ocorrer por uma falta de higiene durante o processo de produção do queijo. (MLADENOVIIY *et al.*, 2021). Dentre as bactérias patogênicas incluídas nesta família destacam-se a *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*. A infecção por *Salmonella spp.* causa gastroenterite, pois as bactérias agridem a parede intestinal e causam dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, febre, dor de cabeça, podendo ainda levar a morte em casos mais graves (GALLO *et al.*, 2020; LOURENCO *et al.*, 2020). Outra contaminação que pode ocorrer é por *Escherichia coli*, que geralmente é comensal, ou seja, não é sempre patogênico. Reside no lúmen intestinal de forma inofensiva em humanos e animais, entretanto, pode se tornar patogênico adquirindo genes de virulência (OMBARAK *et al.*, 2018). Geralmente está relacionado com algum hospedeiro debilitado ou imunossuprimido, por causar um enfraquecimento das barreiras intestinais. Quando há infecção por *E. coli*, pode causar infecção do trato urinário, sepse/meningite e doença entérica/diarreica (RIBEIRO *et al.*, 2016). Além disso, *E. coli* pode ser utilizada como forma de indicador para avaliar pasteurização, se está adequada ou não e se há más condições de higiene no processamento ou no pós-processamento. A contaminação dos produtos lácteos por *E. coli* pode acontecer por uma falta de higiene, longos períodos de transporte ou falta de instalações de armazenamento adequadas. A principal forma de propagação é por contaminação fecal durante o processo de ordenha (CAMPOS *et al.*, 2018).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica humana, sendo um microrganismo que consegue sobreviver em ambientes de baixa temperatura, pH, concentração de sal e com baixa quantidade de água (BERNINI *et al.*, 2013). Sendo assim, em produção de queijos, principalmente de queijos moles ou semi-duros, *L. monocytogenes* consegue sobreviver por longos períodos em diferentes locais. Essa capacidade de *L. monocytogenes* de sobreviver em ambientes alimentícios é por conta da sua capacidade de inserir e produzir biofilmes em superfícies inertes, sendo que essa produção de biofilmes por partes de microrganismos é favorecida quando o ambiente não é higiênico e não possui uma rotina de limpeza e desinfecção, principalmente em áreas de difícil acesso (LAHOU *et al.*, 2017). Os biofilmes tornam as bactérias mais resistentes, dificultando ainda mais a sua remoção do ambiente de processamento (BERNINI *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2017).

*Staphylococcus aureus* podem ser encontrados em produtos lácteos com bastante frequência e são microrganismos capazes de produzirem biofilmes, ou seja, se tornam mais

resistentes, possibilitando a sobrevivência em ambientes hostis. É comum encontrar esses microrganismos em queijos de pasta mole, por apresentarem um bom substrato nutricional e alta aw (ALVES *et al.*, 2018). Uma contaminação acontece quando o *Staphylococcus aureus* já está em uma matéria-prima contaminada (nesse caso o leite cru), ocorrência de um manuseio inadequado dos alimentos, falta de limpeza, ocasionando equipamentos de processamento de laticínios e ambiente contaminados. Neste caso, podem ocorrer intoxicação alimentar estafilocócica (SEP), através da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (SE) produzidas por cepas de *Staphylococcus spp.*, que são resistentes ao ambiente gástrico e termoestáveis. Essas intoxicações são muito comuns e principalmente relacionadas com queijos de leite cru e produção e queijo artesanal (JOHLER *et al.*, 2018).

Uma contaminação que também pode ocorrer em queijos é por fungos. Os bolores que podem ser encontrados nas superfícies dos queijos são do gênero *Penicilium spp.* e em todo o queijo são *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Scopulariopsis spp.* e *Verticillium spp.* (AMARAL *et al.*, 2020). Além deles, pode ocorrer a contaminação de leveduras, sendo que os mais frequentes são *Candida spp.*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii* e *Pichia spp* (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Tanto bolores quanto leveduras são microrganismos que preferem ambientes úmidos e com alta quantidade de sal (GALLO *et al.*, 2020). Além disso, a presença e desenvolvimento desses fungos, quando não desejado, pode causar odores desagradáveis nos queijos, sendo que quando há essa contaminação, prejudica a qualidade e vida e prateleira do produto, pois geralmente são considerados deteriorantes de produtos lácteos (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Entretanto, alguns fungos também são utilizados de forma benéfica para melhoria das características organolépticas de determinados queijos, como Gorgonzola, Camembert, Curado, entre outros (SILVA *et al.*, 2017).

### 2.3 Análise Físico-Química

Para a análise físico-química, o pH é importante para caracterizar os queijos, justamente por ter bastante influência na textura, atividade microbiana e maturação, por conta de reações químicas que podem ocorrer ao serem catalisadas por enzimas que estão no coalho e pertencentes da microbiota. Quando o queijo apresenta um pH próximo a neutralidade, isto favorece para o crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos (SOUSA *et al.*, 2014).

Já em relação a umidade, este é um parâmetro que interfere na atividade da água e ações metabólicas de microrganismos durante a maturação, sendo os queijos mais duros, mais desidratados e conservados. A variação de umidade que pode ocorrer entre os queijos pode ser por conta da diferença de matéria-prima ou por conta do processamento, sendo assim, a elaboração e a manipulação da coalhada podem interferir na umidade de cada queijo (SOUSA *et al.*, 2014).

## 2.4 Análise Microbiológica

Para a análise de microrganismos utilizando da análise clássica, a contagem de placas é a mais empregada na determinação do número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC), entretanto esse método apresenta desvantagens, como grande consumo de tempo e material. O método do número mais provável (NMP) pode utilizado para determinar coliformes fecais e/ou termotolerantes. Já a microscopia direta é utilizada para verificar a qualidade microbiológica de leite cru e derivados, possui a vantagem de ser rápido e simples, permitindo que seja possível analisar a morfologia da bactéria. Contudo, também apresenta desvantagens, pois não é possível fazer a diferenciação entre células viáveis e não-viáveis, pode haver uma confusão ao distinguir bactérias de partículas de alimentos e a distribuição do esfregaço sempre será irregular. Por fim, a técnica de redução de corante possui a vantagem de ser simples, possuir baixo custo, detecta células viáveis, entretanto pode não corar todos os microrganismos igualmente e não se aplica a alimentos com enzimas redutores. Os corantes mais utilizados são azul-de-metileno e resazurina (SANT'ANNA, 2019). A indústria láctea utiliza corante resazurina como indicador sanitário-higiênico, mas não é reproduzido resultados que possam ser correlacionados com a contagem de bactérias no leite (NERO *et al.*, 2000).

A contagem total de aeróbios mesófilos em placas não consegue diferenciar os gêneros e espécies de bactérias, sendo assim é muito utilizada para obter informações sobre a qualidade do produto, sobre as práticas de manufatura, matérias-primas utilizadas, com está o processamento, manipulação e vida de prateleira. Não é indicador de segurança, mas pode ser importante para avaliar a qualidade do produto, indicando se há ou não boas práticas de higiene, falhas durante o processamento dos alimentos ou contaminação nos próprios alimentos. Como o queijo é um alimento fermentado, é natural que apresente altas quantidades de microrganismos mesófilos, contanto que esteja dentro do limite tolerável, isto não afeta a qualidade do produto (SILVA *et al.*, 2010). Assim como ocorre para mesófilos totais, a contagem de bactérias lácticas totais não diferencia entre gênero e espécie. Esta análise utiliza-

se meios de cultivo de Ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS) ou o Ágar Elliker, sendo que são dois métodos que podem ser utilizados: plaqueamento de profundidade ou NMP (SILVA *et al.*, 2010). Esta classe bacteriana é uma das mais importantes em produtos lácteos fermentados. Além disso, a contagem de bolores e leveduras também é utilizada para avaliar os alimentos, sendo muito utilizado a contagem de placas, possibilitando ter informações quanto as unidades formadoras de colônias (UFC) e a qualidade do produto (SILVA *et al.*, 2010).

Para quantificar Enterobacteriaceae pode ser realizado o método padrão de contagem em placas. Essas bactérias são utilizadas como forma de verificar as condições de higiene de determinado ambiente, desde o início do processo até o final. Para a contagem utiliza-se Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG) como meio de cultura, sendo um meio seletivo diferencial, NMP, indicado para amostras que estão abaixo do limite de detecção do plaqueamento ou o Método de Petrifilm, no qual utiliza-se dois filmes estéreis Reidratáveis que ficam impregnados pelo meio de cultura por substâncias gelificantes solúveis (SILVA *et al.*, 2010).

Para *Escherichia coli* as análises que podem ser realizadas são NMP, método do substrato cromogênio, método de contagem de placas ou outros métodos que são descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (SILVA *et al.*, 2010). Enquanto isso, o objetivo da quantificação de *Staphylococcus aureus* pode ser para confirmar surtos de intoxicação alimentar, averiguar se o alimento é fonte de *S. aureus* ou se houve alguma contaminação através de manipuladores ou por conta de superfícies mal higienizadas. Além disso, este gênero tem sido amplamente relacionado à ocorrência de mastite em vacas leiteiras, sendo de grande importância o seu monitoramento e de suas enterotoxinas (SILVA *et al.*, 2010). Ademais, análise de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* também pode ser realizada através de metodologias clássicas, porém são demoradas e com grande uso de material e mão-de-obra laboratorial.

## 2.5 Análise Metataxômica

O estudo da composição microbiana de um determinado alimento, tradicionalmente é realizado por técnicas baseadas em multiplicação em meio de cultura, contudo essas técnicas têm baixa sensibilidade e necessitam de fatores de cultivos microbianos previamente conhecidos, o que nem sempre é possível. Além disso, sabe-se que muitos microrganismos não são facilmente cultiváveis em meios de laboratório como no habitat natural, podendo levar a subestimação da diversidade microbiana (DE FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI, 2018). Desta

forma, com a microbiologia molecular e as informações hereditárias que são carregadas pelo DNA, todas as propriedades dos microrganismos estão criptografadas no genoma (MARDANOV; KADNIKOV; RAVIN, 2018), tornou-se possível o uso de métodos moleculares para a identificação dos microrganismos presentes em alimentos (COCOLIN, 2018; FRANCIOSA *et al.*, 2018).

A metataxonômica destaca-se por executar o sequenciamento para a identificação de toda a microbiota de uma amostra através de genes marcadores. Esta metodologia apresenta resultados a nível taxonômico do filo até a espécie do microrganismo identificado, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos como o *GreenGene* e *RibosomalDatabase* (DE CESARE, 2019; FRANCIOSA *et al.*, 2018). Esta técnica realiza o sequenciamento tipo *shotgun*, processo que rompe aleatoriamente longas moléculas de DNA e depois sequencia os fragmentos de DNA resultantes vindos de locais diferentes da molécula original. Os dados deste sequenciamento fornecem informações sobre todos os organismos presentes na amostra (DE CESARE, 2019).

Com isso, a aplicação da análise metataxonômica tem maior funcionalidade quando utilizada em alimentos que contém uma diversidade de microrganismos elevada (JONES, 2017). Estudos metataxonômicos são encontrados para a análise de produtos lácteos, como queijos artesanais, possibilitando o acompanhamento da microbiota ao longo do processo fermentativo para o melhor entendimento dos microrganismos presentes e comparações de microbiotas naturais ou adicionadas de culturas *starters* (FERROCINO *et al.*, 2017; GIELLO *et al.*, 2018). Outros estudos também estão sendo realizados para a identificação de comunidades microbianas em produtos lácteos com o uso destes métodos moleculares, que possibilitam entender a relação entre os microrganismos, suas atividades e funcionalidades no alimento (FRANCIOSA *et al.*, 2018).

A análise metataxonômica possibilita identificar toda a microbiota da amostra através do sequenciamento de genes marcadores, como o 16S rRNA para bactérias e a região ITS para fungos. O gene 16S rDNA devido sua presença em todos os procariotos, possuir tanto regiões conservadas como variáveis que evoluem em taxas diferentes e fornecer informações essenciais na determinação de relações filogenéticas próximas e distantes, é considerado o padrão ouro para a taxonomia bacteriana (CUNHA, 2016). A região que codifica o 16S rRNA é a mais utilizado, por ser uma região bem variável em genes, possuindo ao total 9 regiões hipervariáveis (V1 – V9). Por conta dessa variação de sequência, possibilita uma melhor precisão das estimativas taxonômicas bacterianas por comparação com sequências do gene 16S rRNA. O sequenciamento do 16S rRNA é um agrupamento de sequência quase idênticas, que são

chamadas de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Além das informações taxonômicas, OTUs também apresentam informações sobre a diversidade populacional e contabiliza o grau de divergência entre diferentes comunidades ou tipos de amostras (DE CESARE, 2019; MYAZAKI, 2021). As nove regiões hipervariáveis do 16S são diferentes entre si e a combinação escolhida pode ampliar a capacidade de identificação de espécies. A região V3 contém maior número de sítios variáveis deste gene podendo ser diferenciada entre a maioria das bactérias e, quando analisado juntamente com a região V4, possibilita a análise em sequenciamento de nova geração sem necessidade de cultivo microbiológico prévio (CHRISTOFF, 2016).

Para a identificação de fungos podem ser utilizadas como marcadores as regiões ITS, as quais são regiões de espaçamento entre os três genes, 18S, 5.8S e 28S, e estão entre os melhores marcadores possíveis para esta finalidade (BANJARA *et al.*, 2015; BUEHLER *et al.*, 2017; KAZOU, 2021). Tem como vantagem o aumento do nível de sensibilidade, visto que as regiões ITS podem chegar a 250 cópias por célula, garantindo a detecção mesmo com pouca presença na amostra (CHRISTOFF, 2016). Desta forma é possível identificar a microbiota de qualquer alimento, entre eles os queijos artesanais, emergindo os estudos relacionados à metataxonômica de produtos fermentados (FERROCINO *et al.*, 2017; FRANCIOSA *et al.*, 2018).

### **3 OBJETIVO**

#### **Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização microbiológica de queijos artesanais do meio Oeste Catarinense, mais especificamente da região de Seara-SC, por meio de análises microbiológicas clássicas e genotípicas.

#### **Objetivos Específicos**

- a) Quantificar os principais microrganismos presentes nas amostras de queijo artesanal Colonial de Seara-SC através de análises microbiológicas clássicas;
- b) Identificar e quantificar bactérias e fungos presentes nas amostras de queijo artesanal através de análise metataxonômica, tendo como base o gene 16S rRNA e a região intergênica ITS, respectivamente;
- c) Analisar os microrganismos encontrados na análise fenotípica e genotípica;
- d) Demonstrar as diferenças entre as duas análises em relação aos resultados encontrados de cada amostra de queijo Colonial;
- e) Analisar se as amostras estão de acordo com as regulamentações brasileiras.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

Para a realização das análises microbiológicas fenotípicas e genotípicas foram utilizadas quatro amostras diferentes de queijo Colonial artesanal de um mesmo produtor da região de Seara-SC, que foram selecionadas pela área técnica da EPAGRI (instituição parceira do projeto). A fim de avaliar a evolução da microbiota durante a fermentação do queijo, foram realizadas as análises microbiológicas com quatro tempos diferentes de maturação, sendo nos dias 1 (CFd1), 7 (CFd7), 14 (CFd14) e 21 (CFd21). Os queijos foram coletados *in loco* e transportados sob refrigeração (7°C) em caixa térmica com gelo retornável em sua embalagem original até o momento da investigação da comunidade bacteriana presente no mesmo.

### 4.2 Análise físico-química

Realizou-se as análises físico-químicas de umidade e pH. Na análise de umidade, para cada amostra foram pesados 5 gramas, aqueceu-se por 3 horas à 105°C e resfriou em um dessecador até a temperatura ambiente, foi pesado e repetiu-se o processo até massa constante. Na análise de pH, foi pesada 10 gramas de cada amostra e misturados com 95 mL de água destilada a 60°C. Após isso, a mistura foi filtrada em papel filtro e em seguida foi feita a medição com o auxílio de um pHmetro. Os procedimentos foram seguidos conforme Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

### 4.3 Análise microbiológica clássica

Para as análises fenotípicas foram realizadas contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais a 30°C de acordo com o método ABNT NBR ISO 4833-2015 (ISO, 2015); contagem de bactérias lácticas de acordo com o método ISO 7889-2003 (ISO, 2003); contagem de Enterobacteriaceae de acordo com o método ISO 21528-2:2017 (ISO, 2017); contagem de *Escherichia coli* de acordo com o método ISO 16649-2:2001 (ISO, 2001); contagem de bolores e leveduras de acordo com o método ISO 21527-1: 2008 (ISO, 2008); contagem de Estafilococos coagulase positiva segundo a metodologia ABNT NBR ISO 6888-1: 2016 (ISO, 2016) e pesquisa de enterotoxina estafilocócica de acordo com o método AOAC OMA, 2019 (AOAC, 2019), por fim, a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram

utilizados os métodos descritos em AOAC 2004.2:2019 (AOAC 2019) e AOAC OMA, 2019 (AOAC, 2019), respectivamente.

#### 4.4 Análise metataxonômica

Para bactérias, a amplificação foi realizada com os *primers* 341F (CCTACGGGRRSGCAGCAG) (WANG; QUIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) universais para a região V3/V4 do gene 16S rRNA, utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (IlluminaInc., USA) (CAPORASO *et al.*, 2012). Foi utilizado o método de Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD) que faz a identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA. Para fungos, a amplificação foi gerada com *primers* para a região ITS1, *primer*, ITS1 (GAACCGGCGGARGGATCA) (SCHMIDT *et al.*, 2013) e *primer*, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE *et al.*, 1990). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com o banco de dados proprietário ou públicos (QUAST *et al.*, 2013) e *Greengenes* (DeSANTIS *et al.*, 2006) contendo diversas sequências de DNA anteriormente caracterizadas.

#### 4.5 Bioinformática

As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário de bioinformática (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Com isso, ao obter as sequências de DNA através do sequenciamento, fez-se uma filtragem da qualidade, tendo como base a soma das probabilidades de erro das bases, no qual é permitido no máximo 1% de erro acumulado e após isso, as sequências de DNA são removidas pelos adaptadores da Tecnologia Illumina. Assim que as sequências são analisadas pelos procedimentos iniciais, caso tenha 100% de identidade, são agrupadas em filotipos/*clusters* e utilizadas na identificação taxonômica, através de comparações em banco de dados de sequências de 16S rRNA e ITS (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise físico-química

Segundo a Portaria nº 146/1996 do MAPA, os queijos considerados de alta umidade são aqueles de umidade entre 46,0% e 54,9%, que são conhecidos como de massa branda ou macios, como é o caso do queijo Colonial artesanal. Ao observar os resultados das análises de umidade e pH (Tabela 1), nota-se que a amostra 1 (CFd1) apresentava teor de umidade que o considerava como queijo macio, segundo a Portaria de 1996 do MAPA. Enquanto isso, ao longo da maturação, o teor de umidade diminuiu e isso pode ser justificável, pois com o passar do tempo de maturação o queijo vai diminuindo o pH e perdendo água (MAPA, 1996). Segundo a Lei nº 18.250, de 10 de novembro de 2021, o queijo artesanal colonial pode apresentar-se como de baixa, média ou alta umidade, assim como descrito neste trabalho.

**Tabela 1:** Resultados das análises físico-químicas das amostras de queijo Colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação.

Análises	Amostras			
	CFd1	CFd7	CFd14	CFd21
Umidade (%)	51,12 ± 0,20 <sup>a</sup>	37,87 ± 0,53 <sup>b</sup>	33,74 ± 0,09 <sup>c</sup>	31,09 ± 0,09 <sup>d</sup>
pH	5,08 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,10 ± 0,02 <sup>ab</sup>	4,96 ± 0,02 <sup>c</sup>	5,14 ± 0,01 <sup>a</sup>

\*a-d Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

### 5.2 Análise microbiológica clássica

Os resultados das análises microbiológicas para Aeróbios Mesófilos, Bolores e Leveduras, bactérias ácido lácticas (BAL), Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *S. coagulase positiva*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* estão apresentados na Tabela 2. As bactérias patogênicas *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* apresentaram-se ausentes em todas as amostras, assim como recomendado pela legislação brasileira (ANVISA, 2022).

Analisando os resultados obtidos na Tabela 2, nota-se que os valores da contagem de microrganismos mesófilos não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo dos 21 dias de maturação. Todavia, todas as amostras ultrapassaram o valor de 5 log UFC/g, ou seja, podem ser um indicativo de alta contaminação microbiológica. Não é estabelecido um valor

limite na Instrução Normativa nº 161/2022 para este parâmetro, contudo esses valores podem indicar que há falhas nas condições higiênicas-sanitárias, podendo afetar a qualidade dos queijos. Segundo Lima *et al* (2013), quando há populações inferiores a 4 log UFC/g as práticas de produção estão com boas condições de higiene. Entretanto, se o alimento apresentar populações superiores a 5 log UFC/g de aeróbios mesófilos pode ser um indicativo de que há más condições de higiene na produção. É possível que a temperatura do ambiente, o tempo de armazenamento, elaboração ou fracionamento não estão adequados, sendo que o manipulador e os equipamentos são considerados os principais contaminantes.

Os microrganismos aeróbios mesófilos são muito utilizados para avaliar a higiene no processo de produção dos alimentos, sendo assim, é possível identificar como está a manipulação, matéria-prima, processamento e deterioração dos alimentos. É considerado desse grupo todos os microrganismos que são ativos próximos a temperatura ambiente e com bom crescimento em temperatura de 20°C a 40°C, aqueles considerados patógenos crescem em ambientes com temperatura mais elevada, próximo a 37°C. Quando há um nível elevado de populações desses microrganismos pode causar mudanças indesejáveis nos alimentos e isso indica que não há uma boa prática de higiene e limpeza no estabelecimento, ou até mesmo contaminação nos próprios alimentos, podendo causar determinadas doenças (PENS *et al.*, 2020). Alguns dos microrganismos mesófilos podem ser patogênicos, considerando que a maioria dos patógenos causadores de doenças veiculadas por alimentos (DVAs) são mesófilos. Por isso, caso haja contaminação em excesso, é possível que existam falhas nas condições higiênico-sanitárias de produção (LIMA *et al.*, 2018). *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e Enterobacteriaceae são alguns dos microrganismos mesófilos que podem crescer no leite, por exemplo (SILVA, 2019).

**Tabela 2:** Resultados das análises microbiológicas das amostras de queijo Colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação.

Análises	Amostras			
	CFd1	CFd7	CFd14	CFd21
<b>Aeróbios Mesófilos</b> (log UFC/g)	7,92 ± 0,60 <sup>a</sup>	8,01 ± 0,39 <sup>a</sup>	7,78 ± 0,13 <sup>a</sup>	7,83 ± 0,24 <sup>a</sup>
<b>Bolores e Leveduras</b> (log UFC/g)	5,10 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,05 ± 0,08 <sup>b</sup>	7,77 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,05 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>Bactérias Ácido Láticas</b> (log UFC/g)	8,56 ± 0,05 <sup>a</sup>	8,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,86 ± 0,16 <sup>a</sup>	8,43 ± 0,73 <sup>a</sup>

<b>Enterobacteriaceae</b> (log UFC/g)	4,26 ± 0,17 <sup>b</sup>	4,58 ± 0,06 <sup>b</sup>	5,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,25 ± 0,19 <sup>a</sup>
<b><i>E. coli</i></b> (log UFC/g)	3,53 ± 0,36 <sup>b</sup>	4,33 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,53 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b><i>S. coagulase</i> +</b> (log UFC/g)	3,37 ± 0,47 <sup>a</sup>	3,20 ± 1,70 <sup>a</sup>	< 2,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,12 ± 1,58 <sup>a</sup>
<b><i>Salmonella spp.</i></b> (25g)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b> (25g)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<b>Toxina Estafilocócica</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

\*<sup>a-c</sup> Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Assim como ocorre para aeróbios mesófilos, a presença de fungos nos queijos, quando não desejada, está relacionada com a contaminação do leite cru, ao próprio ambiente (como o ar e os aparelhos e equipamentos utilizados durante o processamento) ou nas roupas e mãos dos trabalhadores (BORELLI *et al.*, 2006), indicando que não há uma boa condição higiênico-sanitária do ambiente, como também pode indicar falta de higiene por parte dos manipuladores. Para os fungos, não há na Portaria nº 146/1996 do MAPA um limite tolerável de bolores e leveduras em queijos com umidade abaixo de 55%, sendo que só há informações quanto a queijos com umidade superior a 55%, sendo o limite tolerável de  $5 \times 10^3$  UFC/g. Ao analisar os dados encontrados no presente trabalho (Tabela 2), nota-se que os resultados ultrapassaram ao valor de umidade superior a 55% ao longo de todo o processo de maturação, obtendo valores acima de 5 log UFC/g, entretanto como não há valores para porcentagens inferiores de umidade, não há como saber se os bolores e leveduras poderiam ser benéficos ou não para as amostras analisadas, visto que todas demonstraram valores de umidade abaixo de 55% (BRASIL, 1996). Como para alguns queijos o uso de fungos pode melhorar as características organolépticas, seria preciso fazer outros estudos de identificação microbiana (SILVA *et al.*, 2017). Além disso, sabendo que os fungos crescem melhor em pH ácido, o fato de BAL possuírem a capacidade de reduzirem o pH, isso pode ter contribuído para o aumento ( $p < 0,05$ ) das contagens de bolores e leveduras ao longo dos tempos 7, 14 e 21 dias de maturação. Pode-se notar que o dia em que mais houve contagem de bolores e leveduras foi para a amostra CFd14 (7,77 log UFC/g)

(Tabela 2), confirmando também o tempo de maturação com menor valor de pH dentre todas as amostras analisadas (Tabela 1).

Bolores e leveduras são fungos, os bolores apresentam colônias mais filamentosas, enquanto as leveduras apresentam colônias mais cremosas (CEARÁ, 2012). A maioria dos bolores são aeróbios, no qual pertencem a esse grupo fungos dos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). As leveduras são unicelulares, no qual são ovais e se multiplicam por brotamento ou gemulação e crescem e se reproduzem mais rápido que os bolores (CEARÁ, 2012). Alguns bolores podem ser utilizados na produção de determinados queijos, como o queijo Gorgonzola ou o Camembert e as leveduras podem ser desejáveis na superfície dos queijos Curados e em queijos Curados por bolores. As câmaras de maturação de queijos apresentam uma microbiota normal em que fungos fazem parte, entretanto podem se tornar indesejáveis por conta das condições de temperatura e umidade, causando alterações sensoriais nos produtos (SILVA *et al.*, 2017). Já as leveduras podem ser encontradas nas salmouras, causando uma maior susceptibilidade à deterioração em queijos salgados em salmouras como é o caso do queijo Colonial (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Os fungos conseguem crescer em pH baixo, sendo que para bolores é no mínimo de 1,5 a 2 até 11 e para leveduras é de 2,5 até 8,5 (JAY, 1993). Os fungos crescem em temperaturas entre 25°C e 28°C, sendo assim, em temperaturas de 35°C a 37°C o crescimento é dificultado e é raro em temperatura de 45°C (SILVA *et al.*, 2010). Além disso, quando cepas desconhecidas estão presentes, pode haver perigo de presença de micotoxinas, que são produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos, como *Aspergillus* e *Penicillium* (CEARÁ, 2012). Essas micotoxinas são metabólitos secundários que são prejudiciais aos seres humanos e animais (BORGES, 1999).

Bactérias ácido lácticas (BAL) são Gram-positivas, em forma de cocos ou bastonetes, catalase negativa, não esporuladas e normalmente imóveis. Algumas cepas de BAL podem ser utilizados como probióticos, conferindo benefícios a saúde humana, além de BAL também atribuírem vantagens em relação a vida útil do alimento, pois têm capacidade de diminuir o pH ou produzir peptídeos antagonistas contra outras bactérias. Conseguem também contribuir com o aroma e sabor nos alimentos fermentados e podem conferir segurança em alimentos de origem animal (FREIRE *et al.*, 2021). Nas análises microbiológicas realizadas no presente estudo (Tabela 2), foram encontrados altos valores de BAL (acima de 7,86 log UFC/g), sendo que estas contagens não apresentaram variação ( $p > 0,05$ ) ao longo do tempo de maturação. Esta elevada contagem de BAL podem ser consideradas benéfica ao produto, visto que essas bactérias ao reduzirem o pH inibem outros microrganismos que seriam indesejáveis ou patogênicos, sendo

assim, quanto mais quantidade de BAL, melhor para o produto, pois assim o pH é reduzido mais rapidamente. Sendo assim, a fermentação e a manutenção de altas contagens de BAL que vai ocorrendo conforme o tempo de maturação é algo vantajoso ao produto. Sabendo disso, as BAL conseguem agir contra bactérias nocivas, como também competem por nutrientes que são importantes para o crescimento dessas bactérias patogênicas e conseguem inativar as toxinas e receptores delas. BAL estão presentes no leite, mas também são encontradas no trato digestivo, respiratório e urogenital de animais (OLIVEIRA, 2015).

Ao analisar os resultados da Tabela 2 em relação a Enterobacteriaceae, percebe-se que houve aumento ( $p > 0,05$ ) nas contagens com o aumento do tempo de maturação. Apesar de não haver limite para esta família atualmente na legislação, segundo a Portaria nº 146/1996 do MAPA, o limite tolerável de coliformes totais (uma das classes englobadas pela família Enterobacteriaceae) em queijos com umidade inferior, igual ou superior a 46% é de  $1 \times 10^2$ , sendo assim, todas as amostras, independente da umidade, apresentaram valores acima do recomendável (BRASIL, 1996). Considerando a aproximação destes parâmetros e a contagem acima de 4 log UFC/g nas amostras é possível inferir que há limitações quanto a qualidade higiênico-sanitária do produto. Enterobacteriaceae representa uma família de bactérias Gram-negativas, podem ser móveis ou imóveis, variando conforme a espécie, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, forma de bacilo, conseguem crescer em diferentes meios sólidos e algumas espécies fermentam lactose (como por exemplo *E. coli* e *Enterobacter*), outras fermentam glicose (como é o caso da *Klebsiella spp.* e *Salmonella sp.*) e já outras não fermentem açúcares (como por exemplo, gênero *Pseudomonas* e *Acinetobacter*). Estão presentes no trato gastrointestinal de vertebrados, mas também podem ser patogênicos que causam infecções em humanos e animais. As espécies patogênicas mais comuns nessa família são *E. coli* e *Salmonella spp.* (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Segundo a Instrução Normativa nº 161/2022, o limite para *E. coli* para queijos, com umidade abaixo de 46% é de  $10^2$  UFC/g e para queijos com umidade igual ou superior a 46% (como é o caso da CFd1) o limite é de  $10^3$  UFC/g (ANVISA, 2022). Como foi observado na Tabela 1, a amostra com maior umidade é a CFd1 com 51,12%, sendo necessário estar de acordo com o limite de umidade acima de 46%, enquanto as amostras CFd7, CFd14 e CFd21 são comparadas ao valor de umidade abaixo de 46%. Observando os valores encontrados em cada amostra, na amostra do dia 1 (CFd1) foram encontrados valores menores ( $p < 0,05$ ) em comparação aos demais dias de maturação, entretanto ainda acima do valor limite. As amostras CFd7, CFd14 e CFd21 demonstraram um valor mais elevado que a amostra CFd1, não estando de acordo com a Instrução Normativa nº 161/2022 que apresenta um valor de  $10^2$  UFC/g quando

a umidade se encontra abaixo de 46%, confirmando que possa ter ocorrido alguma contaminação durante o processo. Por outro lado, a bactéria *E. coli* é a principal representante do grupo de coliformes termotolerantes, no qual possuem a capacidade de fermentar lactose com produção de gás a 44,5°C e são os principais indicadores utilizados para verificar condições higiênico-sanitárias nas manipulações dos queijos. A presença de *E. coli* pode demonstrar que houve uma contaminação de contato direto e/ou indireto com fezes, pois não faz parte da microbiota de queijos, mas em intestino de animais de sangue quente e humanos. Quando há populações superiores aos valores toleráveis, pode causar riscos à saúde de consumidores, visto que algumas cepas de *E. coli* podem ser patogênicas (SCHER *et al.*, 2018).

Outra bactéria que pode estar envolvida em surtos de origem alimentar é *S. aureus* (a principal espécie de Estafilococos coagulase positiva). *S. aureus* podem causar doenças através de alimentos contaminados, pois produzem toxinas e ao serem consumidas, faz com que haja uma intoxicação (DVA). Para que haja uma intoxicação pelo consumo da toxina, a quantidade de bactérias no alimento tem que ser superior a 5 log UFC/g, com isso haverá diversos sintomas gastrointestinais indicando que há DVA, como náusea, vômito, cólica, prostração, pressão baixa e queda de temperatura. Para o crescimento dessas bactérias, a temperatura entre 35°C e 40°C é ideal e o pH entre 4,2 e 9,3, com pouca quantidade de água e até 25% de sal. Quando há contaminação nos alimentos, é mais provável que os manipuladores sejam a fonte da contaminação, pois *S. aureus* estão presentes na pele e no trato respiratório de seres humanos e animais de sangue quente, entretanto também pode ocorrer contaminação através de equipamentos e superfícies em que o alimento entra em contato (SILVA *et al.*, 2017).

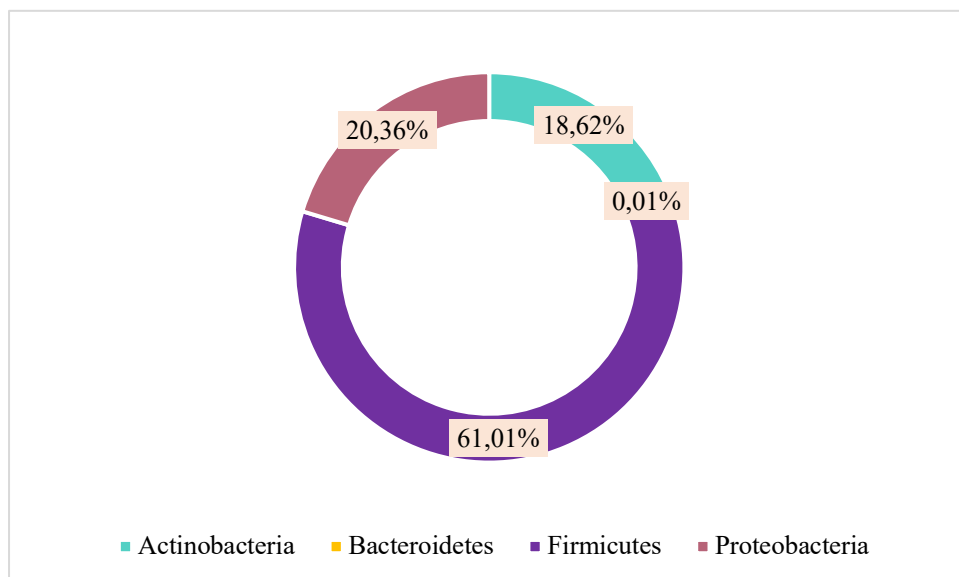
Na Instrução Normativa nº 161/2022 é informado que para queijos o limite aceitável que podem ser encontrados de Estafilococos coagulase positiva é de 3 log UFC/g. Ao observar os resultados encontrados nas análises na Tabela 2, percebe-se que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as amostras, sendo que todas obtiveram resultados acima do limite aceitável, com exceção de CFd14. No entanto, para produzir toxina estafilocócica nos alimentos a população de *S. aureus* devem ser superiores a 5 log UFC/g, sendo assim o ambiente não foi favorável para a produção dessas toxinas (PRETO *et al.*, 2021). Esta observação se confirma com os resultados negativos para a presença de toxinas estafilocócicas em todas as amostras (Tabela 2). *S. aureus* é um microrganismo muito importante para ser analisado nos queijos de leite cru, justamente por conta da ocorrência neste produto ser alta. *S. aureus* pode causar mastite nas vacas leiteiras, causando prejuízos a produção e industrialização do leite. A mastite é uma inflamação na glândula mamária, geralmente infecciosa, sendo subdividido em mastite clínica e subclínica (SAEKI *et al.*, 2012).



### 5.3 Análise metataxonômica de bactérias

Para a análise metataxonômica de bactérias foram encontrados ao total 56.997 sequências de DNA de bactérias nas quatro amostras. Na amostra do dia 1 (CFd1) encontrou-se 15.427, na segunda amostra (CFd7) 17.074, na terceira (CFd14) 13.186 e por último, na amostra do dia 21 (CFd21) foram encontradas 11.310 sequências de DNA. Dessas sequências de DNA, são bactérias pertencentes de 4 filos (Figura 1), sendo eles: Actinobacteria (18,62%), Bacteroidetes (0,01%), Firmicutes (61,01%) e Proteobactérias (20,36%), no qual o mais encontrado foi do filo Firmicutes. Como pode ser visto na figura 1.

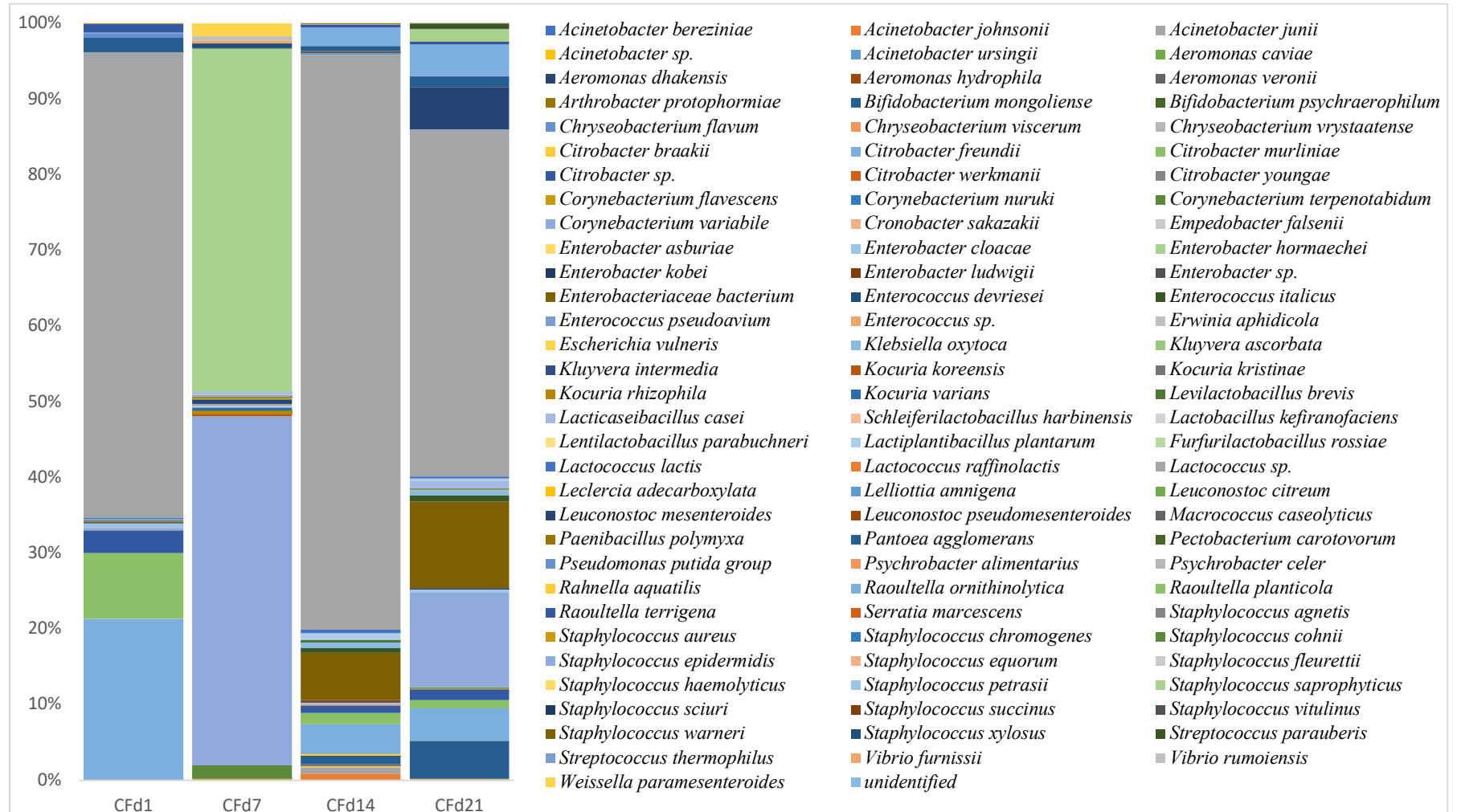
**Figura 1:** Filos mais encontrados ao longo de 21 dias de maturação de queijo Colonial artesanal.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Observando os resultados da análise metataxonômica em relação as bactérias, foram encontradas 69 espécies diferentes (Figura 2). Essas espécies estavam incluídas nos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Dentro desses filos foram encontradas os seguintes gêneros: *Acinetobacter*; *Aeromonas*; *Arthrobacter*; *Bifidobacterium*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*; *Corynebacterium*; *Cronobacter*; *Empedobacter*; *Enterobacter*; *Enterococcus*; *Erwinia*; *Escherichia*; *Klebsiella*; *Kluyvera*; *Kocuria*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; *Leclercia*; *Lelliottia*; *Leuconostoc*; *Macroccoccus*; *Paenibacillus*; *Pantoea*; *Pectobacterium*; *Pseudomonas*; *Psychrobacter*; *Rahnella*; *Raoultella*; *Serratia*; *Staphylococcus*; *Streptococcus*; *Vibrio* e *Weissella*.

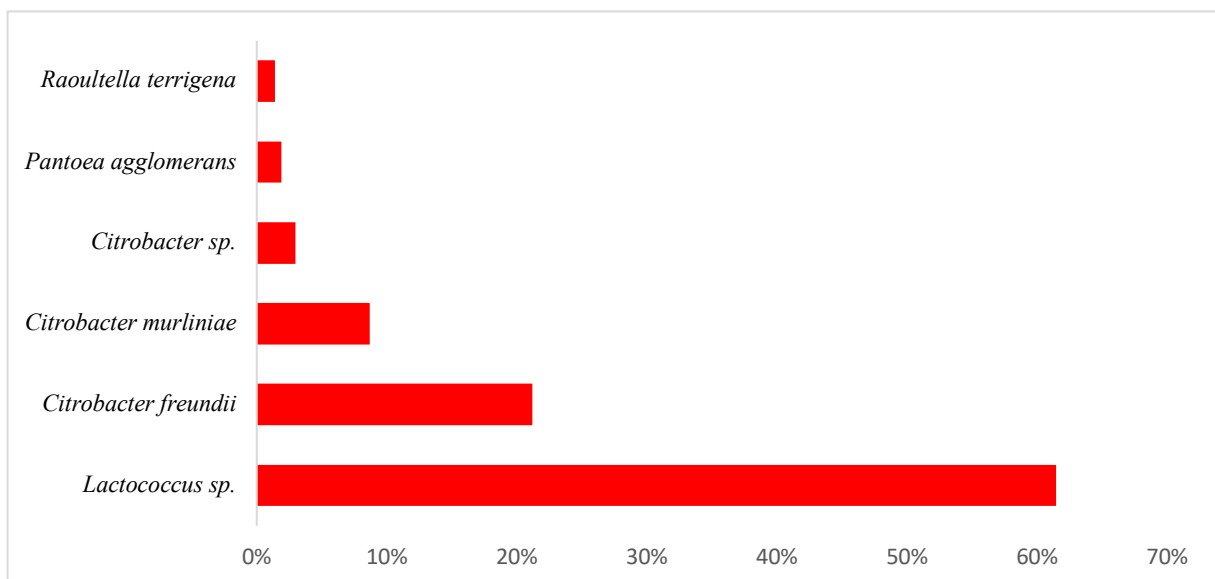
**Figura 2:** Espécies de bactérias encontradas nas amostras CFd1, CFd7, CFd14 e CFd21 através da análise metataxonômica



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Na amostra do dia 1 de maturação (CFd1), como pode ser observado na Figura 3, o gênero mais encontrado foi *Lactococcus* (61,48%), sendo que com a resolução utilizada na análise não foi possível identificar as espécies específicas. *Lactococcus* são Gram-positivos, em forma de cocos em pares ou em cadeias, não formadores de esporos, imóveis e anaeróbios facultativos (WARD *et al.*, 2002). A alta incidência de *Lactococcus* spp. nessa amostra pode estar correlacionada com a alta contagem destas observada anteriormente na análise fenotípica de BAL (Tabela 2). *Lactococcus* spp. pertencem à família das bactérias ácido lácticas (BAL), sendo muito utilizada em conjunto com outras bactérias BAL, como *Lactobacillus* e *Streptococcus*, como iniciadores na produção de produtos lácteos. Esses iniciadores fermentam açúcares para a produção do ácido láctico, acidificando o produto, conferindo sabor e preservando o mesmo (BATT *et al.*, 2014). Essas bactérias são muito utilizadas na fabricação de diversos produtos lácteos, como iogurte, creme de leite, manteiga, queijo frescos como requeijão, queijos macios como Camembert, Brie e Roquefort, queijos duros como Gouda, Edam e Cheddar e outros produtos lácteos fermentados. Ademais, são encontrados na produção de produtos artesanais no mundo todo (WARD *et al.*, 2002). Entretanto, pode haver cepas prejudiciais, havendo espécies que podem causar acidez indesejada, sabor desagradável e coagular o leite. Sendo assim, pode levar ao desenvolvimento de sabor mais frutado, por conta de alguns ésteres e se usada em conjunto com cultura adjunta pode conferir sabor de nozes nos queijos (OLAJIDE; LAPOINTE, 2022).

**Figura 3:** Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com um dia de maturação (CFd1).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O gênero *Citrobacter* foi o segundo mais encontrado na amostra CFd1 (Figura 3), sendo representado pelas espécies *Citrobacter freundii* (21,21%), seguida de *Citrobacter murlinae* (8,69%) e *Citrobacter sp.* (2,99%). O gênero *Citrobacter*, pertence à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos, catalase positivo e oxidase negativo (PÁDUA *et al.*, 2014). *Citrobacter freundii* é a principal espécie pertencente do gênero *Citrobacter* (CEZÁRIO, 2000) e podem ser encontrados tanto em animais quanto humanos, principalmente no trato gastrointestinal fazendo parte da flora intestinal, e no meio ambiente, como na água e solo. Entretanto, pode se tornar patogênica, causando infecções oportunistas, no qual inclui-se meningite, pneumonia, septicemia, infecções no trato urinário (NASCIMENTO; ARAÚJO, 2013), hemorragias sistêmicas e gastroenterites (PÁDUA *et al.*, 2014), principalmente em pacientes imunocomprometidos e que sofrem de outras doenças subjacentes (RIOS *et al.*, 2020). A elevada abundância relativa deste gênero pode ser relacionada às contagens acima de 4 log UFC/g também observada na análise fenotípica para Enterobacteriaceae na amostra CFd1 (Tabela 2).

No mesmo sentido, o terceiro gênero mais encontrado foi *Pantoea*, da espécie *Pantoea agglomerans* (1,87%) (Figura 3). *Pantoea agglomerans* são bactérias Gram-negativas que anteriormente eram chamadas de *Enterobacter agglomerans* e também pertencem à família Enterobacteriaceae. Pode ser encontrada em plantas e fezes de humanos e animais, e causam doenças oportunistas em humanos não sendo um agente infeccioso obrigatório. A infecção oportunista pode ocorrer por meio hospitalar ou através de infecções de feridas com material vegetal, por um espinho, lasca de madeira ou algum outro material vegetal durante a ocupação agrícola, jardinagem ou através de crianças que tiveram contato (DUTKIEWICZ *et al.*, 2016).

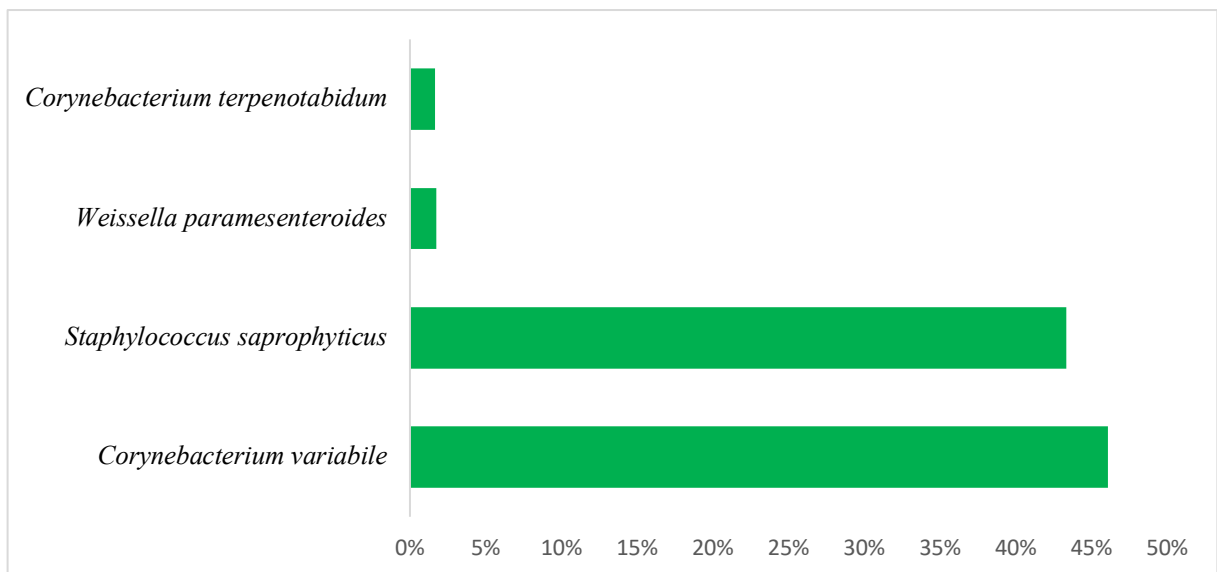
A espécie *Raoultella terrigena* (1,41%) foi a quarta mais abundante observada (Figura 3). *Raoultella terrigena*, antes chamada de *Klebsiella terrigena*, foi separada do gênero *Klebsiella* em 2001, sabendo disso, essa espécie é uma bactéria Gram-negativa não móvel formadora de cápsulas que pertencem a família Enterobacteriaceae. É uma bactéria oportunista e infecções ocasionadas por ela são raras, entretanto quando há infecção pode ser fatal, por possuir um alto índice de mortalidade. As infecções podem ser endógenas, através da bile e fezes, e exógena, quando está relacionado com leite, água e solo. Além disso, ainda há infecções relacionadas com assistência médica. Ainda não se sabe ao certo se está presente no intestino humano como parte da microbiota ou em portadores que possam estar assintomáticos (LEKHNIUK *et al.*, 2021).

A amostra de queijo com 7 dias de maturação (CFd7), demonstrou maior discrepância entre as bactérias encontradas em relação as outras amostras (Figura 4). Nesta amostra foram

encontradas espécies que nas outras 3 amostras não foram identificadas. Sendo assim, a espécie de bactéria mais encontrada foi *Corynebacterium variabile* (46,06%), seguida de *Staphylococcus saprophyticus* com 43,32%. Além dessas duas espécies que ultrapassaram 40% de abundância relativa, ainda foram encontradas *Weissella paramesenteroides* e *Corynebacterium terpenotabidum*, com 1,73% e 1,67%, respectivamente.

*Corynebacterium variabile* é uma bactéria que faz parte da microbiota complexa da superfície de queijos, contribuindo para o desenvolvimento de sabor e textura durante a maturação do queijo. São encontradas no solo, matérias vegetais, águas residuais e produtos lácteos. São tolerantes ao sal e capazes de crescer na presença de NaCl 8,0% e em pH com valores inferiores a 4,9 (SCHRÖDER *et al.*, 2011). *Corynebacterium variabile* não é considerada bactéria patogênica, sendo comumente utilizada em processamento de alimentos feitos a partir do leite cru por demonstrar atividades benéficas a esses alimentos. Entretanto a presença de *C. variabile* na amostra CFd7 pode demonstrar que houve alguma contaminação durante o processamento ou na fabricação do queijo, visto que é uma espécie frequentemente encontrada na pele e no trato gastrointestinal de animais e de humanos (BRAEM *et al.*, 2012), Chombo-Morales *et al.* (2016) descreveram que *C. variabile* também estava presente em amostras de queijo Cotija artesanal, sendo considerada como relevante no processo de maturação do queijo. Tal importância está associada a capacidade desta espécie em metabolizar o lactato e apresentar a capacidade de produzir enzimas lipolíticas como lipases (*lipA1 - lipA3*) e hidrolases (SGNH-hidrolase) que provocam a liberação de compostos voláteis como, enxofre, ésteres, aldeídos e cetonas que derivam da degradação da lactose e do citrato que influenciam no sabor dos queijos (YVON; RIJNEN, 2001). Já as enzimas proteolíticas produzidas por estas bactérias (serina protease, aminopeptidase e prolina iminopeptidase) estão relacionadas com a degradação de proteínas que contribuem para a textura e sabor dos queijos, uma vez que compostos aromáticos são derivados de aminoácidos (DEETAE *et al.*, 2007; SCHRÖDER *et al.*, 2011). A espécie *Corynebacterium terpenotabidum*, também identificada na amostra CFd7, apresenta-se na forma de bastonetes Gram-positivas, aeróbicas, que não formam esporos e são imóveis (TAKEUCHI *et al.*, 1999). O gênero *Corynebacterium* vem sendo encontrado em prateleiras que são utilizadas para maturação dos queijos, ou seja, prateleiras podem ser fonte de transferência destas espécies para o queijo, transferindo os microrganismos da superfície da prateleira para a superfície do queijo (KAMIMURA *et al.*, 2020).

**Figura 4:** Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com sete dias de maturação (CFd7).



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

*Staphylococcus saprophyticus* é uma bactéria comumente encontrada em infecções urinárias, sendo que afeta mais mulheres em idade ativa do que homens. É uma bactéria Gram-positiva, coagulase negativa, que pode causar pielonefrite, sepse, endocardite, uretrite, epididimite, prostatite e nefrolitíase (CARVALHO, 2014). Além disso, também faz parte da microbiota intestinal de animais, como bovinos e suínos, podendo causar contaminações em alimentos de origem animal e alimentos fermentados. Entretanto, apesar de possuir potencial patogênico, no qual é capaz de produzir biofilmes, essa espécie não produz toxinas. Além do mais, não é comum relatos de infecção associados a *S. saprophyticus* através do consumo de alimentos (LAWAL *et al.*, 2021). *S. aureus* são os principais agentes causadores de mastite nas vacas leiteiras, entretanto também pode ser causado por outras espécies, como é o caso de *S. saprophyticus*. Apesar de serem considerados patógenos menores, estão cada vez tendo importância na medicina humana e veterinária, pois em casos de mastite nas vacas, afeta a indústria de laticínios, causando problemas na produção do leite, obtendo um leite de má qualidade, necessitando de descarte das vacas antes do tempo e tendo gastos com tratamentos nos animais, causando perdas econômicas para as indústrias (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Um caso de mastite subclínica no leite pode ter acontecido no caso dessa amostra, visto que apresenta a maior variabilidade em relação as demais.

*Weissella paramesenteroides* é uma bactéria Gram-positiva, em forma de cocos ou bastonetes, catalase negativo, não forma esporos, microaerófilos e geralmente são imóveis,

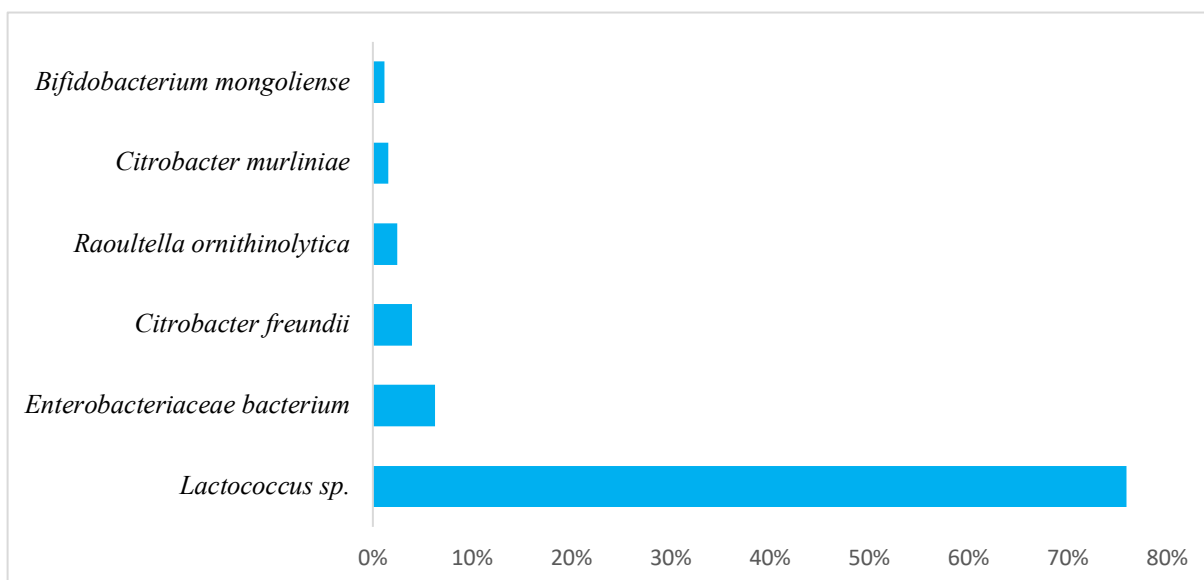
pertencente do grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) que são heterofermentadores. O gênero *Weissella*, pertence à família Leuconostocaceae (ALVIM, 2015) e pode ser encontrado em diversos habitats diferentes, como por exemplo em solos, cana de açúcar, em alimentos fermentados que foram produzidos a partir do leite cru (TEIXEIRA *et al.*, 2021), saliva, pele, fezes humanas e de animais, leite materno, vegetais e plantas (LIBONATTI *et al.*, 2019). Como pode ser encontrado em diferentes ambientes pode contaminar os alimentos pela facilidade de se espalhar nos ambientes de processamento (TEIXEIRA *et al.*, 2021). Por outro lado, *Weissella* pode possuir potencial probiótico, sendo importante para controle de patógenos em alimentos através da produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio. Essas bactérias podem ser confundidas com *Leuconostoc* e *Lactobacillus* heterofermentativos, sendo assim, a diferenciação é realizada através de análises taxonômicas moleculares. Além disso, bactérias desse gênero podem apresentar diferentes tipos de morfologia, podendo ser bastonetes curtos com pontas arredondadas como também afiladas ou em forma de cocoide, pode ser encontrado em pares, sozinho ou em cadeias. Por ser um gênero relativamente novo, ainda não é utilizado como iniciador ou cultura adjunta na indústria alimentícia (TEIXEIRA *et al.*, 2021).

Analisando a amostra CFd14, em comparação com as outras três amostras, essa foi onde mais encontrou a espécie de *Lactococcus sp.*, apresentando uma abundância relativa de 75,91% (Figura 5). O aumento da população de BAL ao longo do tempo de maturação é bem descrito na literatura, e tem relação com o metabolismo bacteriano e o desenvolvimento de características sensoriais características para este tipo de produto. Adicionalmente, os produtores destas amostras de queijo relataram que a maioria dos consumidores prefere ele com este tempo de maturação. A alta abundância relativa de *Lactococcus spp.* pode ser um fator de segurança muito importante para o consumidor deste produto. Por outro lado, a segunda espécie mais presente foi *Enterobacteriaceae bacterium* (6,24%), seguido de *Citrobacter freundii* (3,96%), *Raoultella ornithinolytica* (2,43%) e *Citrobacter murlinae* (1,53%). Apesar de já descrita como uma espécie na literatura, neste estudo *Enterobacteriaceae bacterium* pode estar sendo descrita como a abundância relativa de membros da família Enterobacteriaceae que não foram possíveis de serem identificados devido a resolução do método utilizado. Esta observação pode ser sustentada pelo resultado encontrado nas análises fenotípicas, onde Enterobacteriaceae e uma das principais espécies desta família (*E. coli*) estavam presentes em altas contagens (Tabela 2). No entanto, a diminuição de abundância relativa em membros da família Enterobacteriaceae e aumento de BAL observada na análise metagenômica para CFd14 não apresentou correspondência com as amostras analisadas através da microbiologia clássica, pois o número de sequências identificadas não pode ser diretamente extrapolado para UFC. Isso

ocorre, pois sequências de bactérias inativadas podem ser extraídas da amostra e quantificadas, mesmo que suas células não sejam mais viáveis. Somado a isso, o estado bacteriano de células viáveis, mas não cultivadas, não poder ser descartado na contagem em placas.

Adicionalmente, esta amostra (CFd14) apresentou incidência de *Bifidobacterium mongoliense* (1,14%), uma bactéria Gram-positiva, imóvel, anaeróbica, não formadora de esporos e muito encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais. O gênero *Bifidobacterium* vem sendo estudado a longo tempo devido ao seu potencial probiótico. São bem estabelecidos os estudos com cepas de *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. como ingrediente em leites fermentados, iogurte e em queijos com a finalidade probiótica e é comprovado que essas bifidobactérias provocam efeitos positivos na saúde do hospedeiro (GENESAN *et al.*, 2014; HELLER, 2001). No entanto, em relação aos novos grupos filogenéticos que estão sendo estudados, como *Bifidobacterium mongoliense* (SIMPSON *et al.*, 2003, WATANABE *et al.*, 2009) ainda é preciso que mais pesquisas sejam realizadas para a comprovação de eficácia do potencial probiótico seja oficializado para essa espécie/cepa (DURANTI *et al.*, 2020).

**Figura 5:** Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com quatorze dias de maturação (CFd14).



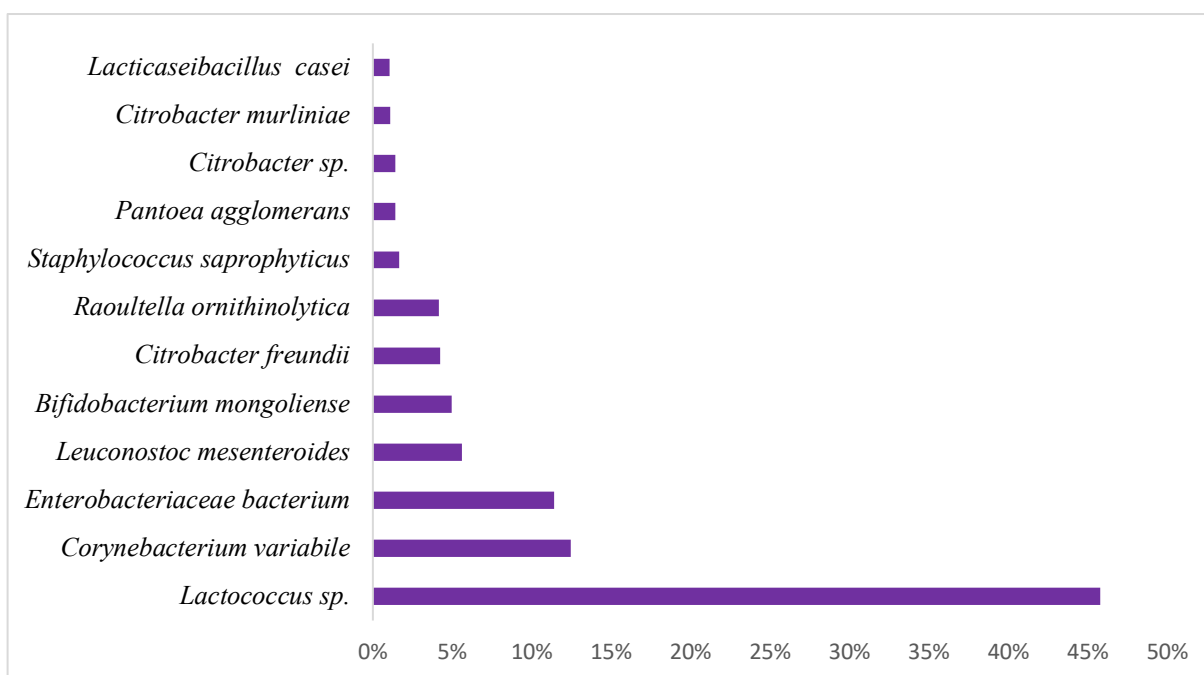
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Ao final do tempo de maturação estudado no presente estudo (CFd21), foi encontrada maior variedade de espécies sendo estas representadas majoritariamente por *Lactococcus sp.* (45,76%), *Corynebacterium variabile* (12,45%), *Enterobacteriaceae bacterium* (11,42%),



*Leuconostoc mesenteroides* (5,59%), *Bifidobacterium mongoliense* (4,96%), *Citrobacter freundii* (4,24%), *Raoultella ornithinolytica* (4,17%), *Staphylococcus saprophyticus* (1,65%), *Pantoea agglomerans* (1,43%), *Citrobacter sp.* (1,41%), *Citrobacter murlinae* (1,10%) e *Lactobacillus casei* (1,06%) (Figura 6). Apesar das amostras terem sido produzidas em dias diferentes (independentemente), com estes dados é possível inferir que o gênero *Lactococcus sp.* (45,87%) foi predominante entre as amostras, seguido de *Citrobacter freundii* (7,36%). Além disso, a presença de *Corynebacterium variabile* (14,70%), *Staphylococcus saprophyticus* (11,76%) e *Enterobacteriaceae bacterium* (3,54%) estavam entre as mais abundantes.

**Figura 6:** Abundância relativa (%) de espécies bacterianas mais encontradas na amostra com vinte e um dias de maturação (CFd21).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Além das espécies mais abundantes já discutidas anteriormente neste trabalho, a amostra CFd21 também apresentou outras BAL, como *Leuconostoc mesenteroides* (5,59%) e *Lactobacillus casei* (1,06%) (Figura 1). *L. mesenteroides* é Gram-positivo, tem forma de cocos e são anaeróbicos facultativos. São encontrados em certos alimentos, como vegetais, legumes e produtos lácteos. Além disso, possuem resistência intrínseca aos glicopeptídeos (ILIS *et al.*, 2018). É uma espécie muito utilizada para a produção de vinhos, produtos lácteos e açúcar, sendo que possui propriedades fermentadoras e consegue gerar compostos aromáticos de interesse (ALMEIRA, 2021). Podem ser encontradas em plantas e a partir disso são

propagadas para outros lugares, como é o caso do leite cru (BORGES, 2017). Como é pertencente as BAL são reconhecidamente seguras para uso em alimentos e são capazes de sintetizar ácidos orgânicos e acelerar processos bioquímicos nos alimentos (ALMEIRA, 2021). Essa bactéria apresenta potencial probiótico e ação bacteriostática contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Além disso, auxilia nas propriedades sensoriais em soro de leite, queijos frescos e creme de leite, sendo assim, são muito utilizados para conferir aroma nos produtos lácteos fermentados (BORGES, 2017).

*Lactobacillus casei* possui uma nova nomenclatura, sendo agora chamado de *Lacticaseibacillus casei*. Esse gênero, *Lacticaseibacillus*, ou seja, o grupo de *L. casei*, são considerados heterogêneos e nômades, podendo se adaptar em diversos nichos e dentro dele está incluído *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei*. São microrganismos capazes de colonizar ambientes tanto naturais quanto artificiais, sendo que são homofermentativos (PIMENTEL *et al.*, 2021). Além disso, pertencente também às BAL, muito utilizada na indústria de alimentos e parte das cepas testadas apresentam potencial probiótico e outras cepas são comprovadamente probióticos, ou seja, apresentam propriedades promotoras à saúde, sendo benéfica aos seres humanos (BURITI; SAAD, 2007). Estas bactérias podem ter ação sobre infecções, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e doença celíaca (LEITE *et al.*, 2021). Outra funcionalidade para esses microrganismos é a utilização para a produção de leites fermentados e como culturas *starters* na fabricação de determinados queijos, melhorando a qualidade do produto (BURITI; SAAD, 2007), ou seja, confere aroma, sabor, textura e auxilia na conservação do produto por conta da acidificação (LEITE *et al.*, 2021). Além disso, também estão presentes em diferentes ambientes, como na boca, trato gastrointestinal, laticínios e produtos vegetais (BURITI; SAAD, 2007).

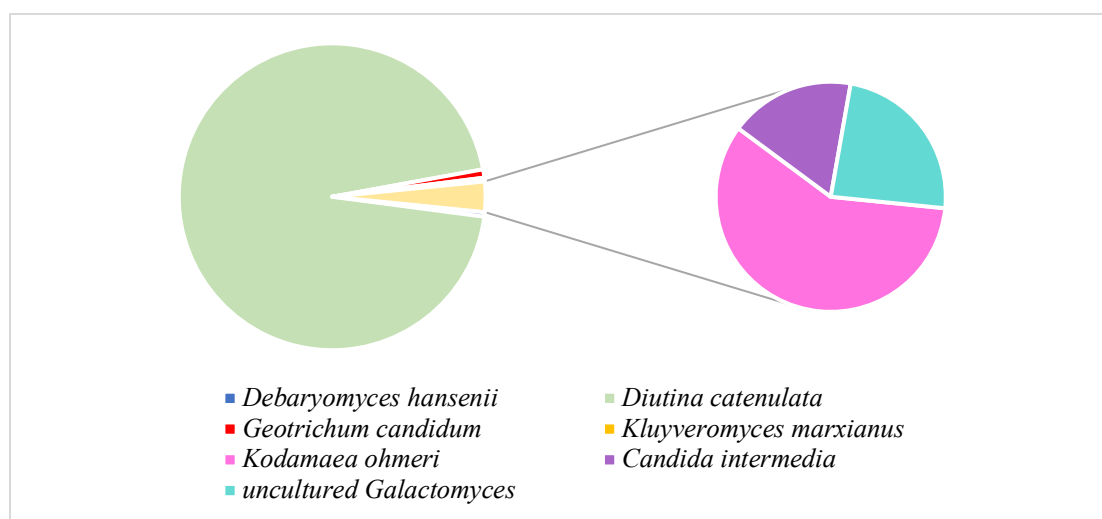
#### 5.4 Análise metataxonômica de fungos

Com relação aos resultados sobre os fungos nota-se não houve muita variação de filo, sendo contabilizado apenas os filós *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Foram encontrados ao total 249.029 sequências de DNA em todas as amostras, sendo que dessas a grande maioria foi do filo de *Ascomycota*. Os gêneros encontrados foram *Aspergillus*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Didymella*, *Diutina*, *Fusarium*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Kurtzmaniella*, *Penicillium*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Tricholoma*, *Trichosporon* e *Wickerhamiella*.

Dentre estes gêneros encontrou-se as seguintes espécies: *Aspergillus conicus*; *Aspergillus restrictus*; *Candida pararugosa*; *Clavispora lusitaniae*; *Debaryomyces hansenii*;

*Diutina catenulata*; *Fusarium equiseti*; *Fusarium solani*; *Galactomyces reessii*; *Geotrichum candidum*; *Kluyveromyces marxianus*; *Kodamaea ohmeri*; *Penicillium camemberti*; *Pichia kudriavzevii*; *Torulaspora matsutake*; *Trichosporon insetorum*; *Trichosporon ovoides*; *Candida intermedia*; *Candida zeylanoides* e *Galactomyces*. As espécies de fungos com maior abundância relativa considerando todas as amostras foram *Diutina catenulata* (93,98%), *Kodamaea ohmeri* (1,85%), *Geotrichum candidum* (0,87%), *Candida intermedia* (0,56%), *uncultured Galactomyces* (0,75%), *Debaryomyces hansenii* (0,48%) e *Kluyveromyces marxianus* (0,39%) (Figura 7).

**Figura 7:** Fungos mais encontrados nas amostras CFd1, CFd7, CFd14 e CFd21 através da análise metataxonômica.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisar os dados, nota-se que *Diutina catenulata* foi a espécie mais encontrada de fungos em todas as amostras, sendo uma média de 93,98%. Esse fungo é uma levedura ascomiceta que pode contaminar laticínios, sendo muito comum associada com leite e o queijo, mas também pode ser encontrada em animais e humanos, relacionada a infecções superficiais e invasivas (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Com relação as outras espécies, não houve uma abundância relativa tão significativa quanto *D. catenulata*. Sabendo disso, o segundo fungo mais encontrado na amostra CFd1 foi *Kodamaea ohmeri*, com uma porcentagem de 3,02%. Esse fungo anteriormente era chamado de *Pichia ohmeri* ou *Yamadazyma ohmeri* (ZHOU *et al.*, 2021), sendo que é uma ascomiceta pertencente à família *Saccharomyce taceae* e é uma forma telemórfica da *Candida guilliermondii*. Além disso, pode facilmente ser confundida com a *Candida albicans*, causando

certa confusão (DIALLO *et al.*, 2019). Esse fungo pode ser encontrado no ambiente e é comum ser utilizado na indústria de alimentos para fermentação (ZHOU *et al.*, 2021), como por exemplo na fermentação de pickles, salmouras e frutas estragadas, sendo utilizada como parte inicial da microbiota natural (BORELLI *et al.*, 2006). Entretanto em alguns casos pode causar infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos (ZHOU *et al.*, 2021).

Para a amostra CFd7 o segundo fungo mais encontrado também foi a *K. ohmeri* com uma porcentagem de 1,87%, seguido de *Debaryomyces hansenii* (1,52%). Acredita-se que cepas de *D. hansenii* são capazes de inibir a germinação e crescimento de fungos que são contaminantes, como por exemplo, *Cladosporium inversicolor*, *Cladosporium sinusum*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor racemosus* e *Penicillium roqueforti*. É uma levedura halofílica, ou seja, vive em ambientes com alta concentração de cloreto de sódio (CARVALHO, 2010), sendo que é dominante em relação a outras espécies de leveduras e é considerada como levedura de biocontrole em produtos lácteos segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), sendo qualificado para isso (HUANG *et al.*, 2021).

Analisando a amostra do dia 14 (CFd14), após *D. catenulata*, o fungo mais encontrado foi *Galactomyces* não cultivados com 2,18%, seguido de *K. ohmeri* com 2,13%. *Galactomyces* é uma espécie que engloba a espécie *Geotrichum candidum*, sendo considerado um anamorfo de *Galactomyces geotrichum*, como era antigamente chamado. *Galactomyces* é muito utilizado na indústria de alimentos, entretanto ainda pode causar algumas doenças em plantas e humanos, como doenças pulmonares. Além disso, *Galactomyces geotrichum* é encontrado também na microbiota intestinal e respiratória dos humanos, como também no solo, leite cru, água, frutas e plantas (PAES, 2016).

Por fim, na amostra CFd21, o segundo fungo mais encontrado na amostra do dia de maturação 21 foi *Geotrichum candidum* com 1,12%, seguido de *Galactomyces* (1,09%). Como comentado anteriormente, *Geotrichum candidum* é um anamorfo de *Galactomyces geotrichum*, no qual essa espécie pode causar infecções em animais, como nos bovinos e cavalos, podendo ocasionar lesões de pele e de pulmão. É um fungo utilizado na produção de queijo por ter capacidade proteolítica e aromática, como também fazendo parte da microbiota natural do leite cru, ou seja, é muito utilizado para maturação de determinados queijos. Além disso, possuem capacidade de alcalinizar a superfícies de queijos por catabolizarem o ácido láctico produzido por bactérias (PAES, 2016).

Observando todas as amostras, nota-se que não houve grandes diferenças no perfil fúngico das amostras entre os quatro tempos de maturação. A presença de bolores e leveduras nas amostras, demonstrada nas análises clássicas estando acima dos valores recomendados pela

legislação (BRASIL, 1996), indica que pode ter alguma falha na higiene da produção, armazenamento ou comercialização do produto. Provavelmente, a levedura *D. catenulata* seja a responsável por esta contaminação, devido à alta abundância relativa desta nas amostras. Portanto, conhecendo as características do microrganismo indesejável, é importante implementar medidas de mitigação que previnam sua ocorrência na obtenção, manipulação, armazenamento, transporte e comercialização dos queijos.

## 6 CONCLUSÃO

Queijos produzidos artesanalmente apresentam uma ampla microbiota natural, principalmente aqueles que são produzidos a partir do leite cru. É importante realizar a caracterização microbiológica destes produtos a fim de compreender a dinâmica da ecologia microbiana durante a maturação, bem como caracterizar o produto advindo de locais específicos (*Terroir* microbiano). Com as análises fenotípicas clássicas foi possível quantificar os microrganismos presentes em cada amostra e analisar como cada bactéria ou fungo crescia nesses ambientes. Os achados descrevem a contagem de microrganismos mesófilos, bolores e leveduras, família Enterobacteriaceae, *E. coli* e *S. aureus* (com exceção de CFd14) com resultados acima dos valores aceitos na legislação, podendo indicar que as condições higiênico-sanitárias precisam ser revisadas. Já para as bactérias ácido lácticas, apesar de também apresentarem valores altos, nesse caso é considerado algo benéfico ao produto, visto que para o queijo essas bactérias podem contribuir para o aroma e sabor, como também a capacidade de diminuir pH e aumentar a segurança e a vida útil do alimento.

Além disso, através da análise genotípica foi possível verificar mais a fundo quais as espécies encontradas em cada uma das amostras, sendo possível obter um melhor conhecimento quanto as espécies de bactérias presentes na microbiota das quatro amostras analisadas. *Lactococcus sp.*, *Corynebacterium variabile*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Citrobacter freundii* foram as espécies mais encontradas considerando todas as amostras. Bactérias ácido lácticas foram as mais abundantes nas amostras, principalmente nos dias 1 (CFd1), 14 (CFd14) e 21 (CFd21) de maturação. Para a análise de fungos, não houve muita variação entre as amostras, sendo que a espécie predominante foi *Diutina catenulata*.

Os dois tipos de análises microbiológicas realizadas neste estudo são diferentes e igualmente importantes, possuem cada uma suas vantagens e desvantagens, mas se complementam para melhor entender a microbiota do queijo artesanal. Quando há microrganismos indesejáveis estas ferramentas são importantes para auxiliar na escolha de medidas de mitigação para corrigir falhas. Além disso, a partir dos dados encontrados, pode ser possível o isolamento de cepas predominantes a fim de desenvolver fermentos específicos para cada região produtora, aumentando a segurança do produto. A partir dos resultados encontrados foi possível perceber a importância de cada análise e identificar os problemas que podem ocorrer durante o processamento, como também os microrganismos que podem auxiliar na melhora das características organolépticas do queijo Colonial artesanal.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIRA, Carlos Augusto Badillo. **Potencial funcional de *Leuconostoc mesenteroides* Ib10.4 e *Lactococcus lactis* 14a8 isolados de leite de búfala.** 2021. 32 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.
- ALVES, Virgínia Farias *et al.* Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. **International Dairy Journal**, [S.L.], v. 85, p. 247-253, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.008>.
- ALVIM, Luige Biciati. **Segurança e Efeito Probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 Isolada de Suíno na Infecção Experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos.** 2015. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- AMARAL, José Wilker *et al.* Avaliação da qualidade de queijos de produção informal. **Segurança Alimentar e Nutricional**, [S.L.], v. 27, p. 1-6, 23 mar. 2020. Universidade Estadual de Campinas. <http://dx.doi.org/10.20396/san.v27i0.8657464>.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 161 de 1 de julho de 2022. **Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos.** Publicado no Diário Oficial da União em 1 de julho de 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acesso em: 11 jul. 2022
- ASSIS, Bianca Seridan de. **EFEITO DE *Lactobacillus rhamnosus* E DE *Lactococcus lactis* isolados de queijo de coalho na viabilidade e produção de enterotoxina b por *Staphylococcus aureus* fri-s6 em queijo.** 20120. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- BANJARA, Nabaraj *et al.* Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 6, p. 792-800, 19 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>.
- BATT, C.A. *et al.* *Lactococcus* | Introduction. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [S.L.], p. 439-441, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00181-6>.
- BERNINI, Valentina *et al.* The presence, genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-veined cheese rinds during the shelf life. **Food Control**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 323-330, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.015>.
- BORELLI, Beatriz M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 21 abr. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9151-3>.
- BORGES, Larissa Rollm. **Análise de qualidade microbiológica (bolos e leveduras) em erva-mate (i/ex *Paraguariensis* st. hilj e identificação dos fungos potencialmente micotoxigênicos.** 1999. 32 f. Monografia (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BORGES, Danielle Oliveira. **Efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado**. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2017.

BRASIL. Lei nº 13.680, 14 de junho de 2018. Dispõe sobre o processo de Fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 14 de jun de 2018.

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

BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento Portaria. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instrução Normativa Nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelecer, em todo o território nacional, o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Brasil: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 73, de 23 de setembro de 2019. Estabelece padrões microbiológicos dos alimentos. Brasil: **Diário Oficial da União**, Brasília, 2022.

BUEHLER, A.J. *et al.* Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 100, n. 11, p. 8814-8825, nov. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12635>.

BURITI, Flávia Carolina Alonso; SAAD, Susana Marta Isay. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 1-13, out. 2007.

CAMPOS, Anna C.L.P. de *et al.* Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 94-100, fev. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2017.2345>.

CAPORASO, J. Gregory *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.



CARVALHO, Irineide Teixeira de. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: Ufrpe/Codai, 2010. 86 p.

CARVALHO, Alex Jesus de. **Identificação de proteínas de superfície de *Staphylococcus saprophyticus* e análise de fatores de virulência**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

CARVALHO, Michelle de Medeiros *et al.* Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: a case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 102, n. 11, p. 9711-9720, nov. 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16373>.

CEARÁ. SECRETARIA DE EDUCAÇÃO - GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ. (org.). **Microbiologia de alimentos**. Fortaleza: Escola Estadual de Educação Profissional, 2012. 66 p.

CEZÁRIO, Renata Cristina. **Investigação de um surto de *Citrobacter freundii* no berçário de alto risco no hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia**. 2000. 26 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.

CHRISTOFF, Ana Paula. Utilizando marcadores moleculares para identificação de micro-organismos. Florianópolis, SC: Neoprospecta, 2016. *E-book*. DE CESARE, Alessandra. Metagenomics to investigate the dynamics of microbial communities in poultry and poultry products. **Lohmann Information**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 4-11, set. 2019.

COCOLIN, Luca *et al.* Next generation microbiological risk assessment meta-omics: The next need for integration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 287, p. 10–17, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.008>.

D'ANGELO, Luisa *et al.* *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: response against food stress conditions. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 66, p. 28-39, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.001>.

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

DE FILIPPIS, Francesca; PARENTE, Eugenio; ERCOLINI, Danilo. Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 589–608, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012312>.

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

DIALLO, K. *et al.* A case report of fungemia due to *Kodamaea ohmeri*. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-3, 1 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-4208-8>.

- DURANTI, S. *et al.* Exploring the ecology of bifidobacteria and their genetic adaptation to the mammalian gut. **Microorganismos**, v. 9, n. 1, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms9010008.
- DUTKIEWICZ, Jacek *et al.* *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. **Annals Of Agricultural and Environmental Medicine** 2016, Lublin, v. 23, n. 2, p. 197-205, abr. 2016.
- FERROCINO, Ilario *et al.* Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02120-17>
- FRANCIOSA, I. *et al.* Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, p. 26–32, 2018. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.038.
- FRANCO, Bernadete D. Gombossy de Melo. A importância dos microrganismos nos alimentos. In: FRANCO, Bernadete D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia de Alimentos**. [S.L.]: Athencu, 2008. p. 1-12.
- FREIRE, Thayná Thamires *et al.* Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 1-19, 7 set. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19964>.
- FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 2.ed. São Paulo: Globo, 1991.
- GALLO, Monica *et al.* Relationships between food and diseases: what to know to ensure food safety. **Food Research International**, [S.L.], v. 137, p. 109414, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109414>.
- GENESAN, B. *et al.* Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1642-1656, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12482>.
- GUIMARÃES, Felipe Freitas *et al.* Comparison phenotypic and genotypic identification of Staphylococcus species isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1160-1164, dez. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2016001200003>.
- HELLER, Knut J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 374-379, 1 fev. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/73.2.374s>.
- IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciências Agrotécnicas**. v. 25, n. 6, p. 1351- 1358, nov./dez., 2001.
- ILIS, Thaissa Mendes *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* em paciente com Leucemia Mieloide Aguda Bifenotípica: um Relato de Caso. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde**, Campo Grande, v. 4, n. 2, p. 1-101, out. 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **IAL: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008. p. 21-22.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO/TC 16649-2: 2001**: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Geneva: ISO; 2001. 8 p.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 7889:2003**. Yogurt - Iogurte – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37° C. Geneva: ISO; 2003. 11 p.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 21527-1: 2008**. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. Geneva: ISO; 2008. 8 p.

ISO. International Organization for Standardization. **ABNT NBR ISO 4833-1: 2015**. Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos - Método horizontal para a enumeração de Microrganismos. Parte 1: Contagem de colônias a 30 ° C pela técnica de pour plate. 2015. 9 p

ISO. International Organization for Standardization. **ABNT NBR ISO 6888-1: 2016**. Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal - Método horizontal para enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1: Técnica usando ágar Baird-Parker. Rio de Janeiro, 2016.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 21528-2: 2017**. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique. Geneva: ISO; 2017. 15 p.

JESEWSKA-FRACKOWIAK, Joanna *et al.* The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. **Acta Biochimica Polonica**, [S.L.], v. 65, n. 4, p. 509-519, 6 dez. 2018. Polskie Towarzystwo Biochemiczne (Polish Biochemical Society). [http://dx.doi.org/10.18388/abp.2018\\_2652](http://dx.doi.org/10.18388/abp.2018_2652).

JOHLER, S. *et al.* Short communication: characterization of *staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in italy. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 2915-2920, abr. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13815>.

JONES, Greg. Microbial metagenomics and the food industry. **New Food Magazine**, n. 510618, 2017. Disponível em: <https://www.newfoodmagazine.com/article/29192/microbial-metagenomics-food-industry/>

KAZOU, Maria *et al.* Zooming Into the Microbiota of Home-Made and Industrial Kefir Produced in Greece Using Classical Microbiological and Amplicon-Based Metagenomics Analyses. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, n., p. 1-17, 28 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.621069>.

KAMIMURA, Bruna Akie *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 80, n., p. 40-49, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>.

KAMIMURA, Bruna A. *et al.* Brazilian Artisanal Cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 21 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12486>.

LAHOU, Evy *et al.* Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semi-hard artisanal cheeses after post-processing contamination in deli retail establishments. **Food Control**, [S.L.], v. 76, p. 13-23, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.033>.

LAWAL, Opeyemi U. *et al.* Foodborne Origin and Local and Global Spread of *Staphylococcus saprophyticus* Causing Human Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 880-893, mar. 2021. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2703.200852>.

LEE, Sarah Hwa In *et al.* Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**, [S.L.], v. 91, p. 88-91, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.039>.

LEITE, Alessandra Cristina Sales *et al.* Development of stuffed coalho cheese in the traditional, lactose-free and probiotic-added formulations. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 1-12, mar. 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20200049>.

LEKHNIUK, Nadiia *et al.* *Raoultella terrigena*: current state of knowledge, after two recently identified clinical cases in eastern europe. **Clinical Case Reports**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1-10, 31 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ccr3.4089>.

LIBONATTI, Carina *et al.* *Weissella paramesenteroides* encapsulation and its application in the use of fish waste. **Revista Argentina de Microbiología**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 81-83, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2018.03.001>.

LIMA, Kely Priscila de *et al.* QUANTIFICAÇÃO DE AERÓBIOS MESÓFILOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE CARNE BOVINA MOÍDA COMERCIALIZADAS EM PALMAS – PR. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias (Issn: 2525-4790)**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-13, 6 jun. 2018. Revista Mundi. <http://dx.doi.org/10.21575/25254790rmmaa2018vol3n1369>.

LIMA, Juliana de L. *et al.* Caracterização do queijo mozzarella fatiado comercializado no Sul do Rio Grande do Sul. In: Simpósio de alimentos para a região Sul, 8., 2013, Rio Grande do Sul. Passo Fundo: INPE, 1996. Artigos, p 1-6. ISBN 2236-0409.

LOURENCO, Antonio *et al.* Determination of the presence of pathogens and anthelmintic drugs in raw milk and raw milk cheeses from small scale producers in Ireland. **Lwt**, [S.L.], v. 130, p. 109347, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109347>.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 57 de 15 de dezembro de 2011. **Estabelecimento de critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais**. Publicado no Diário Oficial da União em 16 de dezembro de 2011a.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013. **Estabelecimento de critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais**. Publicado no Diário Oficial da União em 8 de agosto de 2013.

MARDANOV, Andrey V.; KADNIKOV, Vitaly V.; RAVIN, Nikolai V. Metagenomics: A Paradigm Shift in Microbiology. *In*: NAGARAJAN, M. (org.). **Metagenomics**. First ed. Elsevier, 2018. p. 1–13. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00001-X>

MLADENOVIIY, K. G. *et al.* Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 105, n. 23, p. 8615-8627, 3 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11655-7>.

MORIN, André; PARVEENB, Zahida. PANTOEA. *In*: ROBINSON, Richard K. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Montreal: Imperial Tobacco Limited, 1999. p. 1623-1630.

MYAZAKI, Natália Lima *et al.* POTENCIAL DA IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA EM QUEIJOS ARTESANAIS ATRAVÉS DE METAGENÔMICA. **Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria**, [S.L.], p. 1-17, jun. 2021. Instituto internacional Despertando Vocações. <http://dx.doi.org/10.31692/iiciagro.0198>.

NASCIMENTO, Viviane Felix Silva; ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio. Ocorrência de bactérias patogênicas oportunistas em um reservatório do semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 7, p. 91-104, jul. 2013.

NERO, Luís A. *et al.* Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite - Utilização no Brasil - Semina: Ciências Agrárias. Londrina, v. 21, n. 1, p. 115-126, mar. 2000.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21st Edition, AOAC, Washington DC. 2019.

O'BRIEN, Caoimhe E. *et al.* Genome analysis of the yeast *Diutina catenulata*, a member of the Debaryomycetaceae/Metschnikowiaceae (CTG-Ser) clade. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 1-12, 26 jun. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0198957>.

OLAJIDE, Atinuke M.; LAPOINTE, Gisèle. Microorganisms Associated with Raw Milk. **Encyclopedia Of Dairy Sciences**, [S.L.], p. 319-328, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-818766-1.00023-4>.

OLIVEIRA, L.A. *et al.* Bactérias lácticas e sua importância na indústria de alimentos e saúde: Uma revisão. In: L.A, Oliveira. **Diversidade Microbiana da Amazônia**. Manaus: Inpa, 2015. p. 330-335.

OLIVEIRA, M.A. *et al.* Enterobacteriaceae: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária, Graça**, v. 25, n. 13, p. 1-20, jul. 2015. Semestral.

OMBARAK, Rabee A. *et al.* Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 221, p. 69-76, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.009>.

PAES, Simone Albino. **Diversidade genética de isolados de *Geotrichum* spp. associados a podridões pós-colheita em frutas e hortaliças no Brasil**. 2016. 44 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

PÁDUA, Santiago Benites de *et al.* Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native Brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 151-157, 2014. Available at: <<http://hdl.handle.net/11449/227895>>.

PENS, C. J. S. *et al.* Avaliação da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em sushis de *buffets* de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, conforme legislação municipal vigente. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 11, n. 1, p. 45-57, jan./mar. 2020. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

PIMENTEL, Tatiana Colombo *et al.* Health benefits and technological effects of *Lactocaseibacillus casei*-01: an overview of the scientific literature. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 114, p. 722-737, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.030>.

PRETTO, A. N., *et al.* Kinetic modeling of inactivation of foodborne bacterial pathogens in serrano artisanal cheese during ripening. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 24, 2021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.32219>.

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

RIBEIRO, Laryssa Freitas *et al.* Antimicrobial Resistance and Virulence Factors of *Escherichia coli* in Cheese Made from Unpasteurized Milk in Three Cities in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 469-476, set. 2016. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2015.2106>.

RIOS, Lillian Longue *et al.* Isolation, identification, and susceptibility test to antimicrobials of pathogenic bacteria isolated from clothing worn by health professionals in a hospital environment. **Brazilian Journal of Health Review**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 12999-13027, 2020. Brazilian Journal of Health Review. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv3n5-131>.

ROCHA, Andreia Maria Piovesan. **Controle de fungos durante a maturação de queijo minas padrão**. 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SAEKI, Erika Kushikawa *et al.* Bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*: susceptibility to antimicrobial drugs and the alcoholic extract of propolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 284-290, 27 jan. 2012. Editora da Universidade Federal Rural do Semi-Arido - EdUFERSA. <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2011.5.3.2172>.

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

SANT'ANNA, Felipe Machado de. **Microbioma do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação**. 2019. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Universidade Federal Deminas Gerais Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2019.

SANTA CATARINA. Nº 32, 07 de novembro de 2011. Aprova a Norma Interna Regulamentadora do Queijo Colonial do Estado de Santa Catarina. Diário Oficial do Estado. Santa Catarina, 07 de nov de 2011.

SANTA CATARINA. Nº 33, 07 de novembro de 2018. Norma interna regulamentadora do queijo fresco (Colonial). Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. Santa Catarina, 07 de nov de 2018.

SANTA CATARINA. Nº 18.250, 10 de novembro de 2021. Dispõe sobre os requisitos exigidos para elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru e adota outras providências. Diário Oficial do Estado. Santa Catarina, 10 de nov de 2021.

SCHER, D. D. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.* em queijos do tipo minas frescal comercializados em feiras livres e supermercados no Oeste do Paraná. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 9, n. 4, p. 105-120, out./dez. 2018. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

SCHMIDT, P. A. *et al.* Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 128–132, 1 out. 2013.

SCHRÖDER, Jasmin *et al.* Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-23, 3 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-545>.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 625 p.

SILVA, Jose Givanildo da. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. Isolados de queijo minas artesanal**

**Araxá, Minas Gerais.** 2016. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Escola de Veterinária da Ufmg, Belo Horizonte, 2016.

SILVA, Francisco Regis da *et al.* Conservação e controle de qualidade de queijos: revisão. **Pubvet**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 333-341, abr. 2017. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v11n4.333-341>.

SILVA, Thais Almeida da. **Qualidade microbiológica do leite consumido no Brasil.** 2019. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

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

SOUSA, Andréa Zilá Barroso de *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Food Safety / Scientific Article**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 30-35, out. 2014.

TAKEUCHI, Mariko *et al.* *Corynebacterium terpenotabidum* sp. nov., a bacterium capable of degrading squalene. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, Osaka, v. 49, p. 223-229, 1999.

TEIXEIRA, Camila Gonçalves *et al.* O gênero *Weissella* na indústria de alimentos: uma revisão. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1-15, 28 abr. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14557>.

HUANG, Chuchu *et al.* Debaryomyces hansenii Strains Isolated from Danish Cheese Brines Act as Biocontrol Agents to Inhibit Germination and Growth of Contaminating Molds. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1-14, 15 jun. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.662785>.

WANG, Yong; QIAN, Pei-Yuan. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.

WARD, L.J.H. *et al.* LACTOCOCCUS spp. | Lactococcus lactis. **Encyclopedia Of Dairy Sciences**, [S.L.], p. 1511-1516, 2002. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b0-12-227235-8/00246-7>.

WATANABE, K. *et al.* *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 1535-1540, 1 jun. 2009. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.006247-0>.

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**, p. 315-322, 1990.



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

ZACARCHENCO PB *et al.* Bolores e Leveduras em Queijos. Revista Leite e Derivados. **TecnoLat Expresso**, São Paulo, 2011; 29: 92-99.

ZHOU, Menglan *et al.* *Kodamaea ohmeri* as an Emerging Human Pathogen: a review and update. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1-9, 10 set. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.736582>.