



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOELMA MARTINS PEREIRA DE LIMA

AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DO QUEIJO DE COALHO

MOSSORÓ-RN

2017

JOELMA MARTINS PEREIRA DE LIMA

AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DO QUEIJO DE COALHO

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção Animal

Orientador (a): Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva.

Coorientador (a): Profa. Dra. Fernanda Matias.

MOSSORÓ-RN

2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei n° 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei n° 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

L732a Lima, Joelma Martins Pereira de.
Avaliação do microbioma do queijo de coalho /
Joelma Martins Pereira de Lima. - 2017.
60 f. : il.

Orientadora: Jean Berg Alves da Silva.
Coorientador: Fernanda Matias.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2017.

1. Sequenciamento Illumina. 2. Comunidade
microbiana. 3. Metagenômica. 4. Produto lácteo. I.
Silva, Jean Berg Alves da, orient. II. Matias,
Fernanda, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

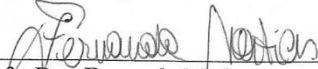
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 17/2017

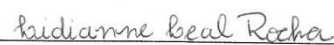
Matricula do aluno: 2015100258. Página 1 de 1


Aos vinte e um dias do mês de julho do ano de dois mil e dezesseis, às quatorze horas, no Auditório do complexo integrado de laboratórios de produção animal e recursos hídricos, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sob a presidência do Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado de autoria de **Joelma Martins Pereira de Lima**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal desta Universidade com o título: **AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DO QUEIJO COALHO**. A Banca Examinadora ficou assim constituída: Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva, Presidente da Banca e Orientador, Profa. Dra. Fernanda Matias, Profa. Dra. Lidianne Leal Rocha e Profa. Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto como examinadores. Após declarada aberta a sessão, o Senhor Presidente passou a palavra ao Mestrando para a exposição e a seguir aos examinadores para as devidas análises que se desenvolvem nos termos regimentais. Não foram registradas ocorrências. Concluída a defesa, foram realizadas as arguições e as sugestões feitas foram acatadas. Em seguida, procedeu-se o julgamento do trabalho pelos membros da Banca Examinadora, que consideraram a dissertação **APROVADA**. O discente tem a ciência de que fará jus ao título de Mestre somente após a entrega definitiva da dissertação com as correções sugeridas pelos membros da banca examinadora em um prazo máximo de 90 (noventa) dias. E, para constar, eu, *Jean Berg Alves da Silva*, Presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi assinada por mim e demais membros da Banca Examinadora.

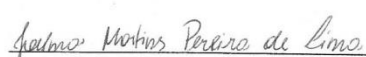
Mossoró, 21 de julho de 2017


Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva


Profa. Dra. Fernanda Matias


Profa. Dra. Lidianne Leal Rocha


Profa. Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto


Joelma Martins Pereira de Lima (discente)

*Ao meu esposo,
por demonstrar a cada dia o verdadeiro significado da palavra
companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela saúde mental e física que me tornou apta à realização desse trabalho;

A minha mãe, por me dar a vida, pelo cuidado, carinho, amor e principalmente pelo constante incentivo que sempre me motivou a nunca desistir dos meus objetivos;

Ao meu esposo Robson Sousa, pois sem seu apoio emocional e financeiro eu não teria essa conquista;

A meus avós pelo incentivo, carinho e amor;

A profa. Dra. Fernanda Matias por ter aceitado me orientar nessa etapa acadêmica, pela oportunidade de aprendizado em uma nova área, pela confiança e doses de sinceridade a respeito do meu trabalho e pela paciência e dedicação de seu tempo. Muito Obrigada!

Ao prof. Dr. Jean Berg pela orientação, pelo tempo e confiança dedicados a mim;

As professoras Dra. Lidianne Leal e Dra. Raphaela Barreto por terem aceitado o convite de participação como banca examinadora e por contribuírem com o conteúdo do meu trabalho;

Aos amigos que conquistei no LTG-PIVE, no LABIN, durante a graduação e aos que moram distante fisicamente, mas sei que estarão sempre torcendo por mim;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido e a Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa pelo auxílio financeiro por meio do Programa Primeiros Projetos (PPP).

"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia
vou construir um castelo..."

(Nemo Nox)

AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DO QUEIJO DE COALHO

LIMA, Joelma Martins Pereira de. **Avaliação do microbioma do queijo de coalho**. 2017. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

RESUMO - O queijo de coalho é considerado um patrimônio cultural e tem grande importância social e econômica para a região nordeste brasileira, por isso a avaliação das condições microbiológicas desse produto torna-se fundamental para a afirmação da segurança alimentar e investigação das reais características que fazem com que esse tipo de queijo apresente sabores, texturas e aromas tão peculiares. A partir disso, o objetivo do trabalho foi identificar a comunidade microbiana do queijo de coalho. Para isso, o DNA metagenômico do queijo foi extraído de oito amostras de queijo de coalho, sendo quatro feitas a partir do leite pasteurizado e quatro feitas a partir do leite cru. O DNA das amostras foi sequenciado pela tecnologia de próxima geração da Illumina utilizando como base para a identificação dos organismos o gene rDNA 16S e 18S. As análises do sequenciamento revelaram vários exemplares de microrganismos patogênicos procarióticos como *Rothia dentocariosa*, *Elizabethkingia meningoseptica* e *Bacillus cereus*, assim como gêneros de bactérias próprias da sua microbiota previamente descrita como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*. Na investigação dos eucarióticos foram identificados diversos fungos como a *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Pichia membranifaciens*, *Tritirachium oryzae*, *Malassezia furfur* e *Kluyveromyces marxianus*, além dos microrganismos que ainda não tinham sido descritos em queijos coalho como o *Vibrio rumoienses*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Piscicoccus intestinalis* e *Dekkera bruxellensis*.

Palavras-chave: Sequenciamento Illumina. Comunidade microbiana. Metagenômica. Produto lácteo.

EVALUATION OF THE COALHO CHEESE MICROBIOME

LIMA, Joelma Martins Pereira de. **Evaluation of the coalho cheese microbiome**. 2017. 55f. Dissertation (Masters in Animal Science) –Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoró, 2017.

ABSTRACT- The coalho cheese is considered a cultural patrimony and has great social and economic importance for the northeastern Brazilian region. The evaluation of the microbiological conditions of this product becomes fundamental for the affirmation of food safety and investigation of the real characteristics that make this kind of cheese so peculiar. The objective of the study was to identify the microbial community of coalho cheese. Metagenomic target DNA was extracted from eight samples of coalho cheese, four of which were made from pasteurized milk and four from raw milk. The DNA of the samples was sequenced by the next generation sequencing technology using the 16S and 18S rDNA gene as the basis for the identification of the organisms. Sequencing analyzes revealed several prokaryotic pathogenic microorganisms such as *Rothia dentocariosa*, *Elizabethkingia meningoseptica* and *Bacillus cereus*, as well as bacterial genera belonging to the microbiota previously described as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*. Several fungi, such as *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Pichia membranifaciens*, *Tritirachium oryzae*, *Malassezia furfur* and *Kluyveromyces marxianus* were identified in the eukaryotic research, as well as microorganisms that had not yet been described in rennet cheeses such as *Vibrio rumoienses*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Piscicoccus intestinalis* and *Dekkera bruxellensis*.

Keywords: Illumina sequencing. Microbial communities. Metagenomic. Dairy product.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Ilustração do procedimento de corte das amostras.....	31
Figura 2	–	Diagrama de Venn mostra a quantidade de OTUs exclusivas e compartilhadas do Grupo C e D após análise do gene 16S do rDNA.....	39
Figura 3	–	Diagrama de Venn mostra a quantidade de OTUs exclusivas e compartilhadas do Grupo C e D após análise do gene 18S do rDNA.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Representação do número de sequências produzidas por amostra, e classificadas por nível taxonômico quanto a análise do gene rDNA 16S.....40
- Gráfico 2 – Representação do número de sequências produzidas por amostra, e classificadas por nível taxonômico quanto a análise do gene rDNA 18S.....41
- Gráfico 3 – Histograma demonstrando a distribuição relativa de filos identificados nas amostras de queijo de coalho por análise do gene rDNA 16S.....42
- Gráfico 4 – Histograma demonstrando a distribuição relativa de filos identificados nas amostras de queijo de coalho por análise do gene rDNA 18S.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Alguns programas utilizados para análise de microbiomas por meio de metagenoma 16.....	29
Tabela 2	– Valores referentes à absorvância das amostras em relação aos diferentes comprimentos de onda testados e a respectiva concentração de DNA por amostra.....	35
Tabela 3	– Valor referente à relação A_{260}/A_{280} utilizada como indicador de qualidade da amostra.....	35
Tabela 4	– Dados do sequenciamento das bibliotecas do gene rDNA 16S, pré-tratamento e controle de qualidade das sequências.....	36
Tabela 5	– Dados do sequenciamento das bibliotecas do gene rDNA 18S, pré-tratamento e controle de qualidade das sequências.....	36
Tabela 6	– Dados referentes à quantidade de sequências e OTUs registradas para as amostras do gene rDNA 16S.....	38
Tabela 7	– Dados referentes à quantidade de sequências e OTUs registradas para as amostras do gene rDNA 18S.....	38
Tabela 8	– Valores percentuais de organismos procariotos identificados e não-identificados nas amostras de queijo de coalho.....	39
Tabela 9	– Valores percentuais das médias aritméticas quanto à abundância em nível de gênero identificado nas amostras dos grupos A e B.....	44
Tabela 10	– Quantidade de sequências distribuídas por amostra quanto aos filos identificados por análise do gene rDNA 16S.....	49
Tabela 11	– Quantidade de sequências distribuídas por amostra quanto aos filos identificados por análise do gene rDNA 18S.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BAL	Bactéria Ácido-lática
pH	Potencial Hidrogeniônico
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
rDNA	Ácido Desoxiribonucleico ribossômico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
LABIN	Laboratório de Biorreatores, Nanobiotecnologia e Inovação
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPM	Rotações por minuto
min	Minutos
s	Segundos
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
DGGE	Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturação
TGGE	Gel de Eletroforese em Gradiente por Temperatura
T-RFLP	Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos Terminais de Restrição
LH	Heterogeneidade por Comprimento
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
SO	Sistema Operacional
g	Gramas
ng	Nanogramas
nt	Nucleotídeo
PCA	Análise do Componente Principal
PCoA	Análise da Coordenada Principal
UPGMA	Método de Agrupamento Não-ponderado Usando Média Aritmética

LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
®	Marca registrada
%	Porcentagem
μL	Microlitro
™	Tread Mark
°C	Graus Celcius
α	Alpha
β	Beta
A ₂₆₀	Absorbância a 260 nanômetros
A ₂₈₀	Absorbância a 280 nanômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	QUEIJO.....	20
3.2	QUEIJO DE COALHO.....	21
3.3	MICROBIOMA.....	23
3.3.1	Metagenômica	25
3.4	TECNOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	26
3.5	BIOINFORMÁTICA.....	27
3.5.1	Programas e Análise de Dados	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	30
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	30
4.3	GEL DE AGAROSE PARA ELETROFORESE.....	31
4.4	ANÁLISE DE DENSIDADE ÓPTICA POR ESPECTROFOTÔMETRO.....	31
4.5	SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	32
4.5.1	Produção dos Amplicons	32
4.5.2	Análise de Qualidade e Quantificação dos Produtos da PCR	32
4.5.3	Mistura e Purificação dos Produtos da PCR	32
4.5.4	Preparação das Bibliotecas e Sequenciamento	32
4.6	ANÁLISE DE DADOS.....	33
4.6.1	Montagem das Sequências e Controle de Qualidade	33
4.6.1.1	Divisão dos Dados.....	33
4.6.1.2	Montagem das Sequências.....	33
4.6.1.3	Filtragem dos Dados.....	33
4.6.1.4	Remoção de Quimeras.....	33
4.6.2	Grupamentos OTU e Anotação das Espécies	33
4.6.2.1	Grupamentos OTU.....	33
4.6.2.2	Anotação das Espécies.....	33
4.6.2.3	Construção das Relações Filogenéticas.....	34

4.6.2.4	Normalização dos Dados.....	34
4.7	MODELAGEM DE GRÁFICOS E FIGURAS.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1	ANÁLISE DA DENSIDADE ÓPTICA EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	34
5.2	PROCESSAMENTO DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO.....	35
5.3	ANÁLISE DAS OTUS E ANOTAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	37
5.3.1	Análise das Sequências e das OTUs.....	37
5.3.1.1	Diagrama de Venn.....	38
5.3.2	Anotação das Espécies.....	39
5.3.2.1	Análise da Distribuição de Sequências.....	40
5.3.2.2	Disposição da Abundância Relativa das Espécies.....	42
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um produto lácteo que apresenta grande diversidade de componentes nutritivos, como por exemplo, vitaminas, proteínas, cálcio, zinco, potássio, ferro, fósforo, dentre outros, por isso pode ser consumido por pessoas de diversas idades. Do ponto de vista econômico, ele atinge diversas classes sociais, pois é possível a aquisição desse produto de diferentes tipos e marcas (DANTAS, 2012).

O queijo do tipo coalho é obtido através da coagulação do leite, podendo ser complementado pela ação de bactérias lácteas selecionadas (SANTANA et al., 2008). Por ser amplamente fabricado em inúmeras cidades da região Nordeste brasileira deve-se dar destaque à qualidade do produto, tendo em vista que sua produção pode gerar valores em torno de 10 milhões de reais por mês (PERRY, 2004).

Grande parte dos queijos de coalho são produzidos de maneira artesanal, ou seja, sem a utilização de técnicas industriais e sem levar em consideração as Boas Práticas de Fabricação (BPF) que é um conjunto de medidas a fim de garantir condições sanitárias adequadas e conformidade dos produtos alimentícios com os regulamentos técnicos (FEITOSA et al., 2003).

Por ser um produto popular e fabricado principalmente em pequenas e médias empresas, não existe uma padronização no processo de elaboração, sendo comum sua produção a partir de leite cru ou fresco, o que o torna um possível agente de contaminação aos consumidores (DE OLIVEIRA et al., 2010). A partir de todos os agravantes que contribuem para a contaminação desse produto, é importante que se tenha uma metodologia com um maior grau de exatidão e confiável para a análise da contaminação do alimento.

A avaliação da qualidade de um queijo é baseada em métodos tradicionais de contagem de microrganismos mesófilos, coliformes termotolerantes e totais, assim como o isolamento de bactérias patogênicas ou não (PEIXOTO et al., 2007) e detecção e quantificação de leveduras por meio seletivo e/ou diferenciais (ALMEIDA, 2011). No entanto, nem todas as bactérias (PEIXOTO et al., 2008) e fungos são cultiváveis ou já foram identificados (ALMEIDA, 2011) e no caso de um queijo com produção artesanal obter dados de microrganismos presentes numa amostra se torna primordial para avaliar a comunidade microbiana como um todo, ou o microbioma (PEIXOTO et al., 2007). A partir disso, a utilização da avaliação do microbioma dos queijos através da extração do DNA

metagenômico, ou seja, a retirada do material genético de todos os organismos que compõem as amostras do queijo coalho se torna uma solução viável e assertiva.

Nesse contexto, o uso da tecnologia de sequenciamento do DNA permitiu estudos que verificassem e explorassem o genoma de microrganismos isolados de diferentes ambientes possibilitando o conhecimento metabólico e fisiológico deles (DE SOUZA; BRUSAMARELLO, 2009). Atualmente o parâmetro para esse tipo de estudo é realizado por meio da análise filogenética do gene que codifica o RNA ribossomal 18S em eucariotos (HADZIAVDIC et al., 2014) e 16S em procariotos, pois são estruturas estáveis encontradas nos ribossomos e no DNA genômico (CHAKRAVORTY et al., 2007; ALMEIDA, 2009).

Com a possibilidade do armazenamento online de dados gerados por estudos filogenéticos, atualmente quase 50% das sequências de RNA ribossomal 16S depositadas pertencem a microrganismos não cultiváveis, confirmando a possibilidade da investigação microbiana por meio desse conjunto de técnicas (ALMEIDA, 2009).

Identificar procariotos e eucariotos presentes no queijo de coalho é importante para a elucidação de interações microbianas que possibilitam diferenças nas características organolépticas do produto feito por cada produtor e entre o produto feito com base o leite cru e o leite pasteurizado. Sendo assim o objetivo do trabalho foi conhecer a diversidade de microrganismos presentes em amostras do queijo de coalho, visando o aprimoramento dos processos de produção assim como a qualidade microbiológica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade microbiana de amostras de queijo coalho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a diversidade procariótica presente em amostras de queijo coalho;

Identificar geneticamente os eucariotos presentes em amostras de queijo coalho;

Comparar o microbioma presente em amostras de queijo coalho feito com o leite cru e com o leite pasteurizado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 QUEIJO

Queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL,1996).

O queijo é um dos alimentos fermentados mais antigos, sua produção está datada a aproximadamente 12 mil anos a.C. e seus processos fermentativos estão intimamente relacionados com a cultura e tradições de onde são fabricados. Os primeiros queijos produzidos eram apenas o leite coagulado, salgado e sem soro. Porém, após anos de fabricação a indústria queijeira sofreu um longo processo de aperfeiçoamento de técnicas e modernização nos seus processos, o que culmina na produção que escoa atualmente (DUGAT-BONY et al., 2016; SILVA et al., 2017).

O produto em questão é um alimento comum na dieta humana, rico em nutrientes como vitaminas, minerais e proteínas, fabricado em diversas regiões do mundo e em mais de mil tipos (FREITAS FILHO et al., 2009). E essa grande variedade de queijos existente é devido aos métodos de produção, processamento e manipulação que ocorrem de maneira diferenciada, determinando teores de gordura, umidade, quantidade de microrganismos e outras características próprias de cada tipo (EMBRAPA, 2017), alguns exemplos deles são: queijo cotija do México (ESCOBAR-ZEPEDA et al.,2016), may bryndza da Eslováquia (PANGALLO et al., 2014), mussarela (BUZI et al., 2009) e gorgonzola da Itália (FONTANA et al., 2010) e brie da França (BOUAMRA-MECHEMACHE; CHAABAN, 2010). No Brasil também podemos encontrar variedades regionais de grande valor socioeconômico e cultural como os do tipo manteiga, minas e coalho, sendo este último amplamente produzido na região Nordeste (FREITAS FILHO et al., 2009).

O hábito do consumo de queijo como refeição, acompanhamento e até mesmo como condimento foi trazido para o Brasil por meio dos portugueses e dos imigrantes europeus que os sucederam durante todo o processo de colonização e ocupação do país (DANTAS, 2012).

No ano de 2006 estima-se que aproximadamente 40% da produção de queijo comercializado no Brasil não foi inspecionada, podendo ficar subentendido que esses produtos não foram feitos a partir do leite pasteurizado (DANTAS, 2012) como preconiza a instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011b).

Em 2011, o Brasil produziu 867 mil toneladas de queijo tornando-o o sexto maior produtor no mundo (SEBRAE, 2014). E com o aumento de renda da população brasileira e uma nova estabilização na economia no decorrer da primeira década do novo século foi possível perceber mais um aumento na comercialização de produtos lácteos (BELTRÃO et al., 2015), atingindo um consumo médio de quatro quilogramas de queijo por habitante durante todo o ano de 2011 (SEBRAE, 2014).

3.2 QUEIJO COALHO

Segundo a legislação brasileira, o queijo do tipo coalho é aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou por outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação. Ele apresenta média a alta umidade, massa semicozida ou cozida, teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%, consistência semidura, elástica, textura compacta, sem olhaduras ou aberta com olhaduras mecânicas, cor uniforme branca amarelada, sabor brando ligeiramente ácido e salgado, odor ligeiramente ácido como o de coalhada fresca e a casca é fina e não muito bem definida (BRASIL, 2001a; BRASIL, 2001b).

Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte são os maiores produtores de queijo coalho no Brasil (FREITAS FILHO et al., 2009). Esse produto vem sendo feito a mais de 150 anos (VIDAL, 2011), o que o torna importante cultural, social e economicamente, pois sua produção ajuda na complementação da renda de agricultores e seus familiares contribuindo para a circulação de renda local, além de diminuir a saída do homem do campo em busca de emprego nas cidades (MENEZES, 2011; MENEZES, 2011a).

Por ser fabricado com leite cru o queijo coalho artesanal possui características sensoriais particulares para cada produtor, pois a alimentação dos animais produtores do leite e a localização geográfica apresentam papel fundamental na microbiota nativa que por

consequência alteram o desenvolvimento das propriedades organolépticas do alimento (BRUNO E CARVALHO, 2009; GIELLO et al., 2017), além da fermentação por leveduras, que é essencial para a segurança, qualidade e valor nutritivo desse alimento (ALMEIDA, 2011). É devido a essa microbiota que são classificados como um alimento probiótico, pois afetam benéficamente o animal hospedeiro e proporciona o equilíbrio da microbiota intestinal (SAAD, 2006).

É bastante comum ser encontrado em queijos as chamadas bactérias ácido-láticas (BAL) que são um grupo de microrganismos fermentadores empregados na produção de alimentos, Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e produzem principalmente ácido láctico como produto final da sua fermentação (BRUNO, 2011). As BAL constituem os seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (BRUNO, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2002), assim como podemos encontrar as leveduras dos seguintes gêneros: *Candida*, *Sccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Geotrichum* e *Yarrowia* (ALMEIDA, 2011; IRLINGER et al., 2015). As bactérias citadas acima são encontradas não apenas no leite, mas também na água, no solo, nos tratos digestórios, respiratório e urogenital de animais. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos, e sua grande maioria é inativada com processos térmicos com temperaturas acima de 70 °C (GUEDES NETO et al., 2005; ORTOLANI, 2009), ou seja, os alimentos produzidos a partir do leite pasteurizado devem conter fermentos láctico comerciais, o que pode causar a perda de características típicas do alimento (BRUNO; CARVALHO, 2009).

Dando origem ao seu nome, uma das etapas de sua produção, na qual através da ação de enzimas dos estômagos de bezerros, local onde era feito o produto, o leite era coalhado (DANTAS, 2012). Atualmente é possível afirmar que para a fabricação do queijo coalho industrial, o leite passa pelas seguintes etapas: pesagem, filtragem, pasteurização, resfriamento, adição de fermento e cloreto de cálcio, adição de coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, cozimento da massa, salga, enformagem, prensagem e viragem, maturação, embalagem e armazenamento (NASSU et al, 2006).

A matéria-prima, forma de produção, utensílios utilizados, transporte, local de venda e embalagem podem significar fontes de contaminação para o alimento, por isso a pasteurização do leite, a higienização do local de produção e das mãos dos manipuladores são essenciais na

prevenção de doenças de origem alimentar (RAMOS; COSTA, 2003). Por isso, de acordo com a Resolução nº 275 de 21 de outubro de 2002, para que as Boas Práticas de Fabricação sejam asseguradas na produção ou industrialização de alimentos, os estabelecimentos devem implementar e verificar, a higienização das instalações e equipamentos, móveis e utensílios, controle de potabilidade de água, higiene e saúde dos manipuladores, manejo de resíduos, manutenção preventiva e calibração dos equipamentos, controle preventivo de vetores e pragas, seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens e programa de recolhimento de embalagens (BRASIL, 2002).

Para a avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos são estabelecidos os valores máximos permitidos na Resolução-RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, de grupos de bactérias que são vistas como parâmetro para a determinação se está apto ou não a ser consumido (BRASIL, 2001b). Esses microrganismos em números que excedam os limites preditos pela legislação indicam a potencial deterioração (mesmo que as suas características organolépticas não estejam alteradas) ou a presença de outros microrganismos associados à falta de qualidade do alimento (NERO et al., 2005). Já os microrganismos patogênicos utilizados para a determinação da segurança alimentar mais comumente relatados em estudo com queijos coalho são a *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; FREITAS FILHO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2010; DE SOUSA et al., 2014) *Candida*, *Geotrichum* e *Saccharomyces*, sendo os quatro últimos determinando contaminação por meio de sua concentração (PERRY, 2004; ALMEIDA, 2011). Por outro lado, as bactérias ácido-láticas e os fungos da microbiota nativa apresentam um papel benéfico quando se trata de produzir produtos derivados do leite (BRUNO; CARVALHO, 2009; ALMEIDA, 2011), elas são responsáveis pela fermentação e maturação e conferem qualidade, autenticidade e até mesmo rastreabilidade do queijo (SILVA et al., 2012).

3.3 MICROBIOMA

Atualmente com o uso corriqueiro de técnicas moleculares, o homem vem buscando e acumulando mais conhecimento acerca do “mundo microbiológico”. O estudo dos microrganismos tem sido modificado ao longo desses últimos cinco séculos com a apresentação de evidências que serviram de marco para o progresso metodológico em

pesquisas com micróbios. Quando Pasteur, Robert Koch, Gram e diversos outros pesquisadores anunciaram suas descobertas fizeram grandes contribuições para a humanidade. Por meio disso, tornou-se possível a seleção, caracterização e manipulação dos microrganismos que podiam ser cultivados, pois, até então a identificação microbiana era baseada em características morfológicas e padrões bioquímicos (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015). Mais recentemente, com a apresentação da estrutura do DNA (WATSON; CRICK, 1953), a decodificação do código genético, a produção do primeiro organismo transgênico (MORROW; BERG, 1972), e em 1977 um feito muito importante para a história da ciência: o sequenciamento do DNA (MAXAM; GILBERT, 1977; SANGER et al., 1977), permitiu o conhecimento do genoma de vários organismos, modificando a maneira de se detectar e investigar os microrganismos. Anos à frente, em 1983, Carl Woese e colaboradores analisam uma nova forma de medida de divergência evolutiva: genes que codificam o RNA ribossomal 16S, mas o trabalho com o sequenciamento de trechos de RNA ou cópias de DNA por meio da transcriptase reversa pareceu ser um desafio para a época (PESSOA FILHO, 2011). Mesmo assim, Lane e colaboradores (1985) publicam um trabalho comprovando que a nova ideia de Woese poderia se tornar um padrão quando se tratasse de investigação filogenética. Paralelamente a isso, a técnica da PCR, que foi desenvolvida por Kary Mullis em meados de 1980 e tem por finalidade a amplificação das sequências de genes (MULLIS, 1990) possibilitou o conhecimento de novos táxons por meio da associação dessa com outras técnicas como FISH, DGGE, TGGE, T-RFLP (XU, 2006; JANY; BARBIER, 2008) e mais recentemente a metagenômica (HANDELSMAN et al. 1998) e o LH (MORENO et al, 2011).

A partir destes acontecimentos foi possível o desenvolvimento da investigação de populações e comunidades microbianas permitindo a exploração do genoma não apenas de microrganismos, mas também de vegetais e animais, culminando na possibilidade de pesquisar o perfil genético, metabólico ou fisiológico de organismos pertencentes a um ambiente pré-determinado, ou que anteriormente não podiam ser explorados devido à incapacidade de cultivá-los (DE SOUZA; BRUSAMARELLO, 2009; PESSOA FILHO, 2011; KERGOURLAY et al., 2015). Os projetos que visam a avaliação de microbiomas são bastante amplos quanto ao ambiente estudado, havendo dados já disponíveis relativos a águas, solos, ambientes múltiplos e específicos (XU, 2006).

Um produto que vem sendo analisado nos últimos anos quanto ao seu microbioma é o queijo, no qual se busca conhecer e entender a interação dos microrganismos atuantes nesse tipo de amostras visando o aprimoramento tanto dos processos de produção como da

qualidade microbiológica – enfatizando a segurança e o sabor, aroma e textura do alimento. Para tanto, no início da década de 2000, Coppola e colaboradores (2001) realizam um dos primeiros estudos de investigação de diversidade microbiana em queijo (Mozzarella) utilizando um método molecular como base para sua pesquisa, a PCR-DGGE. Passados quase 20 anos é possível observar uma quantidade crescente de pesquisas relacionadas à determinação do perfil microbiano em queijos. Em 2012 Quigley e colaboradores dão início a uma série de publicações relacionadas com a investigação metagenômica da microbiota bacteriana através do gene do rRNA 16S, análise de dados por sequenciamento e bioinformática. Desde essa primeira publicação com um queijo artesanal irlandês foram relatados outros estudos com o mesmo objetivo, porém com alvo em diferentes tipos de queijo: Herve (DELCENSERIE et al., 2014), May bryndza (PANGALLO et al., 2014), Vorarlberger Bergkäse (SCHORNSTEINER et al., 2014), Cotija (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2016), Minas (CASTRO et al., 2016). Em 2014, Pangallo e Schornsteiner e seus colaboradores incluem em suas publicações dados relacionados a eucariotos presentes em suas amostras de queijo, completando as pesquisas de identificação de microbiomas.

Em 2010 o EMP, do inglês, ‘Earth Microbiome Project’ foi lançado com o objetivo de reunir dados acerca dos padrões microbianos nos biomas e habitats existentes na Terra e analisar e caracterizar a vida microbiana no planeta. Dando o pontapé inicial para a formação de um banco de dados universal contendo modelos metabólicos ambientais, perfis proteicos, um verdadeiro atlas global de genes ambientais (EARTH MICROBIOME PROJECT, 2010). Seguindo essa tendência foi então criado o BMP, também do inglês, ‘Brazilian Microbiome Project’, um projeto brasileiro com parceria internacional que propõe a formação de um banco de dados de metagenoma brasileiro por meio da interação entre projetos antigos e novos conectando, padronizando-os e dando suporte para uma maior visibilidade da diversidade brasileira pouco explorada (BRAZILIAN MICROBIOME PROJECT, 2012).

3.3.1 Metagenômica

O termo metagenômica foi descrito primeiramente por Jo Handelsman (1998) e representa um conjunto de técnicas que contorna a necessidade do uso de meios de cultivo e é baseada na investigação de moléculas de DNA. As informações obtidas a partir da análise de metagenomas, ou seja, vários genomas podem ser usadas para determinar a diversidade de uma comunidade ou microbioma informando os organismos predominantes ou específicos, prospecção do potencial metabólico e localização de genes responsáveis pela síntese de

moléculas com propriedades de interesse biotecnológico, o que conseqüentemente pode gerar melhorias nas características de produtos analisados, gerando dados confiáveis acerca de quem são, quantos são e como estão agindo os organismos atuantes em amostras de alimentos (RODRIGUES, 2011).

3.4 TECNOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DO DNA

Em 1977, Maxam e Gilbert propõem uma nova tecnologia que revolucionou o estudo da Biologia Molecular. O sequenciamento do DNA trouxe uma nova forma de estudo para diversas áreas. Particularmente em relação à Microbiologia, nesse momento era permitido o conhecimento de genes e genomas, o que abre um leque de possibilidades para a exploração dos microrganismos, relacionando-os e classificando-os evolutivamente quanto a sua genética e não quanto a sua morfologia. Nesse mesmo ano Sanger e colaboradores também propõem uma metodologia de sequenciamento, porém diferente de Maxam e Gilbert que utilizaram a degradação química do DNA como princípio, esta é baseada no uso dos didesoxinucleotídeos (ddNTP) marcados com corantes nas terminações de modo a controlar a polimerização, determinando a sequência de nucleotídeos da molécula, juntamente com passos como a clonagem bacteriana ou PCR, purificação dos fragmentos de interesse e eletroforese capilar. Após 10 anos a Applied Biosystems desenvolve um sequenciador automático com leitura feita por meio de um computador usando o método Sanger como base para o funcionamento do sistema (VENTER et al., 2001; METZKER, 2010).

Os métodos de Maxam-Gilbert e Sanger foram únicos e perduraram por aproximadamente vinte anos, sendo utilizados até no Projeto Genoma Humano que foi finalizado no início de 2000 e publicado em 2001 por Venter e colaboradores. A partir da primeira geração da tecnologia de sequenciamento, diferentes protocolos com combinações específicas de métodos geraram as chamadas Next-Generation Sequencing - NGS (Próxima geração de sequenciamento), o que caracteriza cada plataforma e determina os tipos de dados produzidos (METZKER, 2010).

A segunda e terceira geração de sequenciamento ou NGS tentou suprir a necessidade da amplificação *in vivo* de fragmentos do DNA, simplificando o processo de preparação das bibliotecas e reduzindo a contaminação do DNA. Elas são caracterizadas como tecnologias de alto rendimento, ou seja, apresentam a capacidade de leitura de muitas sequências em menor

tempo e com menor custo em relação à geração anterior (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015). Essa geração teve início após a publicação do trabalho de Ronaghi e cooperadores em 1998 anunciando uma nova metodologia de sequenciamento. Em 2005, a 454 Roche produziu comercialmente a plataforma baseada no pirosequenciamento de Ronaghi. A plataforma tinha o seu funcionamento relacionado à leitura das sequências por reações enzimáticas que liberavam um pirofosfato resultante da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia de nucleotídeos. O pirofosfato é convertido em ATP e utilizado pela luciferase como agente oxidante produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera presente no sistema (CARVALHO; SILVA, 2010). A partir de 2006, outras novas plataformas foram sendo desenvolvidas: a Illumina Solexa, que tem performance semelhante ao princípio de Sanger, porém, com a PCR em fase sólida, feita em uma plataforma sólida de vidro; o Ion Torrent análogo ao 454 Roche, porém com a particularidade de detecção de prótons liberados durante a incorporação dos nucleotídeos e a SOLID[®] (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) desenvolvida por Applied Biosystems[®] e tem como principal característica o fluxo de ação pela enzima DNA ligase e não pela polimerase, como as demais plataformas e ligação do DNA fragmentado em adaptadores e ligação desse produto em ‘beads’ (METZKER, 2010; CARVALHO; SILVA, 2010; SILVA et al., 2013; QUAIL et al., 2012; ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015).

A Heliscope[™], PacBio e Oxford Nanopore determinam o início da terceira geração da tecnologia de sequenciamento. Essa geração é marcada pelo desenvolvimento de soluções para custo e tempo de análise e para a necessidade de amplificação, problemas de leitura de sequências e produção de sequências mais longas. Apesar dessas vantagens, os sistemas mais recentes possibilitam maiores taxas de erro nos dados obtidos, o que pode ser corrigido por meio do uso de sequências maiores. Mesmo tendo sido desenvolvidas mais recentemente (últimos seis anos), a última geração existente das plataformas de sequenciamento não é utilizada para estudos de análise de metagenomas, pois até o ano de 2015 não existiam ferramentas computacionais disponíveis para a o processamento desse tipo de informação (PEREIRA et al., 2013; ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015).

3.5 BIOINFORMÁTICA

Com o desenvolvimento da Biologia Molecular, todo o fluxo da informação biológica e o surgimento da técnica de sequenciamento do DNA e proteínas gerados a partir de diversos

organismos deram início a era da Bioinformática ou Biocomputação (ARAÚJO et al, 2008; DE MELLO PADILHA et al, 2008).

Essa nova ciência teve seu começo pela busca do armazenamento dos dados gerados com o avanço das pesquisas relacionadas aos projetos genoma. Paralelamente a isso houve a necessidade de análise desses dados, o que parecia que plataformas computacionais fossem eficazes na solução de tais problemas (PROSDOCIMI et al., 2002). Então surgiram softwares com o objetivo principal de processamento de dados na área da Ecologia e Genética Microbiana. Também houve o surgimento dos bancos de dados online, que são muito importantes no sentido de armazenamento e compartilhamento de informações de maneira instantânea.

O ápice da Bioinformática veio juntamente com o uso da internet, quando foi possível a rápida análise de dados e a troca de informação sobre códigos biológicos e computacionais havendo um compartilhamento de bancos de dados e construção de sistemas *in silico* (ESPÍNDOLA et al., 2010). Dado o sucesso e a atual importância da Bioinformática, os softwares utilizados no processamento de informações, em grande parte, são desenvolvidos para ser executado em sistemas operacionais (SO) do tipo Linux por serem mais confiáveis, suportarem uma carga maior de dados sendo processados em comparação ao outros SO e possuírem códigos abertos e distribuição gratuita, o que o torna acessível a qualquer pesquisador (PROSDOCIMI et al., 2002).

3.5.1 Programas e Análise de Dados

Os projetos direcionados à investigação de diversidade microbiana procariótica e eucariótica em queijo tendem a utilizar, em sua maior parte, a tecnologia da Illumina[®] para a preparação de bibliotecas e sequenciamento das amostras. Pois, ela tem uma capacidade reduzida, quando comparada às demais plataformas, de custo e de geração de erros em seus resultados (CAPORASO et al, 2012; ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015). Para a interpretação desses dados, nas últimas duas décadas muitos programas vem sendo desenvolvidos com a tentativa de suprir as necessidades de análise e predição de diversos parâmetros a serem observados em estudos de Ecologia e taxonomia microbiana (Tabela 1).

Alguns parâmetros analisados em investigações de microbiomas são a biodiversidade, que é baseada na riqueza de espécies e pode ser subdividida em: α (diversidade alpha é o número total de espécies em um habitat) e β (diversidade beta é a mudança de espécies ao

longo de um gradiente ambiental) (NOGUEIRA et al., 2008); métodos de agrupamento das Unidades Taxonômicas Operacionais – OTUs, que são grupos taxonômicos produzidos a partir da avaliação de sequências de DNA; quantidade e qualidade das sequências obtidas, classificação taxonômica e abundância e diversidade de espécies.

Tabela 1. Alguns programas utilizados para análise de microbiomas por meio de metagenoma

Programa	Função	Referência
Fasttree	Construção de grandes filogenias e estimativa de confiabilidade	PRICE et al., 2009
FLASH	Ajuste dos comprimentos das sequências	MAGOČ; SALZBERG, 2011
MEGAN	Análise taxonômica e funcional de sequências de metagenomas	HUSON;WEBER, 2013
MetagenomeSeq	Análise da diferença de abundância de genes 16S em dados de metaperfil	PAULSON et al., 2013
Mothur	Classificação taxonômica, análise de qualidade das sequências, estimativa de diversidade	SCHLOSS et al., 2009
MUSCLE	Alinhamento de múltiplas sequências, estimativa de árvore filogenética	EDGAR, 2004
PyNAST	Alinhamento de múltiplas sequências	CAPORASO et al., 2010
QIIME	Controle de qualidade das sequências, anotação taxonômica, estimativa de diversidade	CAPORASO et al., 2010
R	Análise de espaço e uso do habitat por “animais”	CALENGE, 2006
UCHIME	Detecção e remoção de quimera	EDGAR et al., 2011
Uparse	Produção de OTUs	EDGAR et al., 2013

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E DIVISÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas um total de oito amostras de queijo do tipo coalho dos quais quatro foram provenientes de uma queijaria que utiliza leite pasteurizado conforme o padrão exigido para a produção do seu produto e quatro amostras produzidas por um feirante vendedor de produtos lácteos que utiliza o leite fresco como matéria-prima. Todas as amostras foram coletadas durante o primeiro dia de fabricação do queijo, e seguiram imediatamente para o LABIN (Laboratório de Biorreatores, Nanobiotecnologia e Inovação) em caixas de isopor contendo gelo em gel para evitar o aquecimento do produto até a sua utilização.

Para análise do gene do rDNA 16S, as amostras foram divididas em dois grupos, dos quais 4 amostras formavam o Grupo A (P1, P2, P3 e P4), que eram provenientes do leite pasteurizado e 4 amostras formavam o Grupo B (C1, C2, C3 e C4), provenientes do leite cru e para análise do gene do rDNA 18S as amostras foram divididas em Grupo A (P2) e Grupo B (C3), seguindo o mesmo critério quanto ao tipo de leite utilizado na sua produção.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

A extração do DNA foi realizada por meio do PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, California, USA), onde as amostras recém-chegadas ao LABIN eram fatiadas de acordo com a figura 1 e os 100g finais obtidos eram separados e homogeneizados. Da massa homogeneizada eram separados 0,25g, que eram colocadas em um tubo powerbead e agitadas suavemente para a homogeneização com o conteúdo do tubo. Posteriormente eram adicionados 60µL da solução C1 e colocadas em um agitador vortex (ARSEC ts200) durante 10 min em velocidade máxima, e centrifugadas (Eppendorf™ centrifuge 5810 R) durante 1 min a 24 °C e 4000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 2 mL e adicionado 250 µL da solução C2 e agitado em vortex por 5 s e incubado a 8 °C por 10 min. O microtubo foi centrifugado por 2 min a 24 °C e 4000 rpm, o sobrenadante foi retirado, em um volume de até 600 µL, e transferido para um novo microtubo de 2 mL, onde era adicionada a solução C3, brevemente agitado e incubado a 8 °C por 10 min. O microtubo foi novamente centrifugado por 2 min a 24 °C e 4000 rpm, o sobrenadante retirado até 750 µL e

posto juntamente com 1200 μL da solução C4 e misturados por 5 s. Dividido em três alíquotas de aproximadamente 650 μL , cada parte era centrifugada em um mesmo microtubo com filtro por 2 min a 24 °C e 4000 rpm. Logo após as centrifugações o filtro era colocado cuidadosamente em um microtubo limpo e adicionado 500 μL da solução C5, o qual passava por mais uma centrifugação por 3 min a 24 °C e 4000 rpm. Por fim, o filtro foi colocado em outro microtubo e adicionado 100 μL da solução C6. Havia uma centrifugação com duração de 1 min a 24 °C e 4000 rpm, o filtro era descartado e a amostra armazenada em freezer.

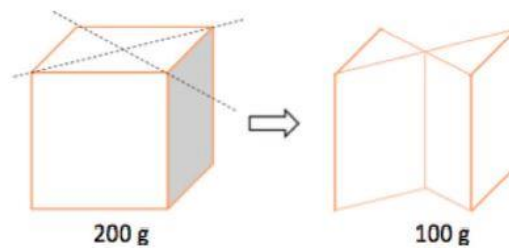


Figura 1. Ilustração do procedimento de corte das amostras (DELCENSERIE et al., 2014)

4.3 GEL DE AGAROSE PARA ELETROFORESE

Para análise da integridade e pureza do DNA, as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE 1X, o qual foi também utilizado como tampão de corrida. As amostras de DNA foram aplicadas no gel com 1/20 do volume de corante de corrida Blue Green (LCG Biotecnologia) tendo como padrão de peso molecular DNA *Ladder* 100pb (Green Bio Resource). Foram utilizados os seguintes parâmetro no gel de corrida: 100 V, 80 mA e 30 min. Após a eletroforese o gel foi visualizado num transiluminador com luz ultravioleta.

4.4 ANÁLISE DA DENSIDADE ÓPTICA EM ESPECTROFOTÔMETRO

Para análise da concentração e pureza, as amostras foram analisadas quanto a absorvância por meio do espectrofotômetro (Bel Photonics sp 2000 uv) em comprimentos de onda em 260 nm e 280 nm, os quais correspondem ao pico de absorvância de DNA e proteínas, respectivamente. Para a obtenção da concentração foi utilizada a diluição de 3 μL de amostra para 3000 μL de água ultra pura aplica a seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \times \text{Fator de diluição (1000)}.$$

Quanto à pureza, a relação A_{260}/A_{280} fornece uma estimativa de quão pura a amostra está, onde os valores obtidos deveriam apresentar valores próximos à zero ou inferiores a 1,75, indicando que as amostras estão livres de contaminações (OLIVEIRA et al., 2007).

4.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA

Para a realização do sequenciamento as amostras foram enviadas para a empresa GenOne, onde foram realizadas as etapas seguintes:

4.5.1 Produção dos Amplicons

As regiões V3-V4 do gene 16S e V4 do gene 18S do rRNA foram amplificadas utilizando os seguintes primers: 341F – CCTAYGGGRBGCASCAG (HERLEMANN, et al., 2011) e 806R – GGACTACNNGGGTATCTAAT (APPRILL, et al., 2015) para 16S e 528F – GCGGTAATTCCAGCTCCAA (POTVIN; LOVEJOY, 2009) e 706R – AATCCRAGAATTTACCTCT para 18S. Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

4.5.2 Análise de Qualidade e Quantificação dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2% em tampão de corrida 1X contendo SYBR Green. As amostras com a marca principal entre 400 e 450pb foram selecionadas para os passos seguintes.

4.5.3 Mistura e Purificação dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram misturados em taxas de equidensidade. As misturas foram purificadas com Qiagen Gel Extration Kit (Qiagen, Germany).

4.5.4 Preparação das Bibliotecas e Sequenciamento

As bibliotecas foram geradas usando TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, USA) de acordo com as instruções do fabricante e adicionado códigos de índice. A qualidade da biblioteca foi avaliada por Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo

Scientific) e pelo sistema Agilent Bioanalyzer 2100. A biblioteca foi sequenciada pela plataforma Illumina HiSeq2500 e geradas sequencias com 250pb.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

/

4.6.1 Montagem das Sequências e Controle de Qualidade

4.6.1.1 Divisão dos Dados

As leituras de extremidade emparelhadas foram atribuídas às amostras com base em seu código de barras exclusivo e quebradas por corte do código de barras e do primer.

4.6.1.2 Montagem das Sequências

As leituras de extremidade emparelhadas foram unidas usando o programa FLASH1.2.7, o qual uni as leituras quando, pelo menos, algumas se sobrepõem a leitura gerada a partir da extremidade oposta do mesmo fragmento de DNA, e essa união de sequências é chamada de ‘raw reads’.

4.6.1.3 Filtragem dos Dados

A filtragem para qualificação dos ‘raw reads’ foram realizadas sob condições que permitissem a alta qualidade dos ‘clean reads’ de acordo com QIIME1.7.0

4.6.1.4 Remoção de Quimeras

Os ‘reads’ foram comparados usando referencias do banco de dados (Gold) usado pelo UCHIME4.2.40 para detectar sequências quiméricas e então essas foram removidas.

4.6.2 Grupamentos OTU e Anotação das Espécies

4.6.2.1 Grupamentos OTU

A análise das sequências foram feitas pelo programa Uparse7.0.1001. As sequências foram agrupadas em OTUs por padrão de similaridade de 97% ou mais. As sequências representativas para cada OTU foram selecionadas para mais anotações.

4.6.2.2 Anotação das Espécies

Para cada sequência representativa o banco de dados GreenGene foi usado baseado no classificador RDP2.2 para a anotação da informação taxonômica.

4.6.2.3 Construção das Relações Filogenéticas

A fim de estudar as relações filogenéticas das diferentes OTUs e as diferentes espécies dominantes em cada grupo, o alinhamento de múltiplas sequências foram conduzidas usando o programa PyNAST1.2 (para avaliação do gene rRNA 16S) e MUSCLE3.8.31 (para avaliação do gene rRNA 18S).

4.6.2.4 Normalização dos dados

A abundância de OTUs foi normalizada utilizando como padrão para número de sequências a amostra com as menores sequências. As análises de alpha e beta diversidade foram baseadas nesse padrão de normalização.

4.7 FORMATAÇÃO DE GRÁFICOS E FIGURAS

Após o recebimento das sequências e análise de dados foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2010 com o objetivo de remodelagem de gráficos e figuras para melhor visualização e interpretação dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DA DENSIDADE ÓPTICA EM ESPECTROFOTÔMETRO

Os resultados referentes à quantificação do DNA por espectrofotometria podem ser observados na tabela 2. O protocolo de envio das amostras para o sequenciamento exigia que a concentração mínima de DNA para cada amostra fosse de 50ng/μL.

A análise por densidade óptica demonstrou que as amostras do grupo A, referentes ao queijo produzido com o leite pasteurizado, apresentaram maiores valores de concentração do DNA isolado em relação às amostras produzidas com o leite fresco.

Tabela 2. Valores referentes à absorvância das amostras em relação aos diferentes comprimentos de onda testados e a respectiva concentração de DNA por amostra

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	[DNA](ng/μL)
P1	1,104	2,500	55,2
P2	1,275	2,500	63,75
P3	1,249	2,500	62,45
P4	1,138	2,500	56,9
C1	1,130	2,500	56,5
C2	1,108	2,500	55,4
C3	1,135	2,500	56,75
C4	1,180	2,500	59

Por meio da relação A_{260}/A_{280} foram observados valores entre 0,4416 e 0,51 (tabela 3) caracterizando as amostras como de boa qualidade (OLIVEIRA et al., 2007) e sendo aptas as seguintes etapas do estudo, o que permitiu bons resultados para a amplificação e subsequente sequenciamento e identificação dos microrganismos presentes no queijo.

Tabela 3. Valor referente à relação A_{260}/A_{280} utilizada como indicador de qualidade da amostra

Amostra	Relação A_{260}/A_{280}
P1	0,4416
P2	0,51
P3	0,4996
P4	0,4552
C1	0,452
C2	0,4432
C3	0,454
C4	0,472

5.2 PROCESSAMENTO DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO

Os resultados das etapas de sequenciamento das bibliotecas, pré-tratamento e controle de qualidade das sequências estão demonstradas nas tabelas 4 e 5, nas quais podem ser observadas as quantidades de sequências totais obtidas por amostra, sequências efetivas (quantidade de sequências sem quimeras e *primers*), o tamanho dos fragmentos gerados, o

percentual de bases incorretas inseridas no sequenciamento quanto aos parâmetros de Q20 (probabilidade de erro de 1 para cada 100 bases produzidas) e Q30 (probabilidade de erro de 1 para cada 1000 bases produzidas) e o conteúdo de GC.

Tabela 4. Dados do sequenciamento das bibliotecas do gene rDNA16S, pré-tratamento e controle de qualidade das sequências

Amostra	Sequências Brutas	Sequências Efetivas	Bases (nt)	Comprimento Fragmentos (nt)	Q20	Q30	Conteúdo GC	Eficiência
P1	77.452	30.488	13.043.311	428	97.21%	94.62%	52.08%	39.36%
P2	79.330	29.326	12.552.070	428	97.23%	94.65%	51.99%	36.97%
P3	71.266	34.764	14.903.421	429	97.16%	94.46%	52.21%	48.78%
P4	70.986	33.857	14.494.849	428	97.25%	94.73%	51.80%	47.70%
C1	78.653	39.043	16.695.641	428	97.22%	94.55%	51.75%	49.67%
C2	77.355	24.393	10.192.603	418	97.25%	94.66%	52.72%	31.53%
C3	71.327	28.428	12.103.023	426	97.28%	94.69%	53.07%	39.86%
C4	73.757	31.190	13.220.824	424	97.29%	94.73%	53.28%	42.29%

Tabela 5. Dados do sequenciamento das bibliotecas do gene rDNA 18S, pré-tratamento e controle de qualidade das sequências

Amostra	Sequências Brutas	Sequências Efetivas	Bases (nt)	Comprimento Fragmentos	Q20	Q30	Conteúdo GC	Eficiência
P2	62.340	58.631	18.037.588	308	98.65%	97.48%	51.17%	94.05%
C3	69.862	64.774	19.950.730	308	98.45%	97.13%	51.24%	92.72%

O sequenciamento de DNA Illumina foi utilizado nesse estudo, pois é uma tecnologia relativamente barata que apresenta baixos índices de erro e é processada em pouco tempo. A probabilidade de acertos são observáveis nos valores de Q20 que variaram entre 97,16% e 98,65% e Q30 que variaram entre 94,46% e 97,48% entre as amostras analisada tanto para o gene ribossomal 16S quanto para o gene ribossomal 18S. Por meio desses valores fica notório o baixo percentual de ocorrer erros nas identificações das bases geradas (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015).

Quanto ao conteúdo de CG, ele é utilizado como indicador de diversidade da amostra, ou seja, quanto maior o conteúdo na amostra, maior sua diversidade (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015). As amostras C3 e C4, quando analisadas quanto ou gene ribossomal 16S, foram as

amostras que demonstraram o maior conteúdo de CG e conseqüentemente maior diversidade. Isso pode ser confirmado com a observação dos valores de sequências únicas descritas na tabela 6, que também são maiores para as duas amostras

A menor eficiência do processo de sequenciamento das amostras para o gene do rDNA 16S em relação às amostras para o gene do rDNA 18S ocorreu devido ao tamanho dos comprimentos dos fragmentos gerados. Os tamanhos dos fragmentos foram entre 418 e 429; e 308, respectivamente, para 16S e 18S. O uso da tecnologia Illumina MiSeq no processo de sequenciamento torna-se mais eficaz quando geradas seqüências em torno de 250pb (BURKE; DARLING, 2016).

5.3 ANÁLISE DAS OTUS E ANOTAÇÃO DAS ESPÉCIES

5.3.1 Análise das seqüências e das OTUs

As tabelas 6 e 7 mostram os dados relacionados ao total de seqüências obtidas, classificadas, não-classificadas e únicas, assim como também as quantidades de unidades taxonômicas operacionais produzidas para cada amostra de cada grupo.

As seqüências de DNA procarioto e eucarioto obtidas foram identificadas e distribuídas num total de 4908 e 111 OTUs, respectivamente (Tabela 6 e 7).

As amostras de queijo de coalho produzidas a partir do leite fresco apresentaram maior quantidade de seqüências não-classificadas e seqüências únicas indicando maior diversidade de organismos e maior quantidade de microrganismos que possivelmente não possuem o genoma sequenciado ou são totalmente desconhecidos. Isso pode ser explicado porque o uso do processo de pasteurização do leite acarreta na redução da carga microbiológica para o controle da proliferação de microrganismos indesejáveis em alimentos (VENTURINI et al., 2007).

Tabela 6. Dados referentes à quantidade de sequências e OTUs registradas para as amostras do gene rDNA 16S

Amostra	Sequências totais	Sequências classificadas em Táxons	Sequências não-classificadas	Sequências Únicas	Número de OTUs
P1	30488	29903	1	584	691
P2	29326	29161	0	165	202
P3	34764	34336	50	378	254
P4	33857	33240	74	543	717
C1	39043	38534	26	483	866
C2	24393	22961	948	484	968
C3	28428	27260	10	1158	542
C4	31190	30528	48	614	668
Total	251489	245923	1157	4409	4908

Tabela 7. Dados referentes à quantidade de sequências e OTUs registradas para as amostras do gene rDNA 18S

Amostra	Sequências totais	Sequências classificadas em Táxons	Sequências não-classificadas	Sequências Únicas	Número de OTUs
P2	58631	57249	84	1298	53
C3	64774	62885	104	1785	58
Total	123405	120134	188	3083	111

5.3.1.1 Diagrama de Venn

A etapa de normalização dos dados tem como objetivo unir as OTUs produzidas previamente por similaridade para que não haja uma grande diferença entre as quantidades de sequências entre as amostras. Após essa etapa as 4908 OTUs foram reagrupadas em um total de 1793 nos grupos A e B que foram avaliados quanto ao gene rDNA 16S. O grupo A foi composto por 842 OTUs exclusivas e o grupo B por 331, e os dois grupos compartilharam 620 unidades taxonômicas como mostra a figura 2. Para os grupos avaliados quanto ao gene rDNA 18S o reagrupamento as OTUs totalizou o valor de 66, das quais 17 eram exclusivas do grupo A, 11 do grupo B e 38 eram compartilhadas entre os dois grupos (Figura 3).

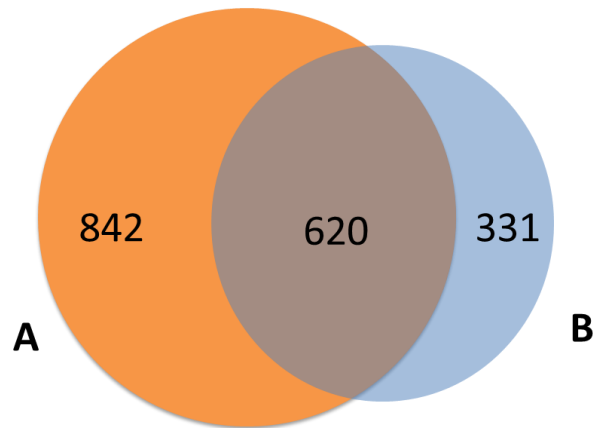


Figura 2. Diagrama de Venn demonstra a quantidade de OTUs exclusivas e compartilhadas do Grupo A e B após análise do gene 16S do rDNA

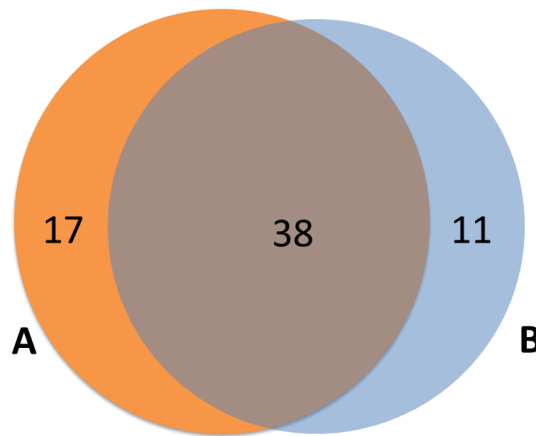


Figura 3. Diagrama de Venn demonstra a quantidade de OTUs exclusivas e compartilhadas do Grupo A (amostra P2) e B (amostra C3) após análise do gene 18S do rDNA

5.3.2 Anotação das Espécies

Para a investigação dos procariotos, as OTUs do grupo A (P1, P2, P3, P4) e do grupo B (C1, C2, C3, C4) foram distribuídas de acordo com os organismos representantes do Domínio Bactérias e Archaeas encontrados nas amostras do queijo (Tabela 8).

Tabela 8. Valores percentuais de organismos procariotos identificados e não-identificados nas amostras de queijo de coalho

Classificação	Amostra							
	P1	P2	P3	P4	C1	C2	C3	C4
Archaea	0.1%	0.4%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
Bactéria	99.9%	99.6%	99.8%	99.8%	99.9%	95.9%	100%	99.7%
Não-classificado	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%	0.1%	4.0%	0.0%	0.2%

Na tabela 8 estão apresentados os valores percentuais por amostra, de microrganismos identificados como Bactérias, Arqueas ou não identificadas. A amostra C2 possuiu o maior percentual de microrganismos não classificados (4,0%) corroborando com a tabela 6 que indicou o maior número de seqüências não-classificadas tanto com relação ao grupo A quanto para o grupo B.

Em relação à investigação de eucariotos, as seqüência obtidas foram identificadas em 66 OTUs (Figura 3). De acordo com a classificação taxonômica a amostra P2 estava composta por 46,6% das suas OTUs identificadas como do reino Animal, 46,7% do reino Fungi, 6,5% do reino Plantae, 0,1% reino Protista e 0,1% não identificadas. Para a amostra C3, 52,1% das OTUs representavam organismos do reino Animal, 46,6% do reino Fungi, 0,8% do reino Plantae, 0,3% reino Protista e 0,2% não classificados.

5.3.2.1 Análise da distribuição de seqüências

Foram geradas um total de 245923 seqüências passíveis de identificação e então distribuídas em classes taxonômicas: 126640 seqüências pertenciam ao grupo A e 119283 ao grupo B (Tabela 6). As quantidades de seqüências produzidas para cada amostra analisada e seus respectivos níveis de classificação taxonômica podem ser observadas nos gráficos 1 e 2.

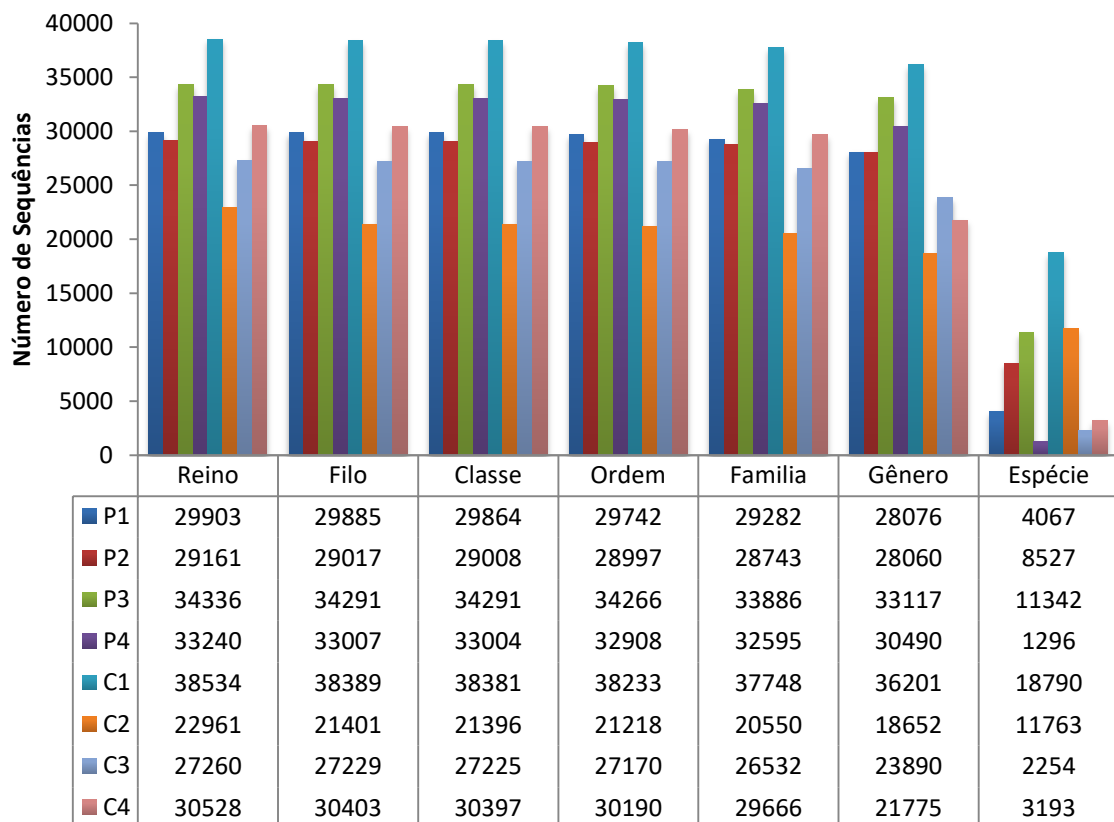


Gráfico 1 . Representação do número de seqüências produzidas por amostra, e classificadas por nível taxonômico quanto a análise do gene rDNA 16S

No gráfico 1 é possível observar que um maior número de sequências foram capazes de classificar microrganismos em seus níveis de família, gênero e espécie. A amostra C1 foi aquela que apresentou a maior quantidade de sequências identificadas quanto as suas espécies. O grupo B também apresentou essa tendência em relação ao grupo A. Para a classificação em nível de gênero o maior número de sequências classificadas nesse nível pertencia ao grupo A.

Para a identificação dos eucariotos na amostra P2 97,3% das sequências foram identificadas no nível taxonômico de espécie, ou seja, houve quase completamente reconhecimento de todas as células eucarióticas presentes em P2. Para C3 esse índice percentual apresentou uma queda atingindo o valor de 80,2% da quantidade de sequências identificadas no nível de espécie (Gráfico 2).

A baixa eficiência do sequenciamento (Tabela 4) ou a falta de dados disponíveis em bancos de dados pode ter ocasionado a diferença na quantidade de sequências que puderam ser classificadas em espécie para as amostras investigadas quanto ao gene rDNA 16S. Pois menos de 50% das sequências depositadas em bancos de dados são de microrganismos não cultiváveis (ALMEIDA, 2009).

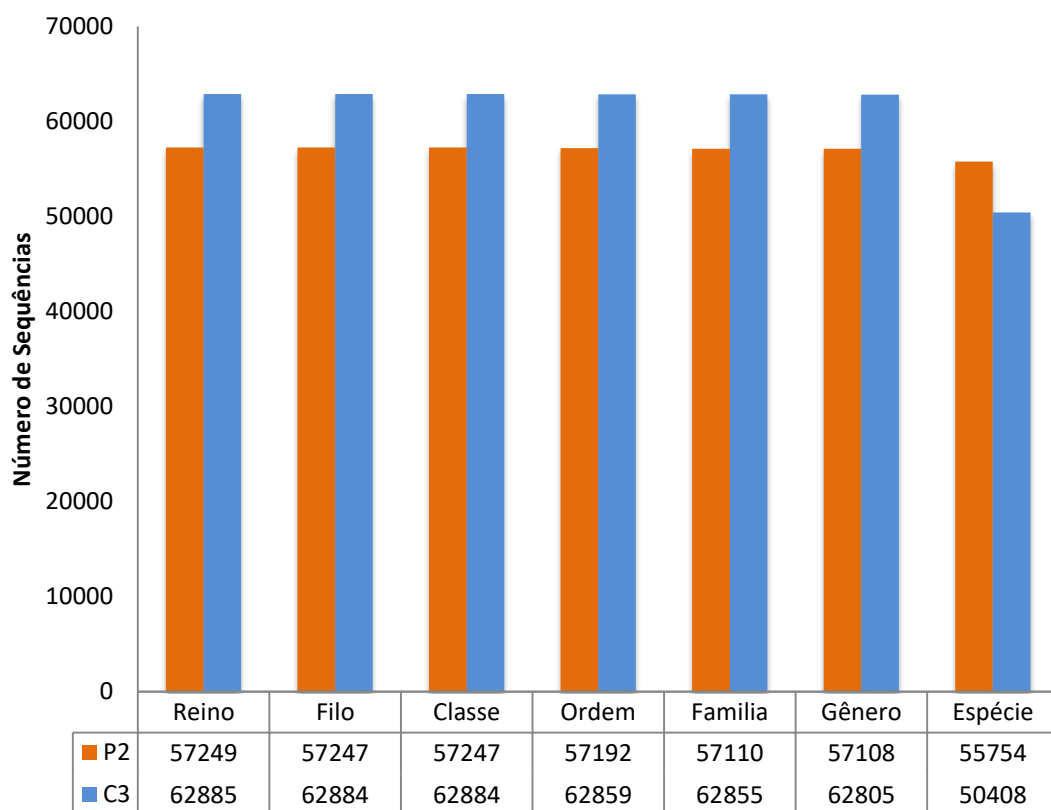


Gráfico 2. Representação do número de sequências produzidas por amostra, e classificadas por nível taxonômico quanto a análise do gene rDNA 18S

5.3.2.2 Disposição da abundância relativa das espécies

Os filios do Domínio Bactéria e Archaea identificados nas amostras dos grupos A e B estão representados no gráfico 3 e podem ser observados abaixo. Em relação a esse nível de classificação, os três maiores representantes encontrados foram: Proteobactéria, Firmicutes e Actinobactéria (Tabela 10). Todos eles já foram relatados em estudos anteriores quanto a sua presença em queijos (IRLINGER, et al., 2015).

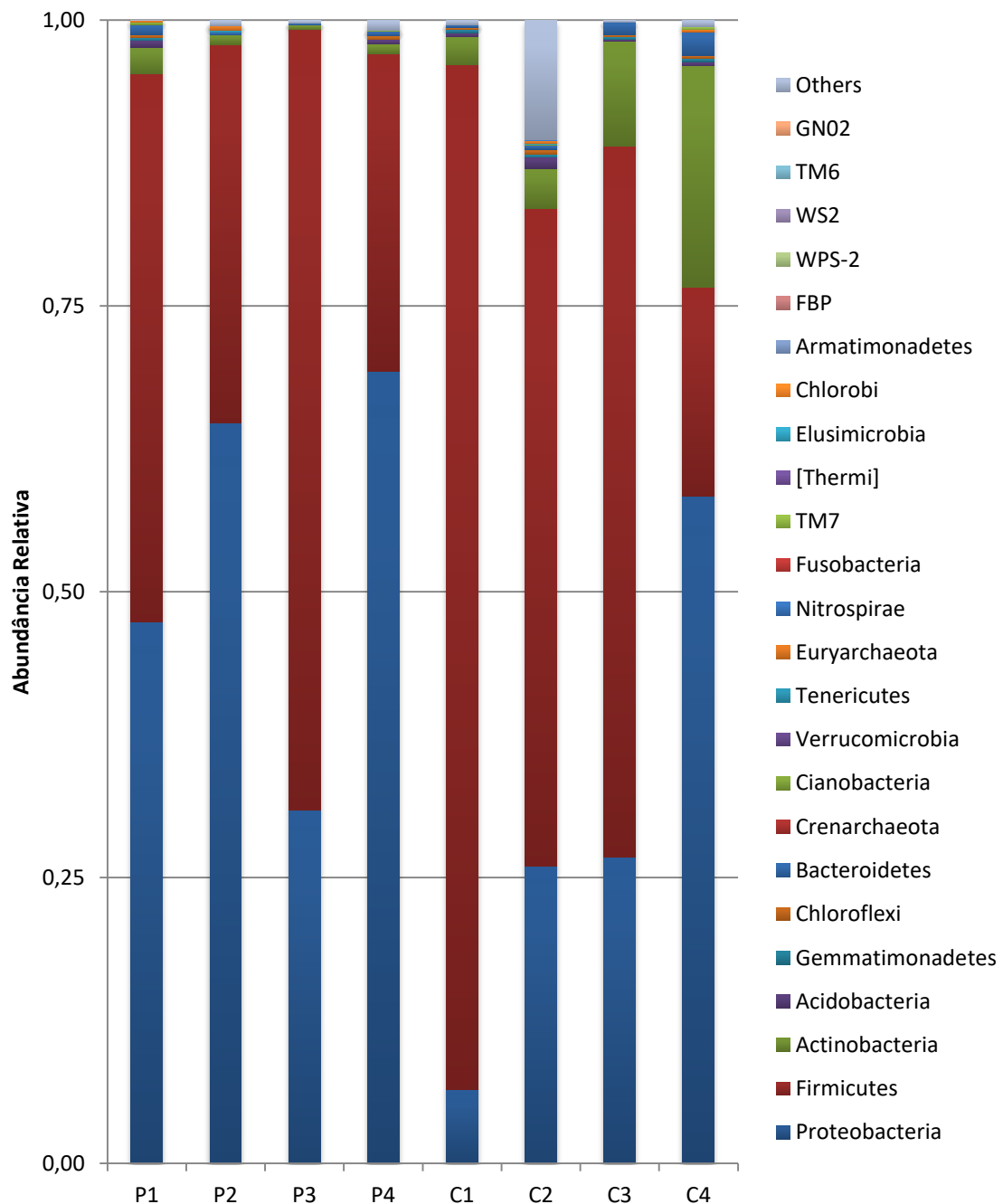


Gráfico 3. Histograma demonstrando a distribuição relativa de filios identificados nas amostras de queijo de coalho por análise do gene rDNA 16S

A amostra C1 demonstrou possuir o maior percentual de bactéria do filo Firmicutes em relação às demais amostras, P3 também apresentou um índice elevado de presença de Firmicutes. Este filo é composto por, principalmente, bactérias do gênero *Bacillus* e *Clostridium*, e todas as suas espécies são de BAL, ele possui a característica de tanto ser útil como prejudicial tanto na saúde humana como na microbiota de comidas e bebidas (HAAKENSEN et al., 2008; VAL-MORAES, 2008). O *Bacillus cereus* é uma espécie de bactéria amplamente associada a doenças causadas por surtos alimentares (LUND, 1990; ANDERSSON et al., 1995). Nesse estudo este microrganismo foi detectado em amostras tanto do queijo feito por leite cru quanto por leite pasteurizado, sendo encontrada uma maior quantidade de OTUs nas amostras pasteurizadas, o que pode ser proveniente da má higienização do animal doador do leite, uma ineficácia no tratamento térmico do leite ou até mesmo uma falha em alguma etapa de produção do produto.

As amostras P2, P4 e C4 apresentaram níveis acima de 50% de composição de bactérias do filo Proteobactéria, enquanto que C1 atingiu níveis próximos a 10%. As proteobactérias são as mais diversificadas fenotipicamente entre os procariotos (DA SILVA, 2012) e o maior grupo de bactérias cultivadas, desempenham um papel importante no ciclo do nitrogênio e são encontradas em ambientes de pH mais elevado (VAL-MORAES, 2008), o que pode demonstrar elevada acidez do queijo utilizado nas três amostras.

De acordo com Shin e colaboradores (2015) a microbiota intestinal de um ser humano adulto saudável possui em torno de 4,5% de bactérias do filo Proteobactéria, podendo ser alterado esse valor por condições como câncer, inflamações ou excesso de peso, desta forma as amostras que apresentam valores elevados destes microrganismos podem indicar perigo a saúde ao serem consumidos, pois podem causar um desequilíbrio nessa microbiota se ingeridos em grandes quantidades.

As Actinobactérias foram encontradas, principalmente, em C3 e C4, elas são bactérias que apresentam um cultivo lento, pois são produtoras de antibióticos (VAL-MORAES, 2008), o que pode significar um fator favorável à qualidade higiênico-sanitária do queijo, pois elas podem inibir o desenvolvimento de determinados patógenos (MANIVASAGAN, et al., 2014). A *Propionibacterium acnes* é uma actinobactéria que foi identificada em todas as amostras cruas e pasteurizadas, entretanto, particularmente em maior quantidade em C4, ela é descrita como um microrganismo comensal normalmente encontrado na pele humana e desencadeia a

acne (BRÜGGEMANN et al., 2004). A presença desse patógeno no alimento pode indicar a má higienização das mãos dos manipuladores em alguma etapa da produção do queijo.

Quanto aos gêneros de bactérias, a média aritmética das quatro amostras de cada grupo (A e B) está representada na tabela 9. Alguns dos gêneros mais abundantes identificados faziam parte das BAL, todavia nem todos eram pertencentes a este grupo, mas são comumente encontradas em queijos fazendo parte da microbiota natural do produto feito industrial ou artesanalmente (DELCENSERIE et al., 2014; IRLINGER et al., 2015).

Tabela 9. Valores percentuais das médias aritméticas quanto à abundância em nível de gênero identificado nas amostras dos grupos A e B

Gênero	Filo	Grupo A	Grupo B
<i>Acinetobacter</i>	Proteobactéria	23,07%	11,22%
<i>Bacillus</i>	Firmicutes	0,27%	0,12%
<i>Carnobacterium</i>	Firmicutes	2,1%	0,07%
<i>Enterococcus</i>	Firmicutes	17,47%	1,72%
<i>Escherichia</i>	Proteobactéria	0,12%	0,2%
<i>Halomonas</i>	Proteobactéria	0,12%	0,15%
<i>Lactobacillus</i>	Firmicutes	0,6%	10,05%
<i>Lactococcus</i>	Firmicutes	1,67%	0,5%
<i>Macrococcus</i>	Firmicutes	7,57%	13,35%
<i>Pseudomonas</i>	Proteobactéria	0,17%	0,1%
<i>Psychrobacter</i>	Proteobactéria	8,32%	0,55%
<i>Serratia</i>	Proteobactéria	0,8%	0,1%
<i>Staphylococcus</i>	Firmicutes	1,12%	3,3%
<i>Streptococcus</i>	Firmicutes	11,85%	25,9%
<i>Vibrio</i>	Proteobactéria	14,32%	3,65%

As *Acinetobacter* compreendem um conjunto de espécies que apresentam resistência a antibióticos (BONOMO; SZABO, 2006) e pertencem a mesma classe (gammaproteobactérias) de microrganismos que a *Salmonella* e a *Pseudomonas aeruginosa*, que são patógenos, porém a *A. johnsonii* não apresenta resistência a antibióticos quando isolada e é encontrada em animais e no ambiente (MONTAÑA et al., 2006), podendo não causar danos à saúde humana, apesar de também ser isolada de ambientes hospitalares. Essa bactéria foi observada em todas as amostras do queijo de coalho.

Os *Enterococcus* são um grupo de microrganismos com mais de 20 espécies identificadas, das quais duas (*E. faecium* e *E. faecalis*) são mais frequentes em alimentos, essas duas bactérias são encontradas no intestino da maioria de seres humanos e em amostras de queijo fabricado com leite cru (MURRAY, 1990; CARIDI et al., 2003; DELCENSERIE et al., 2014) e possui influência nas características sensoriais de queijo. Também pode ser um indicador de contaminação quando encontrada em grandes quantidades em uma amostra de queijo. Esse gênero foi amplamente encontrado nas amostras de queijo feito com o leite pasteurizado (grupo A) apresentando uma média aritmética de 17,47% do total de OTUs para essas amostras.

Lactobacillus são comumente encontradas nos alimentos fermentados, pois desempenham a função de redução do pH do meio, restringindo o ambiente a apenas outros microrganismos tolerantes ao meio ácido, devido a essa característica melhoram o sabor e a textura dos alimentos. Seu uso é considerado seguro na fermentação de produtos alimentícios (BRUNO, 2009).

Streptococcus são bactérias classificadas como ácido-láticas, pois convertem a lactose em ácido láctico causando a diminuição do pH no ambiente. A principal espécie utilizada nas fermentações de queijos é o *Streptococcus thermophilus* (BRUNO, 2009), porém a espécie desse gênero encontrada em todas as amostras dos grupos A e B foi o *S. luteciae*, que é um microrganismo típico do rúmen (VAHDAT et al., 2014).

Vibrios são bactérias marinhas encontradas em diversos lugares e tem passado por um processo de atenção, pois vem apresentando um aumento no número de espécies patogênicas (THOMPSON et al., 2004). O *Vibrio rumoienses* é um microrganismo resistente à atividade citotóxica do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) isolada de águas de drenagem de fábricas de processamento de peixes (ICHISE et al., 1999). Essa bactéria foi encontrada em todas as amostras de queijo avaliadas. Considerando o ambiente em que ela pode ser isolada (águas residuais de indústria) indica fonte de contaminação para o alimento, porém por ser observada em ambientes marinhos, essa pode ter sido incluída no queijo por meio do processo de salga.

Bactérias patogênicas não associadas a alimentos, mas que foram identificadas nesse estudo: *Rothia dentocariosa*, microrganismo isolado de infecções orais causadoras de cáries (MUNSON et al., 2004) e *Elizabethkingia meningoseptica* isolada de amostra de solo, água salgada e fresca, superfícies de equipamentos médico e ambientes hospitalares, ela é uma das causadoras da meningite (JEAN et al., 2014).

Ruminococcus flavefaciens é a espécie predominante no cécum de animais como o pônei e jumento (JULLIAND et al., 1999), outra espécie também pertencente ao trato digestivo de animais é a *Piscicoccus intestinalis* encontrada em peixes (KAGIA; LIU, 2014).

Em relação à identificação dos eucariotos, com a observação do gráfico 4 é possível perceber a abundância dos fungos classificados nos filo Ascomycota e Basidiomycota compondo em torno de 50% tanto da amostra P2 (Grupo A) quanto da amostra C3 (Grupo B). Outro tipo eucarioto de presença bastante significativa nas duas amostras foi o Animalia gerando valores de 46% de presença, ou seja, quase metade das sequências de DNA eucarioto classificado nas amostras pertencia a animais. Assim como existiam sequências classificados como pertencente à classe mammalia do Reino animal, também foi encontrada uma sequência da *Megaselia scalaris*, que é uma mosca parasitoide do carrapato já relatado na região Sudeste do Brasil (ANDREOTTI et al., 2003) e do *Penaeus semisulcatus*, uma espécie de camarão (Tabela 11). Esses dois últimos animais caracterizam a má qualidade dos procedimentos de higiene adotados pelos produtores dos queijos que foram utilizados nesse estudo. Pois de acordo com a legislação brasileira deve haver a higienização de equipamentos, utensílios, manipuladores dos produtos e da matéria-prima (BRASIL, 2002) e com todos os procedimentos realizados adequadamente não seria possível obter dados relacionados à presença de tantos organismos não pertinentes a fabricação de queijos.

Quanto aos gêneros de fungos em maior abundância destacaram-se: *Debaryomyces*, *Malassezia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Aspergillus*, *Dekkera*, *Lachancea*, *Yarrowia*, *Galactomyces* e *Davidiella*, podendo ser observados os onze gêneros em ambas as amostras analisadas.

Em outro estudo foram relatados gêneros de fungos comumente relatados em queijo coalho, como: *Candida*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Yarrowia* (ALMEIDA, 2011). Além dos gêneros já conhecidos e citados pela literatura quanto a sua presença em queijos foram também foram observados organismos indefinidos (Tabela11) e alguns incomuns para queijos como: o gênero *Oryza*, representante do arroz encontrada exclusivamente em P2 (DA SILVA et al, 1999); a espécie *Malassezia furfur*, que é uma levedura relacionada a doenças dermatológicas e foi identificada em P2 (DE OLIVEIRA LIMA et al., 2002; GUPTA et al., 2004), para C3 a identificação da *Malassezia* foi apenas a nível de gênero e a amostra apresentou menor quantidade de sequências para esse gênero em comparação a amostra pasteurizada; o gênero *Pichia*, leveduras da família

Saccharomycetaceae associadas a fezes de insetos (BARRETO et al., 1998). Apesar de parecer ser indicador de contaminação o gênero *Pichia* foi encontrado em 22% dos queijos analisados em pesquisas para investigação de fungos (IRLINGER et al., 2015), as espécies identificadas nesse estudo foram *P. membranifaciens* e *P. kudriavzevii*, sendo a *P. membranifaciens* caracterizada como um organismo contaminante de ambientes alimentares e paralelamente um potencial biocontrolador de *Botrytis cinerea*, o mofo de videiras (SANTOS; MARQUINA, 2004). A *P. kudriavzevii* uma levedura com potencial biotecnológico para produção de biodiesel pela fermentação de pele de frutas podres (SANKH et al., 2013). *Tritirachium oryzae* um fungo filamentosso causador de doenças nas unhas e comumente encontrado no solo (NASERI et al., 2013). Esses encontrados podem indicar a falta de higiene durante o preparo de alimentos pelo contato com insetos ou pela higienização inadequada das mãos dos manipuladores.

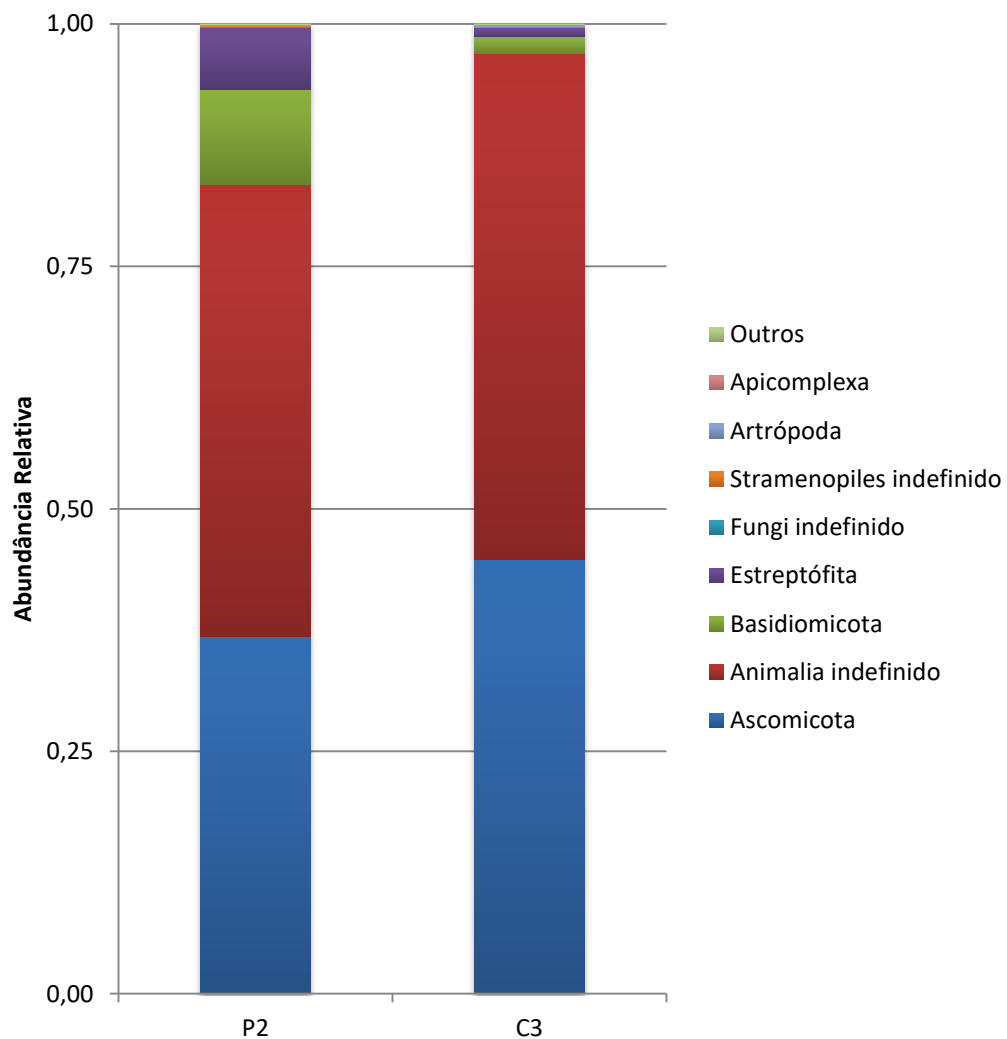


Gráfico 4. Histograma demonstrando a distribuição relativa de filos identificados nas amostras de queijo de coalho por análise do gene rDNA18S

Um gênero com vários representantes encontrados foi *Candida*, do qual foram vistas espécies como *C. pararugosa* também encontrada em vinhos (JENSEN, 2009), *C. tropicalis* que é um patógeno humano (SILVA et al., 2012a) , *C. parapsilosis* também um patógeno humano (SILVA et al., 2012a), *C. etchellsii* que possui atividade fermentativa (SUEZAWA et al., 2006) e *C. aaseri* que possui atividade antifúngica (DE LIMA et al., 2013). Com exceção das espécies patogênicas as características desses organismos podem estar influenciando nas propriedades organolépticas do produto.

O único fungo representante do gênero *Kluyveromyces* encontrado nesse estudo foi o *K. marxianus*, ele foi identificado a mais de 100 anos e apresenta a capacidade de fermentar a lactose (FONSECA et al., 2008), processo importante na fabricação de queijos.

Dekkera bruxellensis é uma levedura pertencente ao gênero *Dekkera* que possui interação com a *Saccharomyces cerevisiae* e em estudo recente de Kosel et al (2017) relataram uma interferência no aroma do vinho pela síntese de tiamina e transporte de aminoácido e poliamina.

A levedura *Yarrowia lipolytica*, foi identificada nas amostras produzidas pelos dois tipos de leite, entretanto a amostra C3 possuiu um valor quase 50% maior de OTUs do fungo. Anteriormente classificada como *Candida* é comumente isolada em queijos ou contaminante de alimentos refrigerados (BELO, 2013), ela possui enzimas com a capacidade de modificar características como aroma e sabor (LIMA et al., 2009) deixando-o mais acentuado e mais picante respectivamente (SOUZA, 2016).

O *Aspergillus versicolor* representante de um dos gêneros mais abundantes encontrados nessa pesquisa, foi descrito anteriormente como produtor de substâncias hepatotóxicas e carcinogênicas ao ser humano, ele já foi encontrado em ambientes úmidos como tapetes e paredes (ENGELHART et al., 2002), porém não é possível confirmar a atividade citotóxica desses fungo no queijo de coalho, apesar de ser um ambiente favorável ao seu crescimento, é um lugar no qual possui uma grande competitividade por outros microrganismo, o que pode comprometer a atividade metabólica de alguns.

As tabelas 10 e 11 exemplificam a quantidade de sequências identificadas em nível taxonômico de filo para cada amostra de queijo. Os dados observados nas tabelas corroboram com os dados observados nos gráficos 3 e 4, que demostram em dados percentuais as sequências geradas por filo identificado por amostra.

Tabela 10. Quantidade de sequências distribuídas por amostra quanto aos filos identificados por análise do gene rDNA 16S

Taxonomia (Filo)	Amostra							
	P1	P2	P3	P4	C1	C2	C3	C4
Proteobacteria	14171	18902	10632	23113	2463	6222	7297	17836
Firmicutes	14344	9653	23471	9248	34555	13745	16946	5585
Actinobacteria	705	255	132	270	944	835	2539	5926
Acidobacteria	166	1	9	138	163	241	57	120
Chloroflexi	87	3	0	36	59	107	29	48
Gemmatimonadetes	60	0	4	40	62	59	15	81
Bacteroidetes	267	43	32	136	87	91	310	638
Crenarchaeota	1	0	0	1	0	1	2	0
Cianobactéria	22	2	7	12	12	18	9	11
Verrucomicrobia	3	0	1	3	15	8	2	2
Tenericutes	7	32	0	0	2	13	8	0
Euryarchaeota	21	126	0	0	0	28	0	43
Nitrospirae	11	0	0	4	14	17	6	8
Fusobactéria	1	0	2	0	3	0	0	13
TM7	15	0	0	2	1	2	8	82
[Thermi]	0	0	1	0	1	1	0	0
Elusimicrobia	0	0	0	2	1	3	1	4
Chlorobi	0	0	0	1	3	3	0	4
Armatimonadetes	0	0	0	0	1	4	0	1
FBP	0	0	0	0	0	1	0	0
WPS-2	1	0	0	0	2	1	0	1
TM6	0	0	0	0	0	1	0	0
WS2	0	0	0	1	1	0	0	0
GN02	3	0	0	0	0	0	0	0
Outros	19	144	95	307	171	2508	41	173

Tabela 11. Quantidade de sequências distribuídas por cada amostra quanto aos filos identificados por análise do gene rDNA 18S

Taxonomia (Filo)	Amostra		Detalhamento Táxon
	P2	C3	
Ascomycota	21075	28241	k__Fungi;p__Ascomycota;
Indefinido	26725	32829	k__Animalia;p__unidentified;
Basidiomycota	5613	1181	k__Fungi;p__Basidiomycota;
Estreptófito	3704	584	k__Chloroplastida;p__Streptophyta;
Indefinido	89	0	k__Fungi;p__unidentified;
Indefinido	38	46	k__Stramenopiles;p__unidentified;
Artrópoda	3	1	k__Animalia;p__Arthropoda;
Apicomplexa	0	2	k__Alveolata;p__Apicomplexa;
Outros	86	105	Outros

6 CONCLUSÕES

Avaliar amostras de queijo de coalho comercial por métodos independente de cultivo quanto ao microbioma comparando os resultados entre amostras produzidas a partir do leite cru e do leite pasteurizado, a fim de caracterizar microbiologicamente os produtos produzidos regionalmente é fundamental para a sua valorização tanto como produto comercial quanto como patrimônio cultural.

A caracterização microbiana por técnicas de sequenciamento de alto rendimento apresenta-se como uma tendência para estudos de diversidade microbiana em queijo. Pois, essas técnicas possuem cada vez menos custos e disponibilizam uma quantidade muito grande de dados que podem gerar diversas informações.

Nesse estudo foi possível a observação de bactéria dos mais diversos ambientes, algumas patogênicas e outras que fazem parte da microbiota de produtos lácteos apontando que mesmo com a ação benéfica de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Kluyveromyces* e *Yarrowia* muitos microrganismos podem se desenvolver e ocasionar doenças nos consumidores do alimento como é o caso das espécies *Rothia dentocariosa*, *Elizabethkingia meningoseptica* e *Bacillus cereus*. Entretanto a atividade metabólica dos microrganismos pode ser alterada pela presença de organismos competidores ou por meio da interação não competitiva entre eles.

Diversos estudos apontaram a presença de bactérias patogênicas no queijo de coalho como a *Salmonella* e a *Listeria monocytogenes*, porém que não foram identificadas por esse estudo.

Com relação aos eucariotos, os organismos mais abundantes encontrados foram os fungos, que já são descritos como participantes da microbiota do queijo coalho, auxiliando na caracterização de suas propriedades organolépticas como a *Yarrowia lipolytica* e *Dekkera bruxellensis*. Para os patogênicos as espécies observadas foram a *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Pichia membranifaciens*, *Tritirachium oryzae* e *Malassezia furfur*.

As amostras produzidas com o leite pasteurizado assim com as produzias com leite cru exibiram a presença de microrganismos patogênicos, demonstrando a ineficiência das Boas Práticas de Fabricação tanto pela queijaria que possui seu produto certificado pela vigilância sanitária como a queijeira que produz seu produto sem fiscalização.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. **Caracterização de leveduras isoladas de queijos de coalho**. 2011. 65p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- ALMEIDA, R. N. A. **Desenvolvimento, validação e aplicação de método molecular baseado na análise de rRNA para a identificação das bactérias formadoras de filme metabolicamente ativas na superfície de membranas de osmose reversa**. 2009. 32p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2009.
- ANDERSSON, A. et al. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, 1995.
- ANDREOTTI, R. Occurrence of the *Megaselia scalaris* (Loew, 1866)(Diptera, Phoridae) as a parasitoid of *Boophilus microplus* in Campo Grande, MS, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 46-47, 2003.
- APPRILL, A. et al. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. 2015.
- ARAÚJO, N. D. et al. A era da Bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Estudos de Biologia**, v. 30, n. 70-72, p. 143-148, jan/dez, 2008.
- BARRETO, M. R. et al. Yeasts associated with *Spermologus rufus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 2, p. 295-297, 1998.
- BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: um fábrica celular no contexto de biorrefinaria. **Boletim de Biotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 21-22, 2013.
- BELTRÃO, F. A. S.; SANTOS, M. R. M. C. Prospecção tecnológica de queijo coalho com bases nos estudos das patentes depositadas. **Revista GEINTEC – Gestão, Inovação e Tecnologias**, São Cristóvão, v. 5, n. 4, p. 2579-2588, 2015.
- BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement 2, p. S49-S56, 2006.
- BORGES, M. F. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan/jun, 2003.
- BOUAMRA-MECHEMACHE, Z; CHAABAN, J. Determinants of adoption of protected designation of origin label: evidence from the french brie cheese industry. **Journal of Agricultural Economics**, v. 61, n. 2, p. 225–239, jun, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30 de 26 de junho de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga de terra

ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 13-15, 16 jul. 2001a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 30 de dezembro, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, seção 1, 10 de janeiro de 2001b.

BRASIL. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamento técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRAZILIAN MICROBIOME PROJECT. Disponível em: < <http://www.brmicrobiome.org/>>. Acesso em: 14 jan. 2017.

BRUNO, L. M. Manual de curadores de germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Documentos 336, 2011.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Documentos 124, 2009.

BRÜGGEMANN, H. et al. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 671-673, 2004.

BURKE, C. M.; DARLING, A. E. A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq. **PeerJ**, v. 4, p. e2492, 2016.

BUZI, K. A. et al, Análise microbiológica e caracterização eletroforética de queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 7-11, jan/mar, 2009.

CALENGE, C. The package “adehabitat” for the R software: a tool for the analysis of space and habitat use by animals. **Ecological modelling**, v. 197, n. 3, p. 516-519, 2006.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Recursos microbiológicos para Biotecnologia**. 2001. Disponível em:<[http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias% 20 Vanderlei% 20Fina .pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20Vanderlei%20Fina.pdf)>. Acesso em: 18 Mar. 2017.

CAPORASO, J. G. et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

CARIDI, A. et al. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d’Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 201-209, 2003.

- CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.
- CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016.
- CHAKRAVORTY, S. et al. A Detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007.
- COPPOLA, S et al. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 414-420, 2001.
- DANTAS, D. S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, PB**. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2012.
- DA SILVA, E. F. et al. Método prático para o cultivo de espécies silvestres do gênero *Oryza*. **Sci. agric.**, v. 56, n. 4, 1999.
- DA SILVA, M. R. S. S. **Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas**. 2012. 154p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- DELCELSERIE, V. et al. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6046-6056, 2014.
- DE LIMA, J. R. et al. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 590-599, 2013.
- DE MELLO PADILHA, I. Q. et al. A bioinformática como instrumento de inserção digital e de difusão da Biotecnologia. **Revista Eletrônica Extensão Cidadã**, v. 5, n. 1, 2008.
- DE OLIVEIRA, K. A. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.
- DE OLIVEIRA LIMA, E. et al. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 443-450, 2002.
- DE OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002.
- DE SOUSA, A. Z. B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.
- DE SOUZA, A. L. F.; BRUSAMARELLO, L. C. C. Sequenciamento de DNA: Decifrando o manual de instruções dos seres vivos. **Genética na Escola**, v. 3, n. 3, p. 45-52, 2009;

DUGAT-BONY, E. et al. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 265-273, 2016.

EARTH MICROBIOME PROJECT. Disponível em: < <http://www.earthmicrobiome.org/>>. Acesso em: 14 jan. 2017.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature methods**, v. 10, n. 10, p. 996-998, 2013.

EMBRAPA. Gado de Leite. Disponível em: < https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos?p_p_id=buscaprodutoservico_WAR_pcebusca6_1portlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_buscaprodutoservico_WAR_pcebusca6_1portlet_javax.portlet.action=buscarProdutosServicos&_buscaprodutoservico_WAR_pcebusca6_1portlet_delta=10>. Acesso em: 27 mar. 2017.

ENGELHART, S. et al. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3886-3890, 2002.

ESCOBAR-ZEPEDA, A. et al. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015.

ESCOBAR-ZEPEDA, A. et al. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food Microbiology**, v. 57, p. 116-127, 2016.

ESPÍNDOLA, F. S. et al. Recursos de Bioinformática aplicados às ciências ômicas como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Interatômica e Metabolômica. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia: uma visão geral. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. EMBRAPA Cerrados: Planaltina, 2011. p. 730.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v.23(supl), p.162-165, 2003.

FREITAS FILHO, J. R. et al. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v.6, n.8, 2009.

FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-354, 2008.

FONTANA, C. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. **International Journal of Food Microbiology** v. 138, n. 3, p. 205–211, Abril, 2010.

- GIELLO, M. et al. Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of tradicional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. **Food Microbiology**, v. 63, p. 170-177, 2017.
- GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, supl. 2, p. 245-250, 2005.
- GUPTA, A. K. et al. Skin diseases associated with *Malassezia* species. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 5, p. 785-798, 2004.
- HAAKENSEN, M. et al. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 236-241, 2008.
- HADZIAVDIC, K. et al. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87624, 2014.
- HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, v. 9, n. 10, p. 245-249, Oct, 1998.
- HERLEMANN, D. P. R. et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The ISME Journal**, v. 5, n. 10, p. 1571, 2011.
- HUSON, D. H.; WEBER, N. Microbial community analysis using MEGAN. **Methods in Enzymology**, v. 531, p. 465-485, 2013.
- ICHISE, N. et al. A mechanism of resistance to hydrogen peroxide in *Vibrio Rumeiensis* S-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 73-79, 1999.
- IRLINGER, F. et al. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 1, p. 1-11, 2015.
- JANY, J. L.; BARBIER, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiology**, v. 25, p. 839-848, 2008.
- JEAN, S. S. et al. *Elizabethkingia meningoseptica*: an important emerging pathogen causing healthcare-associated infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 4, p. 244-249, 2014.
- JENSEN, S. L. et al. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 915-921, 2009.
- JULLIAND, V. et al. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3738-3741, 1999.
- KAGIA, K.; LIU, W. T. The Family Dermatophilaceae. In: **The Prokaryotes**. Springer Berlin - Heidelberg, p. 317-325, 2014.
- KERGOURLAY, G. et al. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. **International journal of food microbiology**, v. 213, p. 31-39, 2015.

- KOSEL, J. et al. The influence of *Dekkera bruxellensis* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the aromatic profile of synthetic wine must. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 4, p. fox018, 2017.
- LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.
- LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.
- LUND, B. M. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. **The Lancet**, v. 336, n. 8721, p. 982-986, 1990.
- MAGOČ, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 2957-2963, 2011.
- MANIVASAGAN, P. et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 262-278, 2014.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.
- MENEZES, S. S. M. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, n. 47E, 2011.
- MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)** v. 28, n. 1, 2011a.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.
- MONTAÑA, S. et al. The genetic analysis of an *Acinetobacter johnsonii* clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161528, 2016.
- MORENO, L. I. et al. The application of amplicon length heterogeneity PCR (LH-PCR) for monitoring the dynamics of soil microbial communities associated with cadaver decomposition. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 3, p. 388-393, 2011.
- MORROW, J. F.; BERG, P. Cleavage of Simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 11, p. 3365-3369, 1972.
- MULLIS, K. B. et al. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-61, 1990.
- MUNSON, M. A. et al. Molecular Analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 42, n. 7, p. 3023-3029, 2004.
- MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

- NASERI, A. First case of *Tritirachium oryzae* as agent of onychomycosis and its susceptibility to antifungal drugs. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 119, 2013.
- NASSU, R. T. et al. Queijo de coalho. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Brasília. 40p, p. 13, 2006.
- NERO, L. A. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan-mar, 2005.
- NOGUEIRA, I. de S. et al. Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**, v. 35, n. 2, p. 219-233, 2008.
- ORTOLANI, M. B. T. et al. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- PANGALLO, D. et al. Microbial Diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 38-43, 2014.
- PAULSON, J. N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. **Nature Methods**, v. 10, n. 12, p. 1200-1202, 2013.
- PEIXOTO, A. M. S. et al. A pontencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.2, n.2, p.52-64, 2007.
- PEIXOTO, R. S. et al. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. **Microbiologia Ambiental**. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna. 647p, p. 83-106, 2008.
- PEREIRA, G. L. et al. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 190-199, 2013.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, p.293-300, 2004.
- PESSOA FILHO, M. A. C. P. Metagenômica: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. EMBRAPA Cerrados: Planaltina, 2011. p. 730.
- POTVIN, M.; LOVEJOY, C. PCR-based diversity estimates of artificial and environmental 18S rRNA gene libraries. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 174-181, 2009.
- PRICE, M. N. et al. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 7, p. 1641-1650, 2009.
- PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 12-25, 2002.

- QUAIL, M. A. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 341, 2012.
- QUIGLEY L. et al. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5717-5723, 2012.
- RAMOS, S. N. M.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 4, p. 613-618, 2003;
- RODRIGUES, T. B. **Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos**. 2011. 269 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- RONAGHI, M. et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363, 1998.
- ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 259-261, 2008.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, Mar., 2006.
- SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977
- SANKH, S. et al. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. **Fuel**, v. 106, p. 690-696, 2013.
- SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Veterinária Zootec.**, v.6, n.6, p.1517-1522, 2008.
- SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2527-2534, 2004.
- SATO, G. S. Perfil da indústria de alimentos no Brasil: 1990 – 95. **RAE - Revista de Administração de Empresas São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 56-67, 1997.
- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.
- SCHORNSTEINER, E. et al. Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 180, p. 88-97, 2014.
- SEBRAE, Técnicas e boas práticas na produção de queijo. **Agronegócio – Revista Técnica**, p. 1-6, 2014.
- SHIN, Na-R. et al. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

- SILVA, F. R. et al. Conservação e controle de qualidade em queijos: revisão. **Pubvet**, v. 11, n. 4, p. 333-341, Abril, 2017.
- SILVA, F. W. et al. Sequenciamento de DNA: métodos e aplicações. In: XIII Safety, Health Environment World Congress. 2013, Porto, Portugal. **Science and Education Research Council, COPEC**. Porto: SHEWC, 2013.
- SILVA, R. A. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootec [online]**, vol.64, n.6, p.1732-1738, 2012.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SOUZA, C. M. P. **Isolamento e seleção de bactérias lipolíticas**. 2016. 68p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2016.
- SUEZAWA, Y. et al. Identification and typing of miso and soy sauce fermentation yeasts, *Candida etchellsii* and *C. versatilis*, based on sequence analyses of the D1D2 domain of the 26S ribosomal RNA gene, and the region of internal transcribed spacer 1, 5.8 S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 348-354, 2006.
- THOMPSON, J. R. et al. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4103-4110, 2004.
- VAHDAT, M. V. et al. Isolation and evaluation of lactic acid producing bacteria isolated from the rumen of Mehraban sheep. **Journal of Ruminant Research**, v. 1. n. 4 p. 97-108, 2014.
- VAL-MORAES, S. P. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA**. 2008. 171p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.
- VENTURINI, K. S. et al. Características do leite. Disponível em: <http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf>. Acesso em: 01 set. 2017.
- VIDAL, R. H. L. **Diagnóstico regional do processo de queijo coalho comercializado em Natal/RN**. 2011. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.
- WOESE, C. R. et al. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 4, p. 621, 1983.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 1713-1731, 2006.