

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Microbioma do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação.

Felipe Machado de Sant'Anna

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária – UFMG
2019

Felipe Machado de Sant'Anna

Microbioma do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária – UFMG
2019

S232m Sant'Anna, Felipe Machado de, 1985
Microbioma do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação / Felipe Machado de Sant'Anna - 2019
127 p.: il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Tese de Doutorado apresentada na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Queijo Minas – microbiologia - Teses. 2 – Queijo- análise. 3 – Microbioma – Teses. I - Souza, Marcelo Resende de – II. Universidade Federal de Minas Gerais – III. Veterinária.

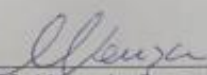
CDD – 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

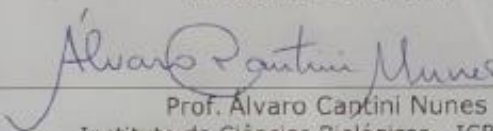
FELIPE MACHADO DE SANT'ANNA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.


Aprovada em 22 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



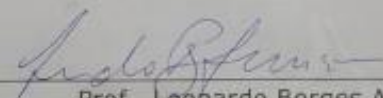
Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente - Orientador



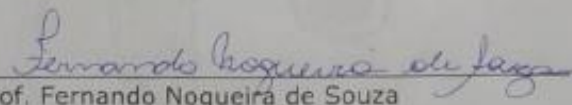
Prof. Alvaro Capitini Nunes
Instituto de Ciências Biológicas - ICB-UFMG



Prof. Jacques Robert Nicoli
Instituto de Ciências Biológicas - ICB-UFMG



Prof. Leonardo Borges Acurcio
Centro Universitário de Formiga - UNIFOR -MG



Prof. Fernando Nogueira de Souza
Universidade de São Paulo - USP

*“Se cheguei até aqui, foi porque me
apoei no ombro dos gigantes. ”*

Sir Isaac Newton

Escola de Veterinária da UFMG
2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os brasileiros que direta ou indiretamente me proporcionaram a oportunidade de realizar esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Cidinha e ao meu pai João (*in memoriam*) por permitirem que eu tenha chegado até aqui, com muito amor e compreensão. Obrigado por tudo, amo vocês!

Agradeço à minha amiga, confidente, companheira e parceira Luciana, que a cada dia me faz ser uma pessoa melhor. Amo você!

Agradeço aos meus amigos-irmãos da Turma do Beco: Rafa, Carlinhos, Conrado, Thiago, Gustavo, Danilo, Dudu, Bruno, Tinarelli. Com vocês é sempre mais divertido. Obrigado pela amizade.

Agradeço aos meus familiares, principalmente às minhas irmãs Carmem e Maria Emília. Agradeço também aos meus pequenos e amados Ivan, Dudu e Miguel.

Agradeço à minha madrinha Rosângela e ao meu tio Carlos Alberto pela ajuda crucial no início de tudo e que sem ela eu dificilmente teria chegado até aqui.

Agradeço ao professor Marcelo, um exemplo de pessoa pela qual tenho imenso carinho. Você é uma pessoa muito especial e tenho grande orgulho de tê-lo tido como orientador e como amigo durante todos esses anos. Muito obrigado por sempre acreditar no potencial de cada um de nós. Essa jornada sem o seu suporte e orientação teria sido muito mais difícil.

Agradeço ao Dr. Martin Wagner, Dra. Stefanie Wetzels, Dra. Evelyne Mann e ao Dr. Stephan Schmitz-Esser, por terem aceitado essa parceria e acreditado no potencial do nosso trabalho.

Agradeço aos amigos da Áustria: Nico, Beni, Viki e Isabel pelo carinho, amizade e respeito que tiveram comigo durante esse período no exterior.

Agradeço à CAPES e ao CNPq que financiaram meu sonho de cursar o Mestrado e o Doutorado e também por realizar um intercâmbio no exterior, proporcionando uma das melhores experiências que pude vivenciar na minha vida pessoal e acadêmica.

Agradeço ao Sávio, Ranier e Gilson que, sem a ajuda de vocês esse projeto nunca sairia do papel. Esse trabalho também é de vocês.

Agradeço ao Leo pela grande amizade, parceria e companheirismo. Estamos juntos!

Agradeço aos grandes amigos que fui colecionando ao longo dessa jornada: Lets, Gabi, Renatinha, Nai, Givanildo, Renata, Thithi, Heitor, Xandão, Luige, Pedro Henrique, Cosme, Ramon, dentre outros não menos importantes.

Agradeço à turma do ICB: Rafa, Silvinha, Clarice, Diego, todo o pessoal do LEFM e do LGMPP.

Agradeço à EMATER, principalmente Sandra, Viviene, Eni e Renata pelo empenho na execução e nos cumprimentos dos difíceis prazos de envio dos queijos.

Agradeço ao IMA, à SEAPA e principalmente ao Vítor, excelente motorista e ótimo parceiro de viagens.

Agradeço à professora Mônica pelo apoio, incentivo, ensinamentos e conversas enriquecedoras durante toda essa jornada, desde quando eu era apenas um pequeno *Padawan* no Departamento. Você é um exemplo de integridade e inúmeras virtudes.

Agradeço ao professor Henrique por sempre estar disposto em nos transmitir seu vasto conhecimento, com muito profissionalismo e competência.

Agradeço às professoras Andréia e Cláudia pelo incentivo, companheirismo, ajuda e também por sempre manifestarem interesse no nosso trabalho.

Agradeço ao professor Álvaro pela contribuição essencial para o andamento do trabalho.

Agradeço à professora Beth pela contribuição na elaboração do protocolo de extração de DNA.

Agradeço aos técnicos do DTIPOA Marco Antônio, Maurinha, Miltinho e ao César pelo carinho.

Agradeço à Escola de Veterinária, que contribuiu significativamente para que eu pudesse aprimorar minha ética profissional, lugar do qual tenho muito orgulho de ter sido aluno.

Agradeço à Liliane, Cristiano, Luiza, Suzana e todos os outros colegas do SENAI.

Agradeço ao Paul, Ringo, John e George (o melhor Beatle) pelas canções que embalaram a produção desse trabalho.

Agradeço aos meus companheirinhos de quatro patas Luna e Link pelos momentos de descontração e alegria.

Agradeço a banca avaliadora pelas valiosas sugestões e questionamentos.

Agradeço aos produtores por terem embarcado nessa jornada conosco.

Agradeço ao Duque Guilherme IV da Baviera, por ter criado a primeira lei relacionada aos alimentos no mundo e que, coincidentemente (ou não), é a chamada Lei de Pureza Alemã da cerveja.

Por fim, ao Clube Atlético Mineiro.

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	16
2 – OBJETIVO.....	18
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 - Histórico do queijo Minas artesanal	19
3.2 - O queijo Minas artesanal (QMA).....	21
3.3 – Legislação do QMA	25
3.4 – A região da Serra do Salitre.....	28
3.5 – Métodos de identificação de microrganismos e/ou comunidades microbianas em queijos.....	29
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1 – Caracterização das propriedades rurais	67
4.2 – <i>Design</i> experimental	68
4.3 – Coleta das amostras	69
4.4 – Análises físico-químicas e aquisição de metadados	70
4.5 – Pré-tratamento das amostras para extração.....	70
4.6 – Extração do DNA	71
4.7 – Preparo da biblioteca e sequenciamento de alto rendimento do gene rRNA 16S	71
4.8 – Processamento das <i>reads</i>	73
4.9 – Visualização dos dados	73
4.10 – Teste de variabilidade significativa entre os grupos.....	74
4.11 – OTUs diferencialmente abundantes	74
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.1 – Visões gerais das comunidades bacterianas no leite, pingo, casca e interior dos queijos.....	75
5.2 – Comunidades bacterianas no leite	83
5.3 – Comunidades bacterianas no pingo.....	84
5.4 – Comunidades bacterianas no interior dos queijos.....	85
5.5 – Comunidades bacterianas na casca dos queijos	86
5.6 – Fatores abióticos desempenham papel relevante na dinâmica populacional bacteriana.....	89
5.7 – OTUs diferencialmente abundantes	95

6 – CONCLUSÕES.....	100
7 - REFERÊNCIAS.....	101
8. ANEXOS	124
8.1 – Formulário de envio para requerimento de exportação de animais vivos, material de multiplicação animal, micro-organismos, produtos de origem animal ou material biológico de origem animal não destinados à alimentação humana ou animal.....	124

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1. Código IUPAC para representar o DNA	42
Quadro 2. Principais diferenças e semelhanças entre os três <i>pipelines</i> QIIME, mothur M RAST para análise metagenômica do generRNA 16S.....	60
Tabela 1. Programas de conversão de formatos SFF e suas linguagens	46
Tabela 2. Características das propriedades rurais quanto ao sistema produtivo e localização geográfica.....	68
Tabela 3. Número de sequências em relação à fazenda, origem, tempo de mat.....	75
Tabela 4. Análise estatística de riqueza de OTUs em relação ao período de maturação, fazenda e origem.....	78
Tabela 5. Valores de umidade (%) e acidez titulável (°D) para as amostras de leite, pingo e queijos (interior e casca).....	89
Tabela 6. Análise DESeq2 mostra OTUs diferencialmente abundantes por comparação em relação a origem.....	96
Tabela 7. Análise DESeq2 mostra OTUs diferencialmente abundantes por comparação em relação ao teor de acidez titulável.....	98
Tabela 8. Análise DESeq2 mostra OTUs diferencialmente abundantes por comparação em relação ao teor de umidade.....	99

Lista de figuras

Fluxograma 1 produção do QMA.....	22
Figura 1. Mapa das mesorregiões produtoras de QMA.....	24
Figura 2. Exemplos de curvas coletoras e índice de Simpson.....	50
Figura 3. Localização geográfica das fazendas inseridas na região da Serra do Salitre.....	68
Figura 4. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) ao longo do período de maturação.	79
Figura 5. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação às fazendas.	82
Figura 6. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação às fazendas	91
Figura 7. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação ao teor de acidez	94
Figura 8. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação à temperatura média da região	95

Lista de abreviações

Siglas e abreviaturas	
μL	microlitro
a.C	Antes de Cristo
ANOSIM	<i>Analysis of similarity</i>
AOAC	Métodos Oficiais de Análise
BAL	Bactérias ácido-láticas
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>base pair</i>
CA	<i>Correspondent Analysis</i>
cm	centímetros
CMD	Contagem por microscopia direta
CPP	Contagem padrão em placas
Dd-RDA	<i>Distance based redundancy analysis</i>
DGGE	eletroforese em gel de gradiente desnaturante

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMATER	Empresa Assistência Técnica e Extensão Rural
EPS	Exopolissacarídeo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FASTA	formato universal de representação de sequências biológicas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramma
G	Força gravitacional
HCl	Ácido clorídrico
HTS	<i>highthroughput sequencing</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Km	Quilômetro
L	Litro
MALDI-ToF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
min	minutos
mL	Mililitro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NMDS	<i>Nonmultimetric Dimensional Scale</i>
nmol	nano mol
NMP	Número mais provável
NTC	<i>No template control</i>
°C	Graus Celsius
OTU	<i>operational taxonomic unit</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCoA	<i>Principal coordinate analysis</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PERMANOVA	<i>Permutational analysis of variance</i>
QIIME	Quantitative Insights into Microbial Ecology
QMA	queijo Minas artesanal
RAPD	Amplificação randômica de DNA polimórfico
RDA	<i>Redundancy analysis</i>
RDP	Ribossomal Database Project
RFLP	Fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SFF	<i>Standard flow format</i>
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
UFC	Unidade formadora de colônia

v	Volume
WGS	<i>whole genome shotgun</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Δ	Delta

Lista de anexos

Anexo 1 - Formulário de envio para requerimento de exportação de animais vivos, material de multiplicação animal, micro-organismos, produtos de origem animal ou material biológico de origem animal não destinados à alimentação humana ou animal

Resumo

O queijo Minas artesanal é um produto tradicional em relação ao seu modo de produção, realizado no estado de Minas Gerais. Este queijo é elaborado a partir de leite de vaca cru com o acréscimo de uma cultura inicial endógena denominada “pingo”, responsável pela inoculação de microorganismos específicos que potencializam o sabor e os aspectos sensoriais. São sete regiões capazes de produzir e comercializar este produto - Araxá, Campo das Vertentes, Canastra Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. O objetivo deste estudo foi avaliar a comunidade bacteriana de leite cru, pingo e descobrir possíveis mudanças na comunidade bacteriana da casca e no interior da massa dos queijos aos sessenta dias de maturação, localizados na região da Serra do Salitre por meio de sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Illumina MiSeq, com alvo específico para o gene 16S rRNA. O leite cru e o pingo são responsáveis pela inoculação de bactérias específicas no queijo, sendo as espécies de *Planococcaceae* e *Streptococcaceae* prevalentes durante todo o período de maturação. A família *Planococcaceae* parece estabelecer interações com a família *Leuconostocaceae* na superfície desses queijos e está associada a aspectos ambientais da região, provavelmente levando a uma assinatura microbiana desses produtos. Além disso, fatores abióticos, como localização geográfica, umidade e acidez são os principais direcionadores das mudanças na dinâmica populacional desses queijos.

Abstract

The Minas artisanal cheese is a traditional product in its way of producing. Produced in the Minas Gerais state, Brazil, this cheese is made using raw cow's milk with the addition of an endogenous starter culture called “pingo”, responsible for inoculating specific microorganisms that could enhance flavor and sensorial aspects. There are seven regions able to produce and commercialize this product - *Araxá, Campo das Vertentes, Canastra Cerrado, Serra do Salitre, Serro and Triângulo Mineiro*. This study

aimed to assess the bacterial community of raw milk, endogenous starter culture and to uncover possible shifts in the bacterial community of the rind and core of cheeses at sixty days of ripening located in the *Serra do Salitre* region by Illumina MiSeq 16S rRNA gene amplicon sequencing. Raw milk and starter culture are responsible for inoculating specific bacteria into the cheese, with *Planococcaceae* and *Streptococcaceae* being prevalent throughout ripening time. The *Planococcaceae* family seems to develop strong interactions with the *Leuconostocaceae* family on the surface of these cheeses, and is associated with environmental aspects of the region, probably leading to a microbial signature of these products. Additionally, abiotic factors such as geographical location, moisture and acidity are major drivers in the microbial shift.

1 – INTRODUÇÃO

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos no Brasil, sendo conhecido pelos seus variados tipos de queijo, especialmente o queijo Minas artesanal, produzido a partir de leite cru. A tradição local na produção do queijo consiste na transmissão tanto da habilidade na produção do queijo quanto da sabedoria das gerações passadas para as novas gerações. Atualmente, existem sete regiões reconhecidas como produtoras de queijo Minas artesanal: Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro.

O leite cru, associado a um fermento endógeno natural conhecido como pingo e a um período de maturação garantem aspectos sensoriais únicos no queijo. O “modo de fazer” do queijo Minas artesanal é hoje um patrimônio imaterial do país e recentemente o queijo Minas artesanal tem vencido diversos campeonatos em nível nacional e internacional, com sua última premiação ocorrendo na França com a medalha “*Super Gold*”, no *Mondial du Fromage*, em 2017. Pelas técnicas atuais de sequenciamento de alto rendimento, algumas comunidades bacterianas estão sendo caracterizadas em diversos alimentos, especialmente queijos, carnes e produtos fermentados de uma forma geral, revelando comunidades microbianas que variam desde uma organização mais simples até estruturas microbianas complexas, altamente específicas para cada produto.

Diversos fatores como o uso da matéria-prima, as práticas de fabricação e as características ambientais de uma região determinam a diversidade e a dinâmica de comunidades microbianas, bem como propriedades sensoriais e a qualidade do produto final. A dinâmica populacional que ocorre nos queijos é reflexo de inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos. Sendo assim, caracterizar e compreender os aspectos envolvendo a sucessão microbiana pode trazer respostas valiosas para o melhor entendimento desse complexo ecossistema. Dessa forma, o sequenciamento de alto rendimento por *amplicon* aplicado ao estudo de comunidades microbianas em alimentos, especialmente queijos, juntamente da aplicação de robustas ferramentas de

bioinformática, tem se manifestado como um promissor campo de pesquisa, uma vez que se pode entender a dinâmica populacional em diversos níveis de interação, como modulação da microbiota em diversos níveis taxonômicos, alterações funcionais que essa microbiota possivelmente manifesta e também de expressão de genes de interesse, como produção de compostos voláteis, produção de compostos associados ao *flavor*, peptídeos bioativos dentre outros de interesse para a produção do queijo.

Em virtude de a produção regional apresentar *terroirs* únicos, entender e definir a microbiota em queijos Minas artesanal pode contribuir para o estabelecimento de indicações geográficas como as “Denominações de Origem Protegidas” europeias (P.D.O.). Até o momento, estudos que abordam o estudo de microrganismos associados ao queijo Minas artesanal foram capazes de identificar somente populações específicas como as bactérias ácido-láticas, microrganismos deteriorantes e microrganismos patogênicos utilizando abordagens dependentes de cultivo. De acordo com a literatura recente, sabe-se que essa técnica é capaz de abordar somente uma pequena fração de uma complexa comunidade microbiana. Assim, as abordagens independentes de cultivo como o sequenciamento de alto rendimento (HTS) com alvo específico no gene rRNA 16S se mostram mais capazes de definir uma comunidade microbiana e seus desdobramentos ao longo de um período específico de maturação. A produção do queijo Minas artesanal veio sofrendo com legislações muito duras e/ou pouco específicas para a sua produção, principalmente no que diz respeito ao período de maturação ideal. Atualmente, grupos de pesquisa estão empenhados em estudar qual seria o período ideal de maturação dos queijos em todo o território, uma vez que esse produto não pode ser maturado por períodos superiores a 60 dias em virtude da descaracterização do produto original.

2 – OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi: i) caracterizar a comunidade bacteriana de leite cru e pingo e ii) descobrir possíveis mudanças microbianas na comunidade bacteriana da casca e do interior da massa de queijos Minas artesanal da região da *Serra do Salitre*, ao longo de sessenta dias de maturação, via sequenciamento de alto rendimento pela plataforma Illumina MiSeq®.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Histórico do queijo Minas artesanal

A história do queijo remonta a tempos antiquíssimos, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como o marco inicial da sua fabricação. Há relatos do consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C.. Murais em tumbas egípcias mostram cenas de fabricação de queijo no Antigo Egito e a Bíblia cita este produto em mais de uma passagem no Velho Testamento. Nos escritos de Aristóteles há referência a queijos feitos de leite de égua e jumenta. (PERRY, 2004).

Segundo Chalita e colaboradores (2009), na Europa, os gregos teriam sido os primeiros a produzi-los a partir do leite de cabras e ovelhas e a incorporá-los em seus cardápios. Existem referências ao queijo nos tempos bíblicos e Homero (1184 a.C.) faz referência a queijos elaborados em cavernas a partir do leite de cabras e ovelhas. Mais tarde, Heródoto (484-408 a.C.) se refere a queijos elaborados com leite de égua e Aristóteles (384-322 a.C.) menciona o queijo elaborado com leite de égua e burra. Os primeiros coagulantes do leite foram os coalhos de lebre e cabrito, mas também se utilizava o leite de égua e vinagre. Naquela época, a coagulação era realizada de diversas maneiras. Há também relatos de aplicação de defumação em queijos utilizando lenhas.

Já no Império Romano, foi desenvolvida a técnica da “maturação” dos queijos, que eram servidos tanto à nobreza quanto aos soldados romanos das Legiões, distantes da capital romana. Na idade média, os monges trapistas elevaram a produção do queijo para o estado da Arte, adicionando diversas características em suas produções que são utilizadas ainda hoje (PERRY, 2004).

No século XX ocorreu a produção em massa do queijo já na França, tendo uma produção aproximada de 400 tipos de queijos dentre os mais de 1.000 existentes no mundo. (PERRY, 2004).

Durante muitos anos, os queijeiros perceberam que o leite procedente de diversos locais se comportava de forma diferente. Uma publicação realizada em 1899 por F. J. Lloyd relatava sobre todos os aspectos da fabricação do queijo, incluindo detalhes geográficos, intensidade pluvial, cultivo, manejo dos animais de criação, defeitos na fabricação entre outros (CHALITA, 2009).

No Brasil, o primeiro evento de maior importância para a produção nacional de queijo se deu em 1880, quando o português Carlos Pereira de Sá trouxe ao Brasil dois mestres queijeiros da Europa, culminando com a produção do queijo tipo *edam*, na região da Zona da Mata. Entretanto, relatos consistem em afirmar que o queijo mais antigo já produzido no Brasil foi o queijo Minas (CHALITA, 2009; SEBRAE, 2004).

A história do queijo Minas artesanal tem origem polêmica, uma vez que uma representativa parte dos historiadores e estudiosos do tema declara que sua origem se dá na produção do queijo português Serra da Estrela, que aplica a flor de cardo ao leite de ovelha como método principal de coagulação (IPHAN, 2008). Outra vertente de pensamento indica que sua origem tem raízes no queijo de Açores que por sua vez era produzido utilizando coalho e leite bovino, assim como o tradicional QMA. A imigração açoriana com destino ao Brasil foi impulsionada pela ocasião da erupção do vulcão “Ilha de Pico”, tornando Minas Gerais e, principalmente, a região do Serro como opção de fuga (MERGAREJO NETTO, 2011). Analisando o contexto histórico de Minas Gerais à época (séc. XVIII), o crescimento exponencial da atividade mineradora impulsionou outras atividades como a produção de alimento e, dentre elas, o aprimoramento da atividade leiteira. Não obstante, Minas Gerais é considerada, salvo pequenas variações na produção, uma das maiores bacias leiteiras do Brasil (GOMES, 2006; SANT’ANNA *et al.*, 2017). A partir desse fenômeno, a elaboração de derivados lácteos acompanhou o crescimento da atividade leiteira, tornando assim a produção do queijo artesanal uma opção de alimento, muito em virtude pela característica de conservar o alimento. Doravante deu-se início às formações das propriedades rurais que culminaram com o atual cenário de produção do QMA (MELO e SILVA, 2014). A confecção desse queijo se estabeleceu com variações por todo território de Minas Gerais dos tempos antigos e, hoje, tem características específicas reconhecidas para regiões

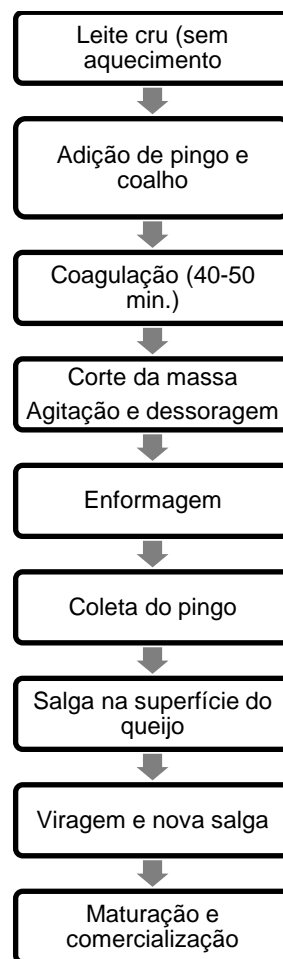
geográficas distintas do Estado de Minas Gerais com condições geográficas, econômicas e socioculturais particulares (MENESES, 2006).

3.2 - O queijo Minas artesanal (QMA)

O QMA é o tipo mais tradicional de queijo produzido no Brasil e de grande aceitação no mercado nacional. A tecnologia de produção artesanal desse queijo a partir do leite cru constitui uma tradição secular que deve ser preservada (SANTOS *et al.*, 1992). O aspecto desse queijo é cilíndrico, com aproximadamente 40 cm de diâmetro. Em algumas queijarias o queijo é produzido com diâmetro ligeiramente maior e um pouco menor em altura. A casca é normalmente esbranquiçada, tendendo a se transformar numa crosta fina e amarelada quando o queijo é maturado por alguns dias. Internamente, a massa é branca e consistente, às vezes ligeiramente quebradiça. O queijo apresenta sempre aberturas mecânicas de pequeno tamanho e, não raramente, diversas e pequenas olhaduras irregulares. O sabor desse queijo é bastante típico e acentuadamente mais ácido em comparação ao queijo Minas industrializado (Furtado, 1980). Segundo os critérios de caracterização, é considerado QMA o produto que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem (MINAS GERAIS, 2012).

Todos esses fatores influenciam a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial desses queijos, com destaque para a utilização do soro-fermento (pingo). O pingo é considerado como um verdadeiro fermento natural que o produtor mantém viável e atuante por longos períodos de armazenamento. Após a enformagem e salga do queijo, por aspersão de sal grosso em sua superfície, os queijos são deixados sobre uma “banca” (tipo de mesa de madeira grossa, estreita, com canaletas laterais, ligeiramente inclinada, amplamente empregada pelos produtores) onde ficam a dessorar. O soro que escorre de um dia para o outro é coletado e vem a constituir o pingo. Trata-se de um soro que fermentou de um dia para o outro, e que, associado a uma alta concentração de sal, apresenta potencial inibidor de fermentações indesejáveis por microrganismos

deteriorantes. No momento de ser adicionado ao leite, na fabricação do dia, o pingo constitui um autêntico fermento natural, contendo altas concentrações de microrganismos benéficos viáveis. Atualmente o coalho líquido ou em pó é amplamente utilizado na produção da massa, em detrimento da coagulação natural por enzimas digestivas bovinas, outrora utilizadas pelos produtores (FURTADO, 1980). O fluxograma abaixo ilustra o modo de produção do QMA.



Fluxograma 1. Produção do QMA. Adaptado de Machado, 2004.

De acordo com Meneses (2006), usa-se o tecido “volta ao mundo” para a prensagem/dessoragem da massa do QMA antes de enformá-la. Entretanto, na região do Serro, não se usa tecido para a prensagem, a qual é feita diretamente na forma, pelas mãos do manipulador. Em maio de 2008, o registro no Inventário Nacional de

Referências Culturais do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2008) reconheceu o “modo de fazer” do queijo artesanal como patrimônio imaterial, destacando a forma tradicional de se fazer queijo, à base de leite cru, pingo e coalho.

Em Minas Gerais, o QMA resiste às pressões da modernização dos processos de produção, não só pelo apego às tradições, mas também pelo isolamento das propriedades produtoras, espalhadas pelas colinas e pelos vales do Estado. Isso contribuiu para que se preservem produtos com características próprias e de imenso valor cultural e econômico (EMATER, 2004). Atualmente, existem sete regiões do Estado consideradas bem definidas em relação à localização das propriedades e das características inerentes às regiões, como altitude, latitude e características climáticas. Essas regiões possuem características únicas quanto à localização geográfica (como latitude e longitude, clima e amplitude térmica), composição da pastagem e dieta do gado, composição do rebanho e técnicas particulares de produção, de caráter tradicional e familiar. De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), as principais mesorregiões com seus respectivos municípios que produzem o legítimo QMA são descritas a seguir:

- Araxá (MINAS GERAIS, 2003a) – Araxá, Campos Altos, Conquista, Ibiá, Pratinha, Pedrinópolis, Perdizes, Sacramento, Santa Juliana, Tapira;
- Canastra (MINAS GERAIS, 2004) - Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita;
- Cerrado (MINAS GERAIS, 2007) – Abadia dos Dourados, Arapuá, Carmo do Paranaíba, Coromandel, Cruzeiro da Fortaleza, Guimarânia, Lagamar, Lagoa Formosa, Matutina, Patos de Minas, Patrocínio, Presidente Olegário, Rio Paranaíba, Santa Rosa da Serra, São Gonçalo do Abaeté, São Gotardo, Serra do Salitre, Tiros, Varjão de Minas;
- Serro (MINAS GERAIS, 2003b) – Alvoradas de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas, Coluna, Serro;

- Campo das Vertentes (MINAS GERAIS, 2009) - Barroso, Conceição da Barra de Minas, Coronel Xavier Chaves, Carrancas, Lagoa Dourada, Madre de Deus de Minas, Nazareno, Prados, Piedade do Rio Grande, Resende Costa, Ritópolis, Santa Cruz de Minas, São João Del Rei, São Tiago e Tiradentes.
- Triângulo Mineiro (MINAS GERAIS, 2014b) - Araguari, Cascalho Rico, Estrela do Sul, Indianópolis, Monte Alegre de Minas, Monte Carmelo, Nova Ponte, Romaria, Tupaciguara e Uberlândia
- Serra do Salitre (MINAS GERAIS, 2014a) – município de Serra do Salitre

A figura 1 mostra um mapa com a localização de cada mesorregião dentro do estado de Minas Gerais

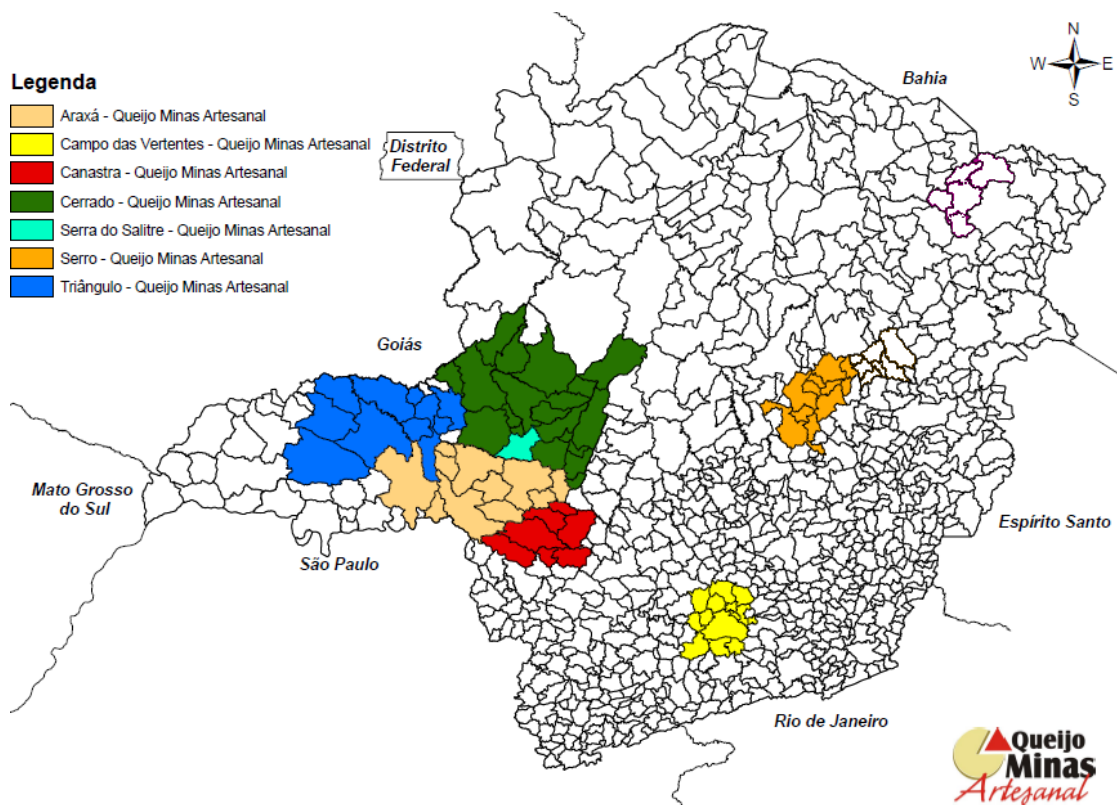


Figura 1. Mapa das mesorregiões produtoras de QMA. Adaptado de EMATER, 2014.

Ainda de acordo com documentos de cadastro no IMA, são listados um total de um total de 263 produtores cadastrados e os produtores inseridos no programa de agricultura familiar. Além disso, o estado de Minas Gerais conta com oito entrepostos -

locais específicos de armazenamento e maturação, de temperatura e ventilação controladas - de queijo oriundo de associações de produtores de QMA nas regiões da Serra da Canastra e Araxá (MINAS GERAIS, 2019a).

A característica climática, a localização geográfica, o modo artesanal de produção e sua associação com o uso de soro-fermento podem influenciar significativamente a população microbiana desses queijos, atuando como fatores predisponentes para as possíveis sucessões microbiológicas que ocorrem nesse produto, conferindo ao queijo uma microbiota diversificada. Dessa população microbiana no queijo, destaca-se a importância das bactérias ácidas lácticas que, dentre outras características inerentes ao grupo, podem manifestar potencial probiótico. Segundo a *Food And Agriculture Organization* (FAO) juntamente da *World Health Organization* (WHO), define-se como probiótico “microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO 2002)

3.3 – Legislação do QMA

Os aspectos legais envolvendo o QMA remetem à uma grande lista de decretos, projetos de lei, leis e portarias, muito em virtude dos aspectos polêmicos envolvendo o uso do leite cru para sua produção. Em 07 de março de 1996, foi estabelecida a Portaria nº 146 e a resolução nº 07 de 28 de novembro de 2000, elaboradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Nesses documentos, estabeleceu-se que o período mínimo de maturação do queijo seria de 60 dias a partir da sua data de fabricação (BRASIL, 1996; BRASIL, 2000). Apesar de pertinentes, os requisitos pleiteados por essas legislações acabariam por desqualificar e descaracterizar o QMA no que diz respeito ao seu processo produtivo, uma vez que o queijo quando submetido a períodos longos de maturação acabaria por se tornar duro, seco, não sendo compatível com o padrão tradicional regularmente obtido pelos produtores. Para tanto, houve a elaboração da Lei Estadual nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que possibilitou a comercialização de queijos com períodos de maturação inferiores aos preconizados pelo MAPA. Além disso, essa lei também visou implementar parâmetros microbiológicos do

queijo e dos processos produtivos, como a qualidade da água e das instalações (MINAS GERAIS, 2002). Entretanto, essa Lei apresentava uma dissonância em relação à Portaria nº 146 do MAPA no que diz respeito aos parâmetros microbiológicos e também em relação ao percentual de umidade do queijo. Assim, foi publicado o Decreto Estadual nº 44.864 de 1º de agosto de 2008, alterando, então, a lei nº 14.185.

Em 2011, foi elaborada a Lei Estadual nº 19.492 que estabeleceu a produção do QMA em todo o território mineiro sem, contudo, permitir o uso dos nomes das regiões previamente caracterizadas e/ou que possuem indicação geográfica. Esse fato permitiu que regiões tradicionais não descritas anteriormente pudessem se destacar na produção do QMA, embora também permitisse que regiões sem nenhum vínculo histórico com o queijo também fossem consideradas regiões produtoras de QMA.

De forma revisional, a Instrução Normativa nº 57 do MAPA (BRASIL, 2011) previu que os queijos pudessem ser maturados em período inferior a 60 dias, desde que as propriedades atendessem diversos requisitos de instalação e vigilância higiênico-sanitária do rebanho, como o atestado de propriedade livre de tuberculose e controle de brucelose no rebanho, trazendo pouco impacto no que diz respeito ao cenário de produção do queijo na ocasião de seu decreto. Para tanto, uma força-tarefa envolvendo IMA e MAPA publicaram, respectivamente, a Portaria nº 1.305, de 30 de abril de 2013 e a Instrução Normativa nº 30 de 07 de agosto de 2013, cujo conteúdo estabelece o período mínimo de maturação de 17 dias para a região do Serro e 22 dias para as demais regiões, além de permitir a comercialização dos mesmos em todo território nacional desde que sejam inseridos no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA) (BRASIL, 2013; MINAS GERAIS, 2013).

No ano de 2012 foi estabelecida a lei nº 20.549 que dispunha da comercialização e da caracterização de queijos Minas artesanal no estado de Minas Gerais. Dentre os tipos de queijos citados na supracitada lei, houve a inclusão do chamado “meia-cura”, trazendo confusão e problemas no que diz respeito à caracterização desse tipo de queijo, uma vez que não há consenso no que diz respeito ao período específico associado ao processo de “meia-cura”. Além disso, essa lei estabelecia outros pormenores como a adição

facultativa de fermento lácteo, contradizendo a característica do QMA da obrigatoriedade do uso do pingo (MINAS GERAIS, 2012).

Recentemente, em dezembro de 2018, foi promulgada a lei nº 23.157 que substituiu a Lei de nº 20.549. Nesse documento, admite-se a produção de variedades derivadas de determinado tipo de queijo artesanal desde que respeitadas às características de qualidade estabelecidas no regulamento do produto. Ainda, a lei estabelece e diferencia o processo de maturação do processo de afinação, no qual a primeira é caracterizada pela etapa do processo de produção do queijo, na qual ocorrem alterações físicas, químicas e sensoriais, relacionadas ao processo de amadurecimento, e necessárias para a definição da identidade do produto; ao passo que a afinação trata-se da etapa do processo de fabricação do queijo, na qual ocorrem alterações que transformam as características do produto por meio da utilização de técnicas específicas. Ou seja, a lei visa hoje incluir os chamados afinadores dentro do processo legal, uma vez que os queijos Minas artesanal, em virtude do aumento do seu consumo e reconhecimento nacional e internacional, tem sofrido os chamados processos de “*gourmetização*”, visando diferenciação no preço e no mercado consumidor por trazer novos aspectos sensoriais ao produto final. Os afinadores participam ativamente desse processo, realizando a afinação em cavernas e/ou salas especiais com condições de temperatura e umidade controladas. Isso faz com que o QMA desenvolva características únicas, como o crescimento exuberante de fungos na casca. É necessário, contudo, estabelecer em regulamentos técnicos específicos à característica de cada tipo de queijo, visando diferenciá-lo do QMA original, uma vez que as características do QMA são únicas e imutáveis quando contrastadas com essas novas variedades de queijos. A própria legislação traz consigo a possibilidade de confecção de regulamentos específicos, possibilitando incluir e diferenciar os queijos Minas artesanal dos queijos com características distintas (maturados em vinho/cerveja, uso de especiarias, presença de fungos e bolores na casca, queijos produzidos a partir de leite de outros ruminantes, etc.) (MINAS GERAIS, 2018).

3.4 – A região da Serra do Salitre

A região da Serra do Salitre apresenta peculiaridade por ser constituída por apenas um município homônimo. Segundo registros do IMA, em 2018 constava o total de 17 produtores certificados para produção do QMA nessa região (IMA, 2018). A Serra do Salitre é um município com população estimada de 11.493 habitantes e área de 1.295,272 Km², em 2018 (IBGE, 2018). Estima-se ainda um efetivo bovino de 55.636 bovinos, com produção leiteira anual de 64.800.000 litros, em 2017 (IBGE, 2017). A atividade leiteira é a maior responsável pela geração de renda no município, movimentando um total de R\$73.314.000,00 no ano de 2017. Ainda de acordo com o registro de produtores cadastrados no programa do QMA, a Serra do Salitre possui número inferior de produtores quando comparado as regiões do Serro, que conta com 261 produtores e Araxá, com 123 produtores. As demais regiões (Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro) apresentam número inferior ao registrado pela Serra do Salitre.

É importante ressaltar que a região da Serra do Salitre é constituída por apenas um município, diferente das demais regiões, tornando superior a razão do nº de produtores em relação à extensão territorial. Essa característica reforça a ideia de que o QMA representa mais do que uma renda complementar para muitas famílias, mas sim uma das principais atividades remuneradas praticada pelos produtores de leite, apesar do baixo número de produtores certificados.

Antes de seu reconhecimento como mesorregião, o município pertencia à então chamada mesorregião do Alto Paranaíba, atualmente conhecida como mesorregião do Cerrado.

3.5 – Métodos de identificação de microrganismos e/ou comunidades microbianas em queijos

A identificação de microrganismos pode ser dividida atualmente em dois grandes grupos: identificações dependentes de cultivo, a qual é necessária o isolamento prévio de um determinado microrganismo em um meio de cultura (seletivo ou inespecífico) e análises independentes de cultivo, a qual não se torna necessário o cultivo prévio de um determinado microrganismo, podendo assim obter um maior número de microrganismos identificados, uma vez que não há necessidade de isolamento e crescimento de colônias. As análises independentes de cultivo apresentam uma determinada vantagem sob a metodologia clássica no que diz respeito à identificação de microrganismos que teriam seu crescimento limitado em virtude tanto da ausência de meios de cultura específicos ou da dificuldade de crescimento desses microrganismos em determinadas situações, tanto de fatores extrínsecos como de fatores intrínsecos. A seguir serão apresentados os principais métodos utilizados para identificação de microrganismos abordando ambos os métodos, com uma ênfase em sequenciamento de nova geração independente de cultivo

3.6.1 – Análises dependentes de cultivo

a) Métodos de cultura e isolamento

A análise de alimentos para a presença, os tipos e números de microrganismos e/ou seus produtos é muito importante na microbiologia de alimentos, entretanto, nenhum desses métodos permitem a determinação exata do número de microrganismos em um alimento. Mesmo que alguns métodos de análise sejam melhores que outros, cada método tem limitações associadas ao seu uso. Os quatro principais métodos para determinação total de microrganismos são:

- Contagem-padrão em placas (CPP) para microrganismos viáveis (FDA, 1995; MARSHALL, 1993; AOAC, 1995; VANDERZANT, 1992):
 - porções de amostras de alimentos são misturadas ou homogeneizadas, diluídas serialmente em um diluente específico, plaqueadas sobre ou dentro de um meio de cultura (ágar ou caldo) adequados e incubados sob

temperatura e tempo adequados, sendo então contadas as colônias viáveis por contagem manual ou assistida por equipamentos.

- É o método mais utilizado para determinar o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônia (UFC) em um alimento.
 - Apresenta limitações referentes aos fatores intrínsecos (como a_w , pH, etc.) e extrínsecos (temperatura, umidade, etc.) além de sofrer alterações oriundas da própria natureza do alimento, diluição inadequada e competição por ação antagonista de outros microrganismos.
 - A CPP é frequentemente associada à técnica *pour-plate*, embora o plaqueamento *spread-plate* também seja viável, sendo que o segundo oferece vantagens na determinação de microrganismos aeróbios estritos. Uma grande desvantagem desse método é que não há seleção de colônias diferenciadas, dificultando a contagem.
 - A partir das diluições seriadas também é possível utilizar a técnica de *spread-plate* para identificação de colônias específicas em meios de cultura seletivos e a partir daí utilizar identificações fenotípicas baseadas em métodos bioquímicos para a identificação de microrganismos em nível de espécie. É uma técnica atualmente pouco utilizada em virtude dos resultados não serem compatíveis com métodos mais precisos como a identificação em nível molecular.
- Número mais provável (NMP) (FDA, 1995; MARSHALL, 1993; AOAC, 1995; VANDERZANT, 1992):
 - Nesse método as diluições são preparadas como para contagens-padrão em placas. Três alíquotas seriais ou diluições são então semeadas em números específicos de tubos (três ou cinco). O número de microrganismos nas amostras originais é determinado pelo uso de uma tabela-padrão do NMP, geralmente apresentando resultados maiores que a CPP.
 - É a técnica mais utilizada para determinação de coliformes totais e/ou termotolerantes em uma amostra de alimento.
 - Existem problemas inerentes à natureza desse método, como falhas no limite máximo e mínimo de detecção

- Contagem por microscopia direta (CMD) (FDA, 1995; MARSHALL, 1993; AOAC, 1995; VANDERZANT, 1992):
 - Consiste basicamente em um esfregaço de uma amostra de alimento associado ao uso de corantes específicos (como a coloração Gram).
 - O esfregaço é realizado, geralmente, em lâminas para microscopia e visualizadas com o auxílio do microscópio (objetiva de óleo de imersão).
 - Muito utilizada em laticínios para estimar a qualidade microbiológica de leite cru e outros derivados lácteos
 - Suas vantagens: é rápido, simples e permite analisar a morfologia celular bacteriana; pode ser melhorado pela adição de sondas fluorescentes
 - Desvantagens: depende de um microscópio para análise, as células viáveis e não-viáveis são contadas sem distinção entre elas; difícil distinguir partículas de alimento das células bacterianas; distribuição irregular das células bacterianas no esfregaço
- Redução de corantes (FDA, 1995; MARSHALL, 1993; AOAC, 1995; VANDERZANT, 1992)
 - Duas técnicas são muito utilizadas: azul-de-metileno e resazurina.
 - Sobrenadantes de alimentos são adicionados a uma solução padrão dos corantes
 - A redução do azul-de-metileno (de azul para branco) e da resazurina (de azul para rosa) é inversamente proporcional ao número de microrganismos na amostra
 - Vantagens: simplicidade, baixo custo, detecção de células viáveis
 - Desvantagens: nem todos os microrganismos reduzem corantes igualmente, não são aplicados para alimentos que apresentem enzimas redutoras

b) Amplificação de DNA

É uma técnica aplicada à identificação de microrganismos, não sendo capaz de detectar contagens e/ou nível de abundâncias de determinadas espécies microbianas. Utiliza enzimas como a DNA polimerase termoestável e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de 5' e 3' específicos, capazes de amplificar uma única molécula de DNA até

10^7 moléculas depois de uma série de ciclos de amplificação, normalmente de 20 a 50 ciclos. É considerada uma técnica dependente de cultivo pois, a partir do plaqueamento e isolamento pois o DNA é extraído diretamente de uma colônia ou de um caldo previamente inoculado com microrganismos de interesse para a pesquisa propriamente dita. Portanto, é incapaz de detectar mais de uma espécie simultaneamente, salvo sob a exceção de reações *multiplex* de PCR - embora limitadas a microrganismos filogeneticamente próximos entre si. Existem inúmeros tipos de reações específicas de PCR amplamente utilizadas na identificação de microrganismos. Na presente revisão, serão abordados os mais comumente utilizados em microrganismos associados a matrizes alimentares.

- Análises por enzima de restrição:
 - O DNA cromossomal é digerido pelo uso de uma endonuclease de restrição apropriada. As endonucleases quebram as duplas fitas de DNA em sequências nucleotídicas específicas. Algumas endonucleases de restrição mais utilizadas são *EcoRI*, *HhaI* e outras específicas para grupos bacterianos como as BAL. É bastante utilizado para subtipagem de amostras (WESLEY, 1990).
- Amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD):
 - Emprega o uso de PCR para obter perfis eletroforéticos de DNA polimórficos. A partir da cultura bacteriana, utiliza-se lisados para obtenção do DNA. *Primers* específicos são adicionados ao DNA para amplificação via reação de PCR. Os produtos são visualizados em gel de agarose e submetidos à uma corrida eletroforética para a formação de bandas, que são posteriormente fotografadas e comparadas à bandas padronizadas. É utilizada para identificação de linhagens específicas de patógenos como *Listeria monocytogenes* (BLACK, 1995).
- Eletroforese em gel de campo pulsado:
 - Esse método vincula a digestão de DNA genômico por enzimas de restrição com a separação de fragmentos por eletroforese de campo pulsado. Diferente de uma técnica eletroforética convencional, o campo pulsado gera pulsos elétricos em várias direções, formando perfis

eletroforéticos, designados pulsovars. É uma técnica utilizada para discriminar linhagens de vários patógenos envolvidos em surtos alimentares (Jay, 2012).

- Fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos (RFLP)
 - Consiste em diferenças herdadas nos tamanhos dos fragmentos de DNA quando ele é digerido com uma endonuclease de restrição. O DNA digerido é então separado por eletroforese e hibridizado por *Southern Blot* com uma sonda de DNA de um determinado gene de interesse do microrganismo em questão (HARVEY, 1994).
- Sequenciamento do gene rRNA 16S:
 - Trata-se de uma técnica amplamente difundida e utilizada para identificação molecular de diversos microrganismos. Uma reação de PCR permite a amplificação do gene 16S rRNA (ou de suas regiões hipervariáveis), empregando *primers* que são direcionados à regiões universalmente conservadas em ambas as regiões terminais do gene. O *amplicon* (de aproximadamente 1.5 kb) resultante dessa reação pode ser submetido à análises de sequenciamento por várias metodologias diferentes. Então, a análise sequencial pode ser comparada à diversas bases de dados que podem ser acessadas via web, a exemplo: ARB *package* (<http://www.arb-home.de/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) (O'SULLIVAN, 2000). A eficácia dessa reação é afetada diretamente pela escolha dos *primers* relacionados às regiões hipervariáveis do gene 16S. Grupos filogeneticamente próximos, como as BAL podem apresentar baixa eficácia na identificação correta das espécies, pelo fato da cobertura de amplificação não cobrir todas as regiões variáveis, impossibilitando a separação em nível de espécie ou gênero.

a) Proteômica

A proteômica pode ser dividida em três etapas: *bottom-up*; *bottom-down* e *shotgun*, que visam o isolamento ou o pré-fracionamento do proteom da amostra, análise qualitativa

e/ou quantitativa de peptídeos e macroestruturas proteicas via bases de dados dedicadas. A técnica mais utilizada para a identificação de microrganismos pela abordagem proteômica é por através da técnica de *time off light* (TOF), como MALDI-TOF. A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* e consiste num sistema no qual material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa em que há a matriz polimérica. Nessa matriz é irradiado um laser que vaporiza a amostra, ionizando suas moléculas e posteriormente fazendo-as transitar num tubo de vácuo e detectadas por um sensor. Cada molécula vai apresentar um tempo de vôo específico (*time of flight* - TOF), permitindo assim sua separação e posterior identificação em picos e gráficos, que são depois comparados com um banco de dados para a caracterização final de cada bactéria ou fungo (PASTERNAK, 2012).

3.6.2 – Análises independentes de cultivo

Atualmente, existe uma gama de novas abordagens independentes de cultivo, entretanto, as mais comumente utilizadas em alimentos são as técnicas de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e a abordagem via sequenciamento de nova geração (baseado em *amplicon*). Para efeitos didáticos, o sequenciamento baseado em *amplicon* será tratada em um tópico à parte.

a) PCR-DGGE

Assim como na análise metagenômica, a técnica de PCR-DGGE também utiliza a amplificação do rRNA 16S do DNA de uma comunidade inteira, utilizando sequências iniciadoras (*primers*) específicas para o rDNA. A amplificação por PCR resulta em produtos do mesmo comprimento, porém de sequências distintas do gene rRNA 16S, permitindo a identificação dos microrganismos. Eles são então separados por DGGE, no qual o gel de poliacrilamida contém um gradiente linear de ureia e formamida, ambos agentes de desnaturação do DNA. A amplificação prévia do gene rRNA16S permite a inclusão de um “grampo G+C”, de aproximadamente 39 nucleotídeos, que impedem a desnaturação completa do DNA no gel. As bandas no perfil representação as populações microbianas dominantes, e as mudanças no

perfil de bandas entre amostras refletirão as alterações na diversidade microbiana. Uma grande desvantagem desse método, em relação à metagenômica, é que nele não é possível estimar a diversidade total da microbiota do alimento, devido a falhas na lise celular e baixa prevalência, além do fato de que, assim como no sequenciamento do gene rRNA 16S já previamente descrito, microrganismos pertencentes a um mesmo grupo podem não apresentar diferença significativa na corrida da banda, por serem filogeneticamente próximos.

Assim, a melhor alternativa para poder caracterizar diversidade, riqueza e outras variáveis presentes em amostras de alimentos, especialmente queijos, é a abordagem metagenômica, caracterizada pelo sequenciamento de nova geração.

3.6.3 – Sequenciamento de nova geração (NGS)

NGS é um método independente de cultivo para estudar amostras de microrganismos extraídos diretamente de um ambiente específico (água, solo, leite, fezes, dentre outros). Essa abordagem permite estabelecer algumas vantagens: a análise de uma grande maioria dos microrganismos em natureza que ainda não foram cultivados e/ou não permite cultivo *in vitro* e a facilidade de se estudar os microrganismos atuando no contexto de suas comunidades. Uma vez que o DNA se origina de múltiplas populações, a recuperação de genomas provenientes de análises metagenômicas é uma tarefa complexa (SHARON E BANFIELD, 2013). Atualmente, de acordo com a capacidade de sequenciamento e processamento da maioria dos *softwares* e *hardwares*, o sequenciamento contendo comunidades de eucariotos, em particular microrganismos protistas, torna os custos de execução extremamente elevados tornando-se proibitivos. Isso ocorre em virtude da extensão de seus genomas e de baixa densidade de endereçamento dos genes. Entretanto, a seleção de comunidades nas quais os eucariotos ou seus DNA's podem ser excluídos torna o processamento mais adequado.

Existem dois tipos de estudo de NGS:

1. Estudo de diversidade utilizando o gene rRNA 16S (sequenciamento baseado em amplicon): nesse tipo de estudo amplifica-se por PCR a sequência 16s e se compara o resultado contra um banco de dados de bactérias conhecidas. Essa amplificação por alvo

possui uma ampla variedade de aplicações, incluindo a caracterização de populações bacterianas pertencentes ao trato gastrointestinal de mamíferos e outros animais, microbiota da pele, ar e outros sistemas biológicos como ambientes de água contaminada, biorremediação e outras aplicações (WILDE, WATTS e LU, 2014). Estratégias de NGS podem diferir dependendo da plataforma de sequenciamento a ser utilizada, uma vez que cada plataforma apresenta vantagens e desvantagens inerentes à sua construção. Essas plataformas propõem diferentes protocolos de preparação de bibliotecas e sequenciamento (como o número e comprimento das leituras ou *reads*).

2. *Shotgun Metagenomics/Whole Genome Shotgun (WGS)*: nesse segundo caso não se faz seleção de alvo. Todo o DNA extraído da amostra é fragmentado e sequenciado. A análise consiste em montar o “metagenoma” da amostra para tentar identificar, além da diversidade de genomas, novos genes. Essa é a abordagem frequentemente associada ao termo “metagenômica”, pois permite sequenciar genes de interesse, genes funcionais, genomas completos e sequências de interesse taxonômico (FERROCINO e COCOLIN, 2017). O WGS é capaz de gerar um grande volume de informações não enviesadas de todos os genes de todos os membros da comunidade bacteriana por empregarem um método diferente de sequenciamento de DNA e RNA, aliado à disponibilidade de ferramentas rápidas e confiáveis Para se obter a melhor de bioinformática (SCHATZ *et al.*, 2010 e POWER *et al.*, 2013). montagem de um genoma, especialmente de origem metagenômica, o melhor *pipeline* é o “sequenciamento *mate-pair*”, que fornece uma preparação de protocolo particular para bibliotecas (RAMOS *et al.*, 2013).

Isolar o DNA de uma amostra ambiental é a primeira e a mais importante etapa para a análise NGS, sendo que a qualidade da análise NGS é diretamente relacionada com a qualidade do DNA isolado (SCHOLZ, LO E CHAIN, 2012). Teoricamente, o DNA microbiano isolado de uma amostra ambiental representa todo o DNA da comunidade de microrganismos nativa. Entretanto, amostras de DNA oriundas de ambientes extremamente insalubres ou com excesso de contaminantes, como solos ácidos, minerais, sedimentos, produtos lácteos fermentados como o kefir, (cujo exopolissacarídeo – EPS - atua como forte inibidor da lise da parede bacteriana de determinados microrganismos) e queijos (principalmente pela ação de macromoléculas

como caseína e lipídios que podem adsorver detergentes e agentes quelantes) tornam o processo de extração menos flexível, devendo-se utilizar *kits* ou adaptações de protocolos existentes (WILSON, 1997 E BONAÏTI, 2007).

O objetivo de qualquer projeto de NGS é a caracterização completa de uma comunidade (essencialmente respondendo às questões “quem são eles” e “o que estão fazendo”), trazendo consigo os esforços para a compreensão de: (1) composição e estrutura de uma comunidade, incluindo a taxonomia e abundância relativa das espécies; (2) contribuição genética de cada membro da comunidade, incluindo seu número e capacidade funcional; e (3) heterogeneidade dos genes intra-específicos ou intra-populacionais (SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012).

Durante várias décadas foram concentrados esforços no isolamento de microrganismos patogênicos, ou relacionados à determinada patogenia, bem como aqueles com capacidade de sintetizar antimicrobianos, em laboratório. Isso permitiu um enorme avanço para a microbiologia médica. Por isso, alguns grupos como actinomicetos, enterobactérias e bacilos Gram positivo apresentam um grande número de espécies identificadas com representantes que manifestam crescimento *in vitro* (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2004). Entretanto, os processos tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos não se aplicam para a análise de comunidades microbianas. Nos primeiros estudos envolvendo metagenômica, o sequenciamento completo do gene rRNA 16S era realizado pelo método Sanger, tornando os trabalhos laboriosos, dispendiosos e alcançando resultados que nem sempre eram suficientes para desvendar a total diversidade bacteriana em um ambiente complexo. O NGS fornece leituras curtas com enormes ciclos de sequenciamento, com custos mais acessíveis, facilitando o acesso à informação por poder dispensar a necessidade de se cultivarem esses microrganismos, uma vez que são gerados grandes volumes de informação nessas novas plataformas de sequenciamento associadas às poderosas ferramentas computacionais.

Todos os experimentos envolvendo NGS abordam um protocolo similar, composto da coleta de amostra e extração do ácido nucléico, seguido de diversos passos comuns a grande maioria das plataformas de NGS: (1) preparação e montagem da biblioteca; (2)

protocolos de sequenciamento complementados por montagem e alinhamento de genomas/metagenomas.

3.6.3.1 - Sequenciamento do gene rRNA 16S para identificação de microrganismos

O sequenciamento do gene rRNA 16S é amplamente aceito como uma forma de avaliar aspectos evolucionários de eubacterias (WOESE, 1987). Desde a introdução de técnicas moleculares baseadas em rDNA, o estudo da diversidade microbiana em ambientes naturais tem avançado significativamente (AMANN, LUDWIG e SCHLEIFER, 1995 e MUYZER, 1999). Adicionalmente, o sequenciamento do gene rRNA 16S tem sido amplamente aplicado no campo da ecologia microbiana, obtendo grandes números de sequências depositadas em base de dados de relevância, categorizando o 16S como “padrão-ouro” no estudo ecológico de microrganismos (RONAGHI, UHLÉN e NYRÉN, 1998; RONAGHI, 2001; THOMPSON *et al.*, 2001 e SOGIN *et al.*, 2001). Ao passo que fragmentos do gene rRNA 16S – contendo uma ou mais regiões variáveis – é o alvo mais comumente utilizado para bactéria e archaea, as regiões de espaçamento interno transcrito (ITS) e o gene rRNA 18S são os alvos escolhidos para o estudo de fungos e eucariotos, respectivamente (OULAS *et al.*, 2015).

A metagenômica propriamente dita refere-se aos estudos independentes de cultivo de comunidades microbianas ao explorar consórcios e associações microbianas que ocorrem em um determinado nicho específico de plantas ou hospedeiros animais como superfícies mucosas e pele humana (DEL CHERICO *et al.*, 2014). Estudos iniciais em filogenia e taxonomia bacteriana baseavam-se no sequenciamento tipo *Sanger* do gene rRNA 16S, gene esse comumente utilizado como marcador *housekeeping* (JANDA e ABBOTT, 2007). A escolha desse locus baseia-se em diferentes razões: (1) sua presença em quase todas as bactérias como um gene com cópias múltiplas; (2) a presença de regiões conservadas de sequência de nucleotídeos, espaçadas por nove regiões variáveis (de 50 a 100 bases de distância) (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007) e (3) o próprio comprimento desse gene rRNA 16S (1,500 bp) (PATEL, 2001). Entretanto por meio da tecnologia NGS, a identificação em níveis de gênero e espécie pode ser

otimizada, com um razoável intervalo de confiança, em menos da metade da sequência desse gene (aproximadamente 500 bp), incluindo diversas regiões hipervariáveis (MARGULIES *et al.*, 2005).

A introdução do NGS e sua combinação com DNA *barcoding* de amostras *multiplex* aumentou consideravelmente a produção de análises de dados de comunidades bacterianas. Essas melhorias têm promovido estudos em larga escala envolvendo centenas de indivíduos diferentes e possíveis sucessões microbianas (HUMAN MICROBIOME CONSORTIUM, 2012). Em um típico experimento de sequenciamento, um curto fragmento cobrindo uma ou duas regiões variáveis de gene rRNA16S é amplificada com *primers* específicos para 16S e, então, associados com sequências de biblioteca adaptadoras, sendo posteriormente sequenciados. O comprimento desse segmento pode variar de 300 a 500 pares de bases, em virtude do uso da tecnologia *paired-end* da *Illumina* (AMIR *et al.*, 2013). Ao amplificar regiões selecionadas contidas no gene rRNA 16s, bactéria e Archea podem ser identificados pelo uso de *primers* universais que sondam regiões conservadas e flanqueiam sequências de regiões variáveis, auxiliando numa melhor identificação em nível de gênero e espécie.

As regiões hipervariáveis apresentam eficácia variável na identificação de espécies diferentes, sendo as regiões V2-V3 mais efetivas para identificação universal em nível de gênero (CHARKRAVORTY *et al.*, 2007). A identidade e a frequência de bactérias em uma amostra são determinadas ao assimilar as leituras amplificadas do gene rRNA 16S em base de dados conhecidas por sequências homólogas (WANG *et al.*, 2007), ou por leituras alocadas (KUCZYNSKI *et al.*, 2012). Gêneros e espécies são relativamente identificáveis em níveis de similaridade variando entre 96 e 97%, respectivamente, e amostras ou cepas podem ser diferenciáveis em níveis de similaridade próximos de 99% (PETERSON *et al.*, 2008).

A construção de bibliotecas genômicas de rRNA 16S representa uma poderosa ferramenta para a análise da diversidade molecular de comunidades de microrganismos representativos de uma amostra. O conjunto de sequências, bem como a análise de suas

frequências dentro de uma biblioteca pode representar de maneira geral, uma correlação com as unidades taxonômicas predominantes (JANSSEN, 2006; NOGALES *et al.*, 2001). SCHLOSS e HANDESLMAN (2004) avaliaram a diversidade taxonômica de procariotos através de 56.215 sequências curadas do gene rRNA 16S depositadas no banco de dados de genes ribossômicos RDP (*Ribosomal Database Project*). Foram identificados mais de 50 filós, sendo metade deles compostos inteiramente por membros não cultivados. Levantamentos da diversidade de ecossistemas terrestres e marinhos revelam sequências dominantes pertencentes a grupos taxonômicos como filo *Acidobacteria* e o clado SAR11 (JANSSEN, 2006; VENTER *et al.*, 2004), que apresentam poucas espécies cultivadas já isoladas em comparação com o número de espécies identificadas pelos métodos independentes de cultivo. Além disso, a abordagem metagenômica tem permitido a identificação de táxons em baixa frequência, em ambientes terrestres e aquáticos, que não apresentam relação filogenética com filós descritos (ELSHAHED *et al.*, 2008; SCHLOSS and HANDELSMAN, 2006; SOGIN *et al.*, 2006).

É importante ressaltar determinados aspectos da terminologia exigidos para uma melhor compreensão dos dados oriundos desse tipo de análise, sendo eles: (1) *amplicon* – um fragmento de DNA que é amplificado por PCR (podendo ser uma ou mais regiões, a exemplo das regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S, ou outros marcadores de genes). A grande maioria dos pesquisadores utilizam *primers* padrão para essa análise de PCR; (2) Distinção de espécies por OTU (*operational taxonomic unit*) – comumente identificados por rRNA e uma porcentagem de similaridade para a classificação dos microrganismos em OTUS iguais ou diferentes; (3) *barcode* – uma curta sequência de DNA que é adicionada a cada *read* durante a amplificação, sendo específica para cada amostra. Isso permite que amostras diferentes possam ser adicionadas juntas (*multiplexed*) para reduzir o custo de sequenciamento. Durante a análise, as sequências precisam ser *de-multiplexed*, ou seja, separadas por amostras. Usualmente, a análise requer uma base de dados (*database*) de referência, onde se procura inferir a mais próxima similaridade de uma OTU em uma linhagem taxonômica (OULAS *et al.*, 2015).

Inúmeras bases de dados *online* fornecem acesso a grandes volumes de informação em relação a sequências de RNA ribossomal. Dentre as base de dados existentes, as mais comumente utilizadas são o *Ribossomal Database Project II* (RDP II) (<http://redp.cme.msu.edu/>) (COLE *et al.*, 2007), *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov>) (DE SANTIS *et al.*, 2006) e ARB-Silva (PRUESSE *et al.*, 2007). RDP II baseia-se na taxonomia de Bergey, que contém um relativo pequeno grupo de Filos. *Greengenes* incluem vários esquemas de taxonomia usando diferentes sistemas de classificação. A base de dados ARB-Silva também oferece opções para classificação taxonômica microbiana, embora seja mais limitado em sua plasticidade que o *Greengenes* (DE SANTIS *et al.*, 2006). Bases de dados *online* para rRNA incluem uma multiplicidade de ferramentas e *softwares* para classificação de sequências e alinhamento de múltiplas sequências, a fim de facilitar a identificação de microrganismos em *outputs* oriundos de NGS, principalmente. Todas essas bases contêm ferramentas de emparelhamento, programas de alinhamento de sequências e editores de sequências. *Greengenes* fornece um programa de alinhamento de sequências e editores de sequências diferentes para identificação microbiana baseada em sequências. *Greengenes* utiliza a ferramenta de alinhamento chamada NAST e gera *outputs* que são compatíveis com as ferramentas do *software* ARB (DE SANTIS *et al.*, 2006). Além disso, diferentes ferramentas de classificação de sequências supervisionadas são disponíveis para testar a equivalência com as sequências enfileiradas. Comparado ao BLAST, classificadores supervisionados como o RDP *Seqmatch* demonstram uma melhor acurácia em encontrar sequências similares de rDNA (WANG *et al.*, 2007).

3.6.3.2 – Esquemas de análise para dados oriundos de NGS

a) Formato dos arquivos de sequências oriundos de plataformas NGS

O processo de representação das bases é considerado bastante simplificado e dinâmico. De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC, existe um código oficial para a representação do DNA, e que também inclui códigos para identificar bases ambíguas, ou seja, os casos em que não se sabe ao certo a base correta, mas se sabe que deve ser C ou T ou algo similar, como pode ser observado no quadro 3 (VARUZZA, 2013)

Quadro 3. Código IUPAC para representar o DNA

Representação	Significado
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (ou U)	Timina (ou Uracila)
R	A ou G
Y	C ou T
S	G ou C
W	A ou T
K	G ou T
M	A ou C
B	C ou G ou T
D	A ou G ou T
H	A ou C ou T
V	A ou C ou G
N	qualquer base
. ou -	<i>gap</i>

Associada à informação base, os sequenciadores também utilizam ferramentas que monitoram a qualidade dessas bases. Usualmente, essa probabilidade é representada pelo “Phred Quality Score”, assim chamado porque foi utilizado pela primeira vez no *software phred* (EWING *et al.*, 1998).

Usualmente, os valores da escala de *phred* variam entre 1 e 40. Tipicamente, os valores de phred score estão entre 1 e 40. A maneira mais simples de representar os valores de qualidade em formato texto é uma lista de inteiros, o que adiciona de dois a três bytes de dados para cada base sequenciada (um a dois caracteres para o valor da qualidade e um caracter como separador entre os valores) (VARUZZA, 2013).

b) Formatos FASTA e FASTQ

FASTA é o formato universal de representação de sequências biológicas. Aplica-se principalmente para programas de alinhamento de DNA e proteínas FASTA. Em virtude de sua simplicidade, diversos *softwares* e ferramentas, bem como algumas bases de dados utilizam esse formato como entrada inicial dos dados (LIPMAN e PEARSON, 1985 e VARUZZA, 2013).

O arquivo FASTA é composto de uma série de cabeçalhos seguidos pelo texto da sequência. Cada cabeçalho é definido por uma linha que se inicia com o caracter >. Os caracteres ; e # t são utilizados para descrever comentários acerca do arquivo inicial, de acordo com o exemplo abaixo:

>HSBGPG Human gene for bone gla protein (BGP) (fragment)

```
GGCAGATTCCCCCTAGACCCGCCCGCACCATGGTCAGGCATGCCCTCCTCA
TCGCTGGGCACAGCCCAGAGGGTATAAACAGTGCTGGAGGCTGGCGGGGCA
GGCCAGCTGAGTCCTGAGCAGCAGCCCAGCGCAGCCACCGAGACACCATGA
GAGCCCTCACACTCCTCGCCCTATTGGCCCTGGCCGCACTTTGCATCGCTGG
CCAGGCAGGTGAGTGCCCCCTGGAGCCCAGGAGGGAGGTGTGTGAGCTCA
ATCCGGACTGTGACGAGTTGGCTGACCACATCGCTTTCAGGAGGCCTATCG
GCGCTTCTACGGCCCGGTCTAGGGTGTGCTCTGCTGGCCTGGCCGGCAACC
CCAGTTCTGCTCCTCTCCAGGCACCCTTCTTTCTTCCCCTTGCCCTTGCC
CTGACCTCCAGCCCTATGGATGTGGGGTCCCCATCATCCCAGCTGCTCCCA
AATAAACTCCAGAAG
```

>HSGLTH1 Human theta 1-globin gene (fragment)

```
CCACTGCACTCACCGCACCCGGCCAATTTTTGTGTTTTTAGTAGAGACTAAA
TACCATATAGTGAACACCTAAGACGGGGGGCCTTGGATCCAGGGCGATTCA
GAGGGCCCCGGTCGGAGCTGTCGGAGATTGAGCGCGCGGGTCCCAGGATC
TCCGACGAGGCCCTGGACCCCCGGGCGGCGAAGCTGCGGCGCGGGCGCCCC
TGGAGGCCGCGGGACCCCTGCTTCTTGCCGTGCTCTCTCGAGGTCAGGACGC
GAGAGGAAGGCGC
```

Acima, existem duas sequências identificadas como HSBGPG e HSGLTH1, respectivamente. Após cada identificador existe um espaço e em seguida o comentário

sobre a sequência e logo abaixo o corpo do de cada sequência, cujo padrão é quebrado em linha entre 70 e 132 caracteres.

Com o avanço das plataformas NGS, os dados começaram a ser gerados com um enorme volume de informação, uma vez que a cobertura e número de leituras aumentaram consideravelmente. Assim, o formato FASTA, que fora amplamente utilizado, já não conseguia transmitir todo o volume de dados gerados ou gerando arquivos extremamente pesados em termos de memória e processamento, exigindo grande performance de servidores e poder de processamento. (VARUZZA, 2013)

Assim, foi criado o formato FASTQ, no qual as bases e os valores de qualidade são representados em um mesmo arquivo, sendo indicados por caracteres ASCII em detrimento a uma sequência de números. Esse formato é mais eficiente uma vez que a antiga representação de qualidade necessitava no mínimo três bytes (dois dígitos e um espaço), ao passo que nesse novo formato FASTQ a representação necessita de apenas 1 byte, como pode ser observado no exemplo abaixo:

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACT
CACAGTTT
+
!''*(((***+))%%%+)(%%%%).1***-+*'')**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

O cabeçalho, nesse formato, é definido por @ e seguido pelo identificador da sequência. Na linha abaixo, observa-se a sequência que difere do formato FASTA, justamente por não haver a necessidade de quebrar a sequência de caracteres em diversas linhas, sendo que o formato FASTQ utiliza apenas uma linha. A próxima linha apresenta o caracter +, que por ser seguido pelo identificador da sequência novamente, e na última linha tem-se os valores de qualidade representados em ASCII. Para a conversão do valor de qualidade *phred* para FASTQ, soma-se 33 a ele e procura-se o caracter ASCII correspondente. Este é o padrão definido pelo Sanger Institute e mais utilizado atualmente (VARUZZA, 2013).

c) Arquivo SFF

O SFF ou *Standard Flow Format* (NCBI, 2012) é um arquivo binário que foi desenvolvido em conjunto pela 454 *Life Science*, o *Whitehead Institute* e pelo *Sanger Institute*, para representar sequências geradas por um sequenciador baseado em fluxos como o 454 e o *Ion Torrent*. As bases e o tamanho normalizado do sinal detectado são representados em termos de fluxo, como, por exemplo, a sequência AATGG, que pode ser representada como o equivalente A3 T1 G2. Entretanto, a relação dos homopolímeros quase nunca obedece uma proporção perfeita, podendo ser gerados números decimais como A2.9 T1.1 G1.5. Entretanto, essa informação é perdida devido aos arredondamentos executados quando se converte de SFF para FASTA. Essa informação em termos de intensidade de sinal é também denominada *flow space* em oposição à sequência pura que está em *base space*. Esse arquivo SFF possui um cabeçalho com informações da corrida, semelhante a um cabeçalho por *read*, além de informar os valores de qualidade e os adaptadores utilizados na amplificação por meio de *clipping*. Com o arquivo SFF, torna-se possível extrair ambas informações de qualidade e adaptadores sem o *clipping*, podendo ser útil para diversas aplicações (VARUZZA, 2013).

Embora o formato SFF seja útil, muitos *softwares* e ferramentas não lidam diretamente com esse formato, sendo necessária a conversão desse arquivo para outros formatos como FASTA ou FASTQ. A tabela 1 abaixo discrimina alguns programas utilizados para conversões entre SFF e outros formatos:

Tabela 1. Programas de conversão de formatos SFF e suas linguagens

Nome	Linguagem	URL
sff_extract	<i>Python</i>	http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/
sff2fastq	C	https://github.com/indraniel/sff2fastq
Flower	Haskell	http://biohaskell.org/

Adaptado de Varuzza, 2013.

O conversor mais utilizado, sendo também o de mais fácil implementação é o *sff_extract*, uma vez que ele nada mais é que um *script* em linguagem *Python*. Entretanto, é também o mais lento. O *sff2fastq* é considerado mais rápido que o anterior; porém, de difícil implementação, uma vez que só é gerado um formato FASTQ dele. O *Flower* é mais rápido e mais flexível que os anteriores, porém necessita ter uma linguagem de programação *Haskell* instalada no sistema (VARUZZA, 2013).

Novos algoritmos capazes de processar de milhões a bilhões de sequências curtas estão constantemente sendo desenvolvidos e anunciados no meio científico. Esses *softwares* atuam em alinhamento de sequências, montagem bem como anotações das *reads* (FLICKEY e BIRNE, 2009), dentre outras aplicações. Qualquer pesquisa metagenômica por NGS atualmente requer significativos recursos computacionais e um núcleo de bioinformatas com habilidades para instalar, atualizar e executar as ferramentas mais modernas. Ademais, utilizar plataformas de NGS requer grande capacidade de armazenamento e processamento, na escala de centenas a milhares de *gigabytes* por amostra.

Além dos desafios inerentes ao grande volume de dados que incluem diferentes metadados, análises metagenômicas adicionalmente apresentam seus próprios desafios e

obstáculos, incluindo erros de sequência, formação de quimeras (reações inespecíficas gerando leituras errôneas) (SWAT *et al.*, 2002, WOOLEY e YE, 2010), e a biologia oculta desses microrganismos (múltiplas espécies ou singularidades, abundâncias relativas, funções complexas, etc.).

d) Medidas de diversidade

Dentre o número de espécies encontradas em uma amostra, pode-se estabelecer uma curva de rarefação que permite avaliar o tamanho e a riqueza dessas espécies presentes em determinada amostra. Amostras de tamanhos diferentes podem ser comparadas por meio do uso de índices de diversidade e o tamanho total pode ser estimado a partir das relações de contribuição das espécies, sem a necessidade de acessar todos os indivíduos de uma amostra (TRINGE, 2005).

e) Riqueza de espécies

A partir da adição aleatória das amostras pode-se calcular uma curva média relacionada à riqueza dessas espécies. Essas curvas são denominadas coletoras, uma vez que permitem avaliar o quão fidedigno é o estudo quando comparado ao ambiente natural de onde foi extraída essa amostra. A estabilização do índice de riqueza acontece quando a curva se estabiliza, indicando que a riqueza total foi obtida (TRINGE, 2005).

Obter o alcance de estabilidade dessa curva torna-se uma tarefa difícil, uma vez que muitas espécies raras costumam ser adicionadas após muitas amostragens, principalmente se o estudo que está sendo realizado não obtém um bom universo amostral. Dessa forma, medidas de riqueza de espécies que permitam estimar a riqueza a partir dos dados obtidos ou comparar dados de diferentes áreas e diferentes unidades amostrais, são bastante úteis para comparar comunidades microbianas. Ainda assim, a comparação de comunidades é baseada em diferentes tamanhos amostrais, que, por sua vez, dificultam conclusões. A técnica de rarefação consiste em calcular o número esperado de espécies em cada amostra para um tamanho de amostra padrão. A obtenção de uma curva desse tipo permite a comparação de amostras, mesmo com intensidades amostrais diferentes. Nesses casos, índices também são úteis para comparar comunidades de diferentes tamanhos amostrais. Índices de diversidade são expressos

por um único número, que pode representar a redução ou a abundância de um conjunto complexo de táxons. Os índices permitem dimensionar a riqueza, a igualdade e a diversidade nos diferentes ambientes estudados (KENNEDY e SMITH, 1995).

f) Estimadores de diversidade e riqueza

A análise de dados oriundos de rRNA 16S pode ser orientada em relação a algumas questões como (1) quão diversa é a comunidade? (2) como duas ou mais comunidades diferem? (3) quem são os membros dessa comunidade? (4) como os membros dessa comunidade se relacionam? A resposta a esses questionamentos podem ser de origem qualitativa ou quantitativa, uma vez que diversas ferramentas de bioinformática e de análises estatísticas estão disponíveis para auxiliar nesse entendimento. A resposta à primeira questão diz respeito à diversidade alfa, que é mede quanto membros são diferentes em uma dada comunidade (HIGHLANDER, 2012).

O índice de Shannon-Wiener (H) expressa a importância relativa de cada espécie e não apenas a proporção entre espécies e indivíduos. Esse tipo de abordagem torna-se extremamente importante em um estudo metagenômico, uma vez que pode apontar espécies importantes para determinado acontecimento no ambiente (SHANNON, 1984). Este é um índice que atribui maior peso a espécies raras, prevalecendo o componente de riqueza de espécies. O índice de Shannon assume que toda uma população microbiana está representada em sua totalidade, indefinidamente e ao acaso em uma amostra coletada, independente de seu tamanho. De acordo com Hutcheson (1970), os dados obtidos se enquadram em uma distribuição normal, desde que N seja um número inteiro, de modo que os métodos estatísticos quantitativos possam ser empregados para o teste de significância. Já o índice de Simpson (1949) foi o primeiro a ser usado em estudos ecológicos e mostra a concentração de dominância, uma vez que, quanto maior o valor, maior a dominância por uma ou poucas espécies. Este índice expressa a tanto a riqueza (número de espécies) quanto seu equilíbrio (abundância relativa de espécies) (MAGURRAN, 1988 e HIGHLANDER, 2012). Considerando-se as duas medidas heterogêneas, Shannon e Simpson, o último é que atribui um peso maior às espécies comuns. Outra medida muito comum para se avaliar a diversidade alfa é o estimador Chao1 (CHAO, 1984), que calcula a riqueza de espécies por extrapolação.

As diferenças (e similaridades) entre comunidades é denominada diversidade Beta. Pode ser calculada usando um de inúmeros índices de similaridade qualitativa ou quantitativa para criar matrizes de distância que podem posteriormente ser utilizadas para visualização da comunidade em *clusters*. O *Unique Fraction* ou UniFrac (LOZUPONE e KNIGHT, 2005) tem sido utilizado por muitos grupos de estudo em metagenômica para examinar a diversidade Beta em comunidades microbianas. É uma análise que utiliza a relação evolucionária de sequências e comunidade para calcular matrizes de distância. Alguns coeficientes de diversidade Beta que não dependem em filogenias pré-determinadas são os índices Bray-Curtis, Morisita-Horn e Sorensen (MAGURRAN, 1988). Um método comum usado para visualizar beta diversidade entre comunidades é a análise de coordenada principal (PcoA). De uma forma simplificada, PcoA processa a matriz de distância calculada em pequenos números de variáveis, denominadas componentes principais, e depois re-orienta essa matriz para que o primeiro componente corresponda a maior taxa da variabilidade no *dataset* e o segundo componente corresponda à segunda maior taxa de variabilidade, e assim por diante. Pode-se então plotar as duas primeiras (X e Y) ou mais coordenadas das análises, para visualizar os *clusters* da comunidade. Outros métodos para visualização da diversidade Beta incluem *clustering* hierárquico e criação de árvores filogenéticas (HIGHLANDER, 2012).

Os estimadores de riqueza podem calcular: o número de espécies por meio de curvas coletoras (figura 2), de modo que seja possível estimar o esforço empregado para inventariar uma área; número real de riqueza de espécies baseada em espécies raras compartilhadas entre grupos de amostras baseadas em incidência e a riqueza de espécies raras compartilhadas entre grupos de amostras. Amostras ambientais costumam apresentar um grande número de espécies. Por exemplo, as estimativas baseadas em análises não paramétricas apontam um número de espécie entre 6.400 a 38.000 espécies por grama de solo (CURTIS *et al.*, 2002; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006). Os estimadores de riqueza fornecem a quantidade de espécies que se pode encontrar em uma área, sem levar em conta a quantidade de indivíduos por espécie (abundância). Esses estimadores são aplicáveis aos dados com diferentes distribuições de abundância,

levando-se em conta os dados relativos às espécies raras (ou aquelas que só aparecem em uma ou em poucas amostras). O cálculo da riqueza de espécies é mais acurado em comunidades com alta equivalência, nas quais as espécies ocorrem em número semelhantes de indivíduos. Abordagens metagenômicas de NGS têm revelado que uma grande maioria de comunidades microbianas apresenta elevado número de espécies compostas por poucos indivíduos, indicando uma biosfera rara (ELSHAHED *et al.*, 2008; SOGIN *et al.*, 2006). Os estimadores que se baseiam na riqueza de espécies raras podem ser divididos em quatro categorias: *singletons* (espécies com somente um indivíduo), *doubletons* (espécies com somente dois indivíduos), *uniques* (espécies que ocorrem em somente uma amostra) e *duplicates* (espécies que ocorrem em somente duas amostras). As estimativas realizadas com espécies representadas por poucos indivíduos são, segundo (HELLMANN e FOWLER, 1999), uma função do número de espécies raras encontradas em uma comunidade.

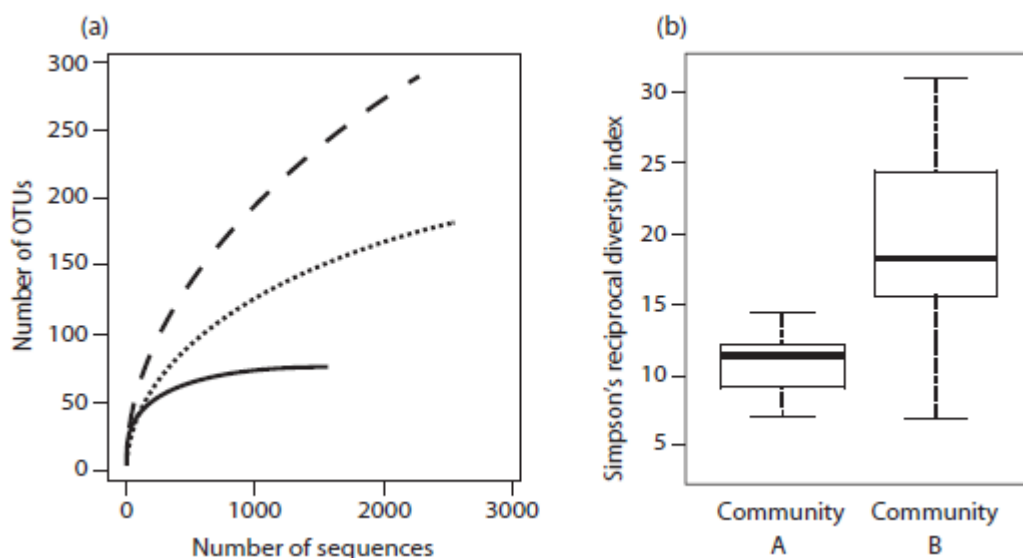


Figura 2. Exemplos de curvas coletoras e índice de Simpson (adaptado de HIGHLANDER, 2012)

- A figura acima demonstra uma curva coletora com três diferentes comunidades microbianas hipotéticas. Os números acumulados de espécies são plotados como uma função do número de sequências determinados por comunidade. Estima-se que a comunidade de linha cheia foi sequenciada à saturação entre 800 e 1000 sequências e é prevista de conter cerca de 60 espécies. A comunidade

representada pela linha pontilhada não atingiu saturação, mas é prevista de ser composta por não mais que 200 espécies quanto forem obtidas cerca de 3000 sequências. A terceira comunidade, mostrada pela linha tracejada está continuamente acumulando espécies além do nível de sequenciamento, indicando grande riqueza de comunidade.

- Box de plotagem do Índice de diversidade de Simpson para duas comunidades microbianas hipotéticas, na qual a comunidade B apresenta-se mais diversa que a comunidade A.

g) Métodos de análises metagenômicas

Apesar do principal objetivo de uma análise metagenômica é reconstruir todos os genomas contidos em uma amostra ambiental, tal fato ainda não pode ser alcançado em virtude do grande volume computacional que seria exigido, bem como da grande complexidade de dados gerados. Atualmente, existem dois tipos gerais de análises com o intuito de obter o genoma reconstruído (ambos com suas limitações inerentes às técnicas): (1) montar as *reads* em *contigs* e executar classificação taxonômica e anotações funcionais ou (2) reconstrução baseada em *reads* dos componentes taxonômicos e funcionais presentes no metagenoma. Métodos baseados em *reads* utilizados para classificação taxonômica e funcional de dados oriundos de NGS podem, frequentemente, apresentar obstáculos como um grande volume de *reads*, levando a longos períodos para análise, como também comprimentos curtos de *reads* fragmentadas, levando a uma alta taxa de erro (SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012).

Análises taxonômicas para procariotos (bacteria e archea) são geralmente realizadas utilizando dados 16S oriundos de diversas tecnologias de NGS (pirosequenciamento 454, Illumina, Solid e Ion Torrent). As ferramentas mais utilizadas para análise de dados para sequenciamento do 16S, bem como realização de *denoising* (retirada de fragmentos inespecíficos, limpeza dos dados) são QIIME (CAPORASO *et al.*, 2010), mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009), SILVAngs (QUAST *et al.*, 2013), MEGAN (HUDSON, AUCH, QI e SCHUSTER, 2007) e AmpliconNoise (QUINCE *et al.*, 2011). Apesar da vasta disponibilidade de algoritmos e *softwares* para análise de dados

metagenômicos de 16S, QIIME pode ser considerado como sendo o “padrão-ouro” (NILAKANTA *et al.*, 2014 e OULAS *et al.*, 2015). WATERS (HARTMAN *et al.*, 2010) foi desenvolvido com o objetivo principal de expandir as análises de sequenciamento para usuários não bioinformatas. RDPipeline (COLE *et al.*, 2014) foi criado para *amplicons* de grande volume de dados. VAMPS (HUSE *et al.*, 2014) também foi designado para permitir que ecologistas e clínicos pudessem analisar dados facilmente, com uma *interface “point and click”*, assim como o *software* Genboree (RIEHLE *et al.*, 2012), que também fora criado com esse intuito. Por último, SnowMan (STOCKER *et al.*, 2010) foi desenvolvido com uma interface para análise bem direcionada e basicamente opera como um *pipeline de pipelines* (NILAKANTA *et al.*, 2014).

h) Montagem

Os métodos atuais melhor adaptados a executar montagens de dados oriundos de NGS utilizam métodos baseados em gráficos transversais de Kmer DeBruijn, como os programas Velvet, SOAPdenovo, ALLPATHS, AbySS, CLC Bio, bem como novos programas que estão em desenvolvimento e constantes atualizações (MILLER, KOREN e SUTTON, 2010 e LASERSON, JOJIC e KOLLER, 2011). A abordagem por Kmer foi desenvolvida em uma tentativa de sobrepujar as limitações por tempo encontradas nas estratégias de montagem por sobreposição (*overlap-based*). Ao passo que os volumes de dados gerados por NGS têm aumentado, esse processo se tornou extremamente lento (SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012).

Os métodos atuais melhor adaptados a executar montagens de dados oriundos de NGS utilizam métodos baseados em gráficos transversais de Kmer DeBruijn, como os programas Velvet, SOAPdenovo, ALLPATHS, AbySS, CLC Bio, bem como novos programas que estão em desenvolvimento e constantes atualizações (MILLER, KOREN e SUTTON, 2010 e LASERSON, JOJIC e KOLLER, 2011). A abordagem por Kmer foi desenvolvida em uma tentativa de sobrepujar as limitações por tempo encontradas nas estratégias de montagem por sobreposição (*overlap-based*). Concomitante o aumento de volume de dados de NGS, esse processo se tornou extremamente lento (SCHOLZ, LO e

CHAIN, 2012). Metagenomas possuem diversos desafios de montagem adicionais. Múltiplos genomas estão representados desproporcionalmente em virtude da composição não-equacionada de uma comunidade (sendo essa uma característica inerente à amostra), resultando em baixa ou nenhuma cobertura de diversas partes de um genoma. Sendo assim, a montagem de *reads* em *contigs* quase sempre é limitada em virtude da complexidade de composição da população (XIE *et al.*, 2010) e mais dados são requeridos para cobrir essas regiões diversas do genoma, a um custo computacional muito grande. Dos diversos montadores existentes, MetaVelvet e Meta-IDBA são os mais adequados para análises metagenômicas, uma vez que eles se baseiam em alocar os genomas em abundância por separação de dados de *short-reads* em frequência de Kmer e/ou colapsando o gráfico.

i) Análises baseadas em leitura

Abordagens baseadas em leitura podem permitir explorar funções de genes e classificação taxonômica. Entretanto, apenas um grupo de dados podem ser designados tanto para função ou classificação, associado ao grau de confiança que pode se alterar como resultado do uso de ambas as bases de referência, além do pequeno tamanho das *reads*.

Métodos baseados em mapeamento de leituras no alinhador Burrows-Wheeler como o BWA, Bowtie MAQ e outros podem realizar alinhamentos rápidos de leituras em um dado *set* de sequências de referência (FLICEK e BIRNEY, 2009). Esse método possui limitações em relação às sequências de referência, porém é extremamente rápido. MUMmer (DELCHER *et al.*, 2002) é menos limitada em sua base de dados, porém mais lento que o anterior. BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) é mais sensível e pode ser usado para encontrar sequências homólogas distantes para taxonomia e atributos funcionais, porém exige um grande poder de processamento da máquina. Dependendo dos recursos computacionais a serem empregados no alinhamento, os resultados variando de dez a centenas de milhares de leituras podem ser obtidas em horas (BURROWS WHEELER), dias (Nucmer) ou semanas (BLAST). Outras abordagens

rápidas como o uso de *Hidden Markov Models* (HMM) pré-desenvolvidos pode também ser aplicado para encontrar domínios conservados (SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012).

j) *Denoising*

Denoising é o ato de eliminar os possíveis interferentes em uma análise (por exemplo, formação de reações inespecíficas e leituras incompatíveis com o tamanho padrão). O processo de *denoise* propriamente dito não remove as sequências atuais, mas preserva informação abundante em sequências errôneas. Diversos algoritmos de *denoise* estão disponíveis para as análises. PyroNoise (QUINCE *et al.*, 2011) implementa um método de *clustering* por fluxograma e outras ferramentas de *denoise* como Denoiser (REEDER e KNIGHT, 2010), DADA (ROSEN *et al.*, 2012) e Acacia (BRAGG *et al.*, 2012) utilizam abundância de informação das sequências no processo. Semelhantemente, *preclustering* podem ser usados anterior à classificação por OTU, reduzindo sequências *noise* geradas por erros de sequenciamento. Primeiramente, são ranqueados sequências em ordem decrescente de abundância e sequências mais raras contidas em um determinado limite são aglomeradas às sequências originais abundantes (KIM *et al.*, 2013 e HUSE *et al.*, 2010)

k) Retirada de quimeras

Uma vez que o *denoising* é finalizado, e processos adicionais de controle de qualidade são completados, as sequências quiméricas devem ser removidas dos dados. Quimeras são recombinações artificiais entre dois ou mais sequências parentais, e elas são normalmente formadas quando fragmentos pré-existent re-anelam a outros *templates* de DNA durante a amplificação em PCR (BRADLEY e HILIS, 1997). Essas moléculas artificiais tornam difícil a diferenciação de sequências originais das recombinantes, resultando em uma superestimação do nível de diversidade microbiana em amostras (HUGENHOLTZT e HUBER, 2003). A partir do momento que quimeras são formadas e sequenciadas, necessitam ser retiradas dos dados utilizando ferramentas de bioinformática. Entretanto, detectar quimeras ainda é um obstáculo, uma vez que suas formações podem ocorrer em qualquer posição, mais de uma vez. Plataformas NGS geram sequências de curto comprimento, tornando difícil a diferenciação da origem das

sequências, gerando informação taxonômica insuficiente. Diversos algoritmos e ferramentas têm sido desenvolvidos especialmente para identificar quimeras em dados oriundos de sequências com alto *throughput*. Essas ferramentas incluem UCHIME (EDGAR *et al.*, 2010), ChimeraSlayer (HAAS *et al.*, 2011), Perseus (QUINCE *et al.*, 2011) e Decipher (WRIGHT *et al.*, 2012). Todas essas ferramentas, com exceção de ChimeraSlayer, usam informações de frequência de sequências para identificar quimeras, assumindo que as sequências quiméricas são menos frequentemente representadas em um dado específico em detrimento às sequências normalmente amplificadas. Não existe nenhum algoritmo que consiga detectar quimeras perfeitamente, mas até o presente momento, sabe-se que UCHIME sobrepuja os outros algoritmos, ao menos para *reads* de NGS (KIM *et al.*, 2013 e EDGAR *et al.*, 2011).

1) Agrupamento de OTUS

O passo seguinte à retirada de quimeras é o agrupamento em OTU (*OTU clustering*) - um processo essencial em análises de comunidade - ao passo que agrupa sequências com maiores similaridades e então fornece um significado taxonômico para cada agrupamento. Erros de sequenciamento, quimeras e algoritmos de agrupamento exercem grande influência na qualidade dos OTUs (SCHLOSS *et al.*, 2011). Existem duas maneiras para se realizar esse agrupamento. A primeira delas é baseada em agrupamento por alinhamento e a outra é um método livre de alinhamento. O alinhamento das sequências é realizado ao emparelhar sequências próprias contra sequências de referência pré-alinhadas ou utilizando alinhamentos de sequência múltiplos (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994 e DESANTIS *et al.*, 2006). A qualidade do alinhamento pode variar, porém alinhamentos incorporando informações secundárias geralmente tendem a melhorar a anotação dos OTUs, ao menos para sequências do gene rRNA 16S. O algoritmo NAST (DESANTIS *et al.*, 2006) tem sido utilizado com sucesso na ecologia microbiana como uma ferramenta de alinhamento baseada em perfil. O alinhador SINA, baseado no alinhamento de ordem parcial que usa perfis estruturais secundários em regiões consenso foram recentemente introduzidos, juntamente do *software* Infernal (NAWROCKI, KOLBE e EDDY, 2009 e PRUESSE *et al.*, 2012).

Não existe nenhum método ou algoritmo que garanta um alinhamento perfeito ou que permita alcançar índices máximos de qualidade. Alternativamente, métodos livres de alinhamento são mais amplamente utilizados em OTUs. Algumas dessas ferramentas de livre alinhamento são UCLUST (EDGAR, 2010), CD-HIT (FU *et al.*, 2012) e ESPRIT-Tree (CAI e SUN, 2011). UCLUST e CD-HIT implementam seu próprio processo de agrupamento de OTU ao elencar sequências em ordem de abundância (UCLUST) ou diminuindo o comprimento (CD-HIT). ESPRIT-Tree utiliza um algoritmo de agrupamento baseado em média hierárquica por elos. Existem algumas outras ferramentas que implementam a “opção de colapsar homopolímeros”, com o intuito de minimizar os erros causados por esses homopolímeros em leituras 454: CLOTU (KUMAR *et al.*, 2011), SCATA (<http://scata.mykopat.slu.se>), CrunchCluster (HARTMANN *et al.*, 2012) e TBC (LEE *et al.*, 2012).

Uma abordagem dependente de taxonomia foi recentemente proposta como uma alternativa para os agrupamentos por OTUs (SUL *et al.*, 2012). Esse método possui duas grandes vantagens para esse tipo de agrupamento. Primeiramente, a anotação taxonômica direta para cada sequência emparelhada é mais tolerante aos erros de sequenciamento que o processo de escolha de OTUS, pois o processo de anotação é menos afetado pelos erros de substituições, deleções ou inserções, uma vez que os erros de sequenciamento são conhecidos por gerar diversos OTUS falsos. Também ajuda a prevenir a perda massiva de sequências errôneas (mas que ainda assim podem ter significado taxonômico). Em segundo lugar, permite aos pesquisadores que realizem análises de comunidade mais padronizadas, baseadas em uma única regra de anotação (KIM *et al.*, 2013).

m) Base de dados para 16S e classificação taxonômica

A análise de anotação geralmente requer uma base de dados de referência que é procurada para se detectar a mais próxima semelhança de um OTU com uma linhagem taxonômica. Algumas bases de dados amplamente utilizadas são Greengenes (16S) (DESANTIS *et al.*, 2006), Ribossomal Database Project (16S) (COLE *et al.*, 2007), Silva (16S + 18S) (QUAST *et al.*, 2013), Unite (ITS) (KÖLJALG, NILSSON e ABARENKOV, 2013) e NCBI (FEDERHEN, 2012). Essas bases de dados são menos

aplicáveis a determinados grupos de microrganismos como protistas e vírus, pois são organismos extremamente diversificados com menor volume de sequências e consequentemente de informações (OULAS *et al.*, 2015).

Ao se realizar uma abordagem de classificação taxonômica, o pesquisador pode encontrar algumas divergências em sua estrutura, uma vez que os OTUs podem ser anotados baseados em sua sequência de similaridade (ou distância), ou então podem ser anotados relacionando-os em uma árvore filogenética. Considera-se então: (1) independência de filogenia ou métodos baseados em OTU (SCHLOSS *et al.*, 2009), *versus* (2) dependência de filogenia ou métodos filogenéticos (LOZUPONE e KNIGHT, 2005); LOZUPONE *et al.*, 2011). Uma vantagem da abordagem baseada em OTU é que não apresenta viés taxonômico e prontamente aceita novas sequências de taxonomia desconhecida. Uma desvantagem dessa abordagem é que anotações *de novo* de OTU exigem grande poder de processamento. O método filogenético, como o usado no UniFrac, pode ser mais útil em examinar diferenças e similaridades entre espécies em uma determinada comunidade (HIGHLANDER, 2012; LOZUPONE e KNIGHT, 2008).

n) *Softwares* integrados para análise de comunidades microbianas (*pipelines*)

IMG-M, CAMERA e MG-RAST permitem algumas análises além da anotação, incluindo identificações taxonômicas e funcionais, além de re-construção de vias, tornando-se portais populares que podem fornecer uma única plataforma para deposição, localização, análise, visualização e compartilhamento de dados. Esses recursos são bastante úteis para indivíduos sem acesso a potentes servidores e não contam com auxílio de um bioinformata em suas análises. METAREP é outra ferramenta desenvolvida para metagenômica comparativa de alta performance. Os usuários podem analisar e comparar dados metagenômicos anotados por sumários gráficos para classificações taxonômicas e funcionais, além de realizar testes estatísticos. Caso existam metadados, esses *sites*/ferramentas podem criar análises estatísticas multivariadas como análises de componentes principais (PCA) e escalonamento multidimensional não métrico para agrupar amostras e demonstrar quais fatores pode contribuir mais significativamente para uma observada função ou

classificação taxonômica, em virtude da população (WILLNER *et al.*, 2011 e SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012).

Dois outros pacotes disponíveis para análises de rRNA 16S são o QIIME (<http://qiime.org>) (KUCZYNSKI *et al.*, 2011) e mothur (<http://mothur.org>) (SCHLOSS *et al.*, 2009). Inicialmente, o QIIME foi implementado para uso apenas da plataforma 454, utilizando arquivos sff, porém atualmente QIIME tem sido modificado para aceitar também o formato FASTQ, tornando possível a análise de dados oriundos de outras plataformas como Illumina. Os desenvolvedores do QIIME fornecem aos usuários extensivos tutoriais *online* para diversos fluxos de trabalho. O *software* utiliza linguagem de programação PYTHON, sendo denominado *open-source* (OULAS *et al.*, 2015). Mothur foi um resultado da combinação de *softwares* pré-existentes como DOTUR, SONS e Treeclimber, mas, graças ao suporte da comunidade científica, mothur incorpora muitos outros algoritmos atualmente, fornecendo assim ao usuário uma ampla variedade de escolhas (OULAS *et al.*, 2015).

Essas ferramentas podem realizar todas as análises já relacionadas anteriormente além de muitas outras abordagens. O pacote QIIME usa a abordagem métrica filogenética para beta diversidade por meio do *software* Unifrac (LOZUPONE e KNIGHT, 2005) para criar matrizes de distância que ora são balanceadas ou desbalanceadas, para avaliações qualitativas e quantitativas, respectivamente. O *input* requerido é uma tabela de abundância de OTU e árvore filogenética, que podem ser geradas pelo QIIME. Outros mais complexos tipos de interação de comunidades, como agrupamento hierárquico e redes de distribuição podem também ser visualizados usando a matriz de distância como *input*. A plataforma também irá realizar uma análise baseada em OTUs. O pacote mothur é mais focado em abordagens baseadas em OTU para avaliar a diversidade da comunidade, mas também possui algoritmos Unifrac. Ainda conta com uma útil leitura de processamento de *pipeline*, utilizada pelo *Human Microbial Project* (HMP). Ambos QIIME e mothur incluem ferramentas de agrupamento e análises de redes de distribuição, que podem ser utilizadas para trazer respostas às dúvidas de “como os membros da comunidade se interrelacionam?” (HIGHLANDER, 2012).

Nilakanta e colaboradores (2014) avaliaram a diferença entre sete *pipelines*, sendo eles QIIME, WATERS, RDPipeline, VAMPS, Genboree e SnoWMan, para alvo específico do gene rRNA 16S. Como resultado, os pesquisadores descrevem que QIIME e mothur apresentaram melhores resultados, não só pela melhor estrutura compreensiva de funções e procedimentos incorporados aos *pipelines*, mas também pelo fato da documentação que acompanha esses *softwares*. O *pipeline* mothur apresenta explicações claras das análises e técnicas, além de fornecer um tutorial fácil de ser seguido e implementado.

Recentemente, Plummer e colaboradores (2015) resolveram comparar três das plataformas mais populares para análise metagenômica de rRNA 16S – QIIME, mothur e MG-RAST. Para tanto, os autores utilizaram um único *dataset* oriundo de microbiota intestinal de humanos (N=35, utilizando amplificação das regiões V3—V5 do gene rRNA 16S), utilizando SILVA 16S rRNA como base de referência. Todas as amostras foram submetidas às mesmas plataformas de sequenciamento: Illumina, Sanger, Ion Torrent, 454 e PacBio. Foram adotados os mesmos processos de controle de qualidade para os três processos (retirada de quimeras e outros processos). Os pesquisadores não encontraram diferenças significativas em nível de Filo para os três *pipelines*. As diferenças notáveis se deram em nível de gênero, particularmente na classificação de membros da família Enterobacteriaceae. Os autores atribuem essas dificuldades em virtude da ausência de regiões variáveis no gene rRNA 16S desses microrganismos, ao passo que sequenciamento havia sido realizado com primers-alvo para regiões hipervariáveis (V3-V5). O mesmo obstáculo é observado na classificação taxonômica de microrganismos pertencetes a família dos Lactobacillaceae. O quadro 4 resume as principais diferenças observadas nas três plataformas.

Quadro 4. Principais diferenças e semelhanças entre os três *pipelines* QIIME, mothur M RAST para análise metagenômica do generRNA 16S

Licença	QIIME	mothur	MG-RAST
	<i>Open-source</i>	<i>Open-source</i>	<i>Open-source</i>
Implementação	Python	C++	Perl
Citações *	13476	9990	2496
Site	http://qiime.org	http://mothur.org	http://metagenomics.anl.gov
Interface baseada em web	Sim	Não	Sim
Uso primário	Linha de comando	Linha de comando	Interface guiada pelo usuário
Análise de amplicon	Sim	Sim	Sim
Análise WGS	Sim (experimental)	Não	Sim
Compatibilidade plataformas NGS	Illumina, Sanger, Ion Torrent, PacBio	Illumina, Sanger, Ion Torrent, PacBio	Illumina, Sanger, Ion Torrent, PacBio
Controle de qualidade	Sim	Sim	Sim
Base de dados 16S rRNA	RDP Silva, Greengenes e bases próprias	RDP Silva, Greengenes e bases próprias	M5RNA, RDP, Silva e Greengenes
Método de alinhamento	PyNast, MUSCLE, INFERNAL	Needleman-Wunshc, blastn, goth	BLAT
Análise taxonômica/anotação	UCLUST, RDP, BLAST, mothur	mothur, DOTUR e CD-HIT	BLAT
Algoritmo de agrupamento	UCLUST, RDP, BLAST, mothur e BLAST	Wang/RDP	BLAT
Análise de diversidade	Alfa e Beta	Alfa e Beta	Alfa
Árvore filogenética	FastTree	Algoritmo Clearcut	Sim
Deteção de quimera	UCHIME, chimera slayer, BLAST	UCHIME, chimera slayer, BLAST	Não
Visualização	PCA, rede OTUs, barras, <i>heatmaps</i>	Dendrogramas, diagramas de Venn, barras, <i>heatmaps</i> , PCA	PCA, <i>heatmaps</i> , gráficos de fatia, barras, visualização para Krona e Circos
Suporte ao usuário	Tutoriais em fóruns, FAQs, vídeos	Forum, SOPs, FAQs, manual do usuário	Tutoriais em vídeo, manual do usuário, ajuda no site

Adaptado de Plummer *et al.*, 2015. *de acordo com Scopus em 15/01/19

o) Análise metagenômica por biomarcadores

Diferenças observadas nos diferentes pipelines para as análises 16S evidenciam uma limitação desse tipo de análise, uma vez que até mesmo a taxonomia em nível de gênero pode não ser confiável. Diversos microrganismos apresentam grande similaridade no

que diz respeito ao gene 16S, tornando difícil a real caracterização dessas espécies (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007). Uma notável variabilidade particular (como a presença de marcadores moleculares) poderia apresentar propriedades notórias de diversas comunidades microbianas. Como exemplo, ambos microbiomas ambientais e humanos podem estar sujeitos a uma grande gama de organismos raros (PEDRÓS-ALIÓS, 2006 e LIAO *et al.*, 2011).

A redundância é um grande obstáculo na análise de dados metagenômicos. Taxonomicamente, como uma comunidade microbiana é dinâmica, é muito comum que existam muitas amostras similares bem como amostras mutantes de uma mesma espécie. Entretanto, para maximizar o poder desses biomarcadores para aplicação clínica em diagnósticos e outras análises ambientais, torna-se desejável a descoberta de biomarcadores que sejam tanto distinguíveis quanto representativos. No atual contexto, biomarcadores de amostras semelhantes e mutantes são consideradas redundantes, uma vez que contém a mesma informação genética (WANG *et al.*, 2015).

Portanto, ferramentas robustas e eficientes de bioinformática para garantir a reprodutibilidade da identificação desses biomarcadores em dados metagenômicos, que são cruciais para aplicação, se tornam necessários. Segata e colaboradores (2011) elucidaram que biomarcadores não-redundantes são extremamente importantes para entender o papel e a consistência biológica dos microrganismos, sendo fatores cruciais para esclarecer os mecanismos envolvidos nas interações entre comunidade-comunidade ou hospedeiro-comunidade.

Wang e colaboradores (2015) realizaram um experimento com três *datasets* (amostras de cavidade oral e de solo) que foram, então, comparados pelo gene rRNA 16S quanto a presença de biomarcadores, em três *pipelines*: Metastats, LefSe e Metaboot. Os resultados indicaram que Metaboot foi capaz de identificar mais marcadores não-redundantes, com maior acurácia e robustez. Em dois *datasets*, Metaboot foi capaz de identificar marcadores mais confiáveis para distinguir entre os diferentes tipos de microrganismos em comunidades, demonstrando que seus resultados foram biologicamente mais significativos.

p) Análises multivariadas

Análises multivariadas são ferramentas frequentemente associadas a *datasets* com um grande número de dados, como HTS (*highthroughput sequencing*). Embora muitas ferramentas experimentais diferentes possam ser utilizadas para obter dados ecológicos de alto rendimento, o *output* na maioria dos casos é apresentado como uma matriz de números positivos, cada um representando um valor medido para variável X (por exemplo, nível de mRNA ou proteína, concentração de metabolito abundância de espécies) no objeto Y. Basicamente, as análises multivariadas podem ser divididas em três métodos: exploratórios, interpretativos e discriminatórios. A seguir, serão apresentados exemplos para método de análise.

- Métodos exploratórios: São utilizados para explorar as relações entre objetos com base nos valores das variáveis medido nesses objetos, e.g.: amostras de solo (objetos) coletadas em diferentes paisagens podem ser comparadas com base na abundância de espécies microbianas provenientes desses solos (variáveis). As abordagens mais utilizadas são *principal component analysis* (PCA), *correspondent analysis* (CA), *principal coordinates analysis* (PcoA) e *nonmultimetric dimensional scale* (NMDS).
 - PCA: A análise de componentes principais (PCA) é uma das mais amplamente utilizado e um dos mais antigos métodos de ordenação análises (Pearson 1901). O princípio geral da PCA é calcular novas variáveis sintéticas chamadas componentes baseados nas operações da matriz aplicado ao conjunto de dados original de variáveis quantitativas. Cada componente principal (PC) é uma combinação linear de variáveis originais calculadas para que o primeiro PC represente um eixo no espaço de dados multidimensional que produziria a maior dispersão de valores ao longo este componente. Devido ao fato dessa análise utilizar distâncias Euclidianas, deve-se evitar utilizar essa abordagem em *datasets* com muitos zeros.

- CA: A análise de correspondência é uma técnica exploratória projetada para encontrar relacionamentos (correspondência) entre linhas e colunas de uma matriz de tabelas dados (muitas vezes chamada de tabela de contingência) e para representar essas relações em um espaço de ordenação (HILL 1973, 1974).
- PcoA: Pode ser considerada uma extensão da técnica de PCA. Essa análise também procura ordenar os objetos ao longo dos eixos de coordenadas principais ao tentar explicar uma variação no conjunto de dados original. No entanto, enquanto o PCA organiza objetos por uma análise automática de uma correlação ou matriz de covariância, o PCoA pode ser aplicado a qualquer matriz de distância (dissimilaridade) (GOWER 1966). A técnica de PcoA ganhou popularidade recente em ecologia microbiana devido a sua capacidade de usar distâncias filogenéticas (UNIFRAC) (LOZUPONE e KNIGHT 2005) e composição de comunidade (*Bray-Curtis distance*) (BRAY e CURTIS 1957) para calcular a (dis)similaridade entre populações microbianas.
- NMDS: é uma técnica de ordenação em que um (pequeno) número de eixos de ordenação são explicitamente escolhidos antes da análise e os dados são então adaptados a essas dimensões. Semelhante ao PCoA, uma matriz de dissimilaridades objeto é calculada usando um métrica de distância escolhida e os ranks dessas distâncias entre todos os objetos são calculados
- Métodos interpretativos: podem ser divididos em simétricos e assimétricos. Abordagens simétricas comparam dois conjuntos de dados e não distinguem entre variáveis explicativas e de resposta. Já as análises assimétricas são abordagens também usam dois conjuntos diferentes de variáveis, mas designam um conjunto como variáveis explicativas (independentes) e outro como variáveis de resposta (dependentes). Ainda são considerados métodos interpretativos as

estatísticas de significância entre grupos observados, podendo ser citadas as *redundancy analysis* (RDA), *Mantel test*, *analysis of similarity* (ANOSIM) e *permutational analysis of variance* (PERMANOVA).

- RDA: É um tipo de ordenação restrita que avalia quanto da variação em um conjunto de variáveis pode ser explicada pela variação em outro conjunto de variáveis. É a extensão multivariada da regressão linear simples aplicada a um conjunto de variáveis. Uma variante especial do RDA, chamada *distance-based RDA* ou db-RDA, pode ser aplicada quando os dados de resposta estão disponíveis como matriz de dissimilaridade, ou quando o uso da distância euclidiana é inapropriada (Legendre e Anderson 1999; Anderson e Willis 2003). db-RDA é, portanto, uma versão restrita do PCoA e fornece uma oportunidade de usar distâncias filogenéticas e ecológicas em análise de ordenação restrita (SHAKYA *et al.* 2013).
- *Mantel test*, ANOSIM e PERMANOVA são testes estatísticos multivariados de significância. O teste de Mantel normalmente compara duas matrizes de distância que foram calculadas para o mesmo conjunto de objetos, mas que são baseados em dois conjuntos independentes de variáveis (por exemplo, uma matriz de dissimilaridade de espécies e uma matriz de distância) (MANTEL 1967). O teste calcula a correlação entre valores nas posições correspondentes de duas matrizes. Significância da linearidade entre matrizes é avaliada por meio de permutação de objetos. O adonis é muito semelhante ao PERMANOVA, embora seja mais robusto, pois pode aceitar variáveis categóricas ou contínuas no arquivo de mapeamento de metadados, enquanto PERMANOVA só pode aceitar variáveis categóricas
- Métodos discriminatórios: compreende um grupo de técnicas de ordenação que encontram combinações lineares das variáveis observadas que maximizam a

agrupamento de objetos em classes separadas (Fisher 1936). Aqui, as variáveis medidas são as variáveis preditoras, e a variável que define classes de objetos é tratado como a variável de resposta (também chamado de agrupamento variável).

4 – MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em duas etapas: uma no Brasil e outra na Áustria, como parte do Doutorado Sanduíche com bolsa (processo número -88881.133802/2016-01) fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), realizado pelo autor do trabalho no período de Março a Junho no ano de 2017.

O formulário de envio das amostras, segundo normas regulamentadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) se encontra no ANEXO I desse trabalho.

As etapas realizadas no Brasil ocorreram no Laboratório de Genética Molecular de Parasitos e Protozoários – LGMPP, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte/MG Brasil. e também no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte/MG Brasil.

Etapas realizadas no Brasil:

- Visita às propriedades rurais
- Coleta das amostras de leite, pingo e queijos Minas artesanal da Serra do Salitre
- Pré-tratamento e extração do DNA total bacteriano
- *First-step* PCR para sequenciamento do gene rRNA 16S
- Quantificação e purificação dos *amplicons*
- Envio dos *amplicons* para Áustria
- Análises de bioinformática complementares (*downstream analysis*)

As etapas realizadas na Áustria ocorreram no *Institut für Milchhygiene*, na *Veterinärmedizinische Universität* – Viena, Áustria, sob a supervisão do Prof. Dr. Martin Wagner e orientação de Dr. Evelyne Mann, Dr. Stephanie Wetzels e Dr. Stephan Schmitz-Esser (atualmente na Iowa State University).

Etapas realizadas na Áustria

- Quantificação dos *amplicons*
- *Second-step* PCR para o sequenciamento de alto rendimento do gene rRNA 16S (realizado pela Microsynth, uma *facility* de sequenciamento localizada em Balgach, Suíça)
- Processamento das *reads*

4.1 – Caracterização das propriedades rurais

Realizou-se, no município de Serra do Salitre, uma reunião com a presença dos produtores de QMA, técnicos de instituições públicas relacionadas à cadeia produtiva do QMA e colaboradores do projeto de pesquisa. Nesta, foi elencado um conjunto fixo de seis produtores de QMA cadastrados pelo IMA na região de Serra do Salitre, que concordaram em participar da pesquisa. Ainda, nesta reunião, foram apresentados os objetivos do projeto de pesquisa e procedeu-se o planejamento das ações de coleta de amostras. Assim, os técnicos locais foram instruídos sobre os procedimentos de coleta e foram abastecidos com materiais apropriados para tal finalidade.

Durante o período seco (entre 08 de agosto de 2016 e 10 de outubro de 2016) foram coletadas amostras em réplica de queijos com períodos de maturação de um, sete, 14, 21, 28, 45 e 60 dias. Além dos queijos, foram coletadas amostras do leite cru que deu origem aos queijos coletados e o pingo utilizado na elaboração dos queijos.

A tabela abaixo relaciona as características de cada propriedade quanto ao sistema produtivo e localização geográfica, ilustrado pela figura 3.

Tabela 2. Características das propriedades rurais quanto ao sistema produtivo e localização geográfica

Fazenda	Raça predominante no rebanho	Alimentação do rebanho	Método de ordenha	Localização geográfica
A	1/2 Holandes ; 1/2 Gir	Silagem de milho		
B	1/2 Holandes ; 1/2 Gir	Silagem de milho		
C	1/2 Holandes ; 1/2 Gir	Silagem de milho		
D	1/2 Holandes ; 1/2 Gir	Silagem de milho		
E	1/2 Holandes ; 1/2 Gir	Silagem de milho		
F	1/2 Holandes ; 1/2 Gir	Silagem de milho		

A figura 3 abaixo relaciona a localização geográfica das propriedades dentro da região da Serra do Salitre, inserida na mesorregião do Cerrado.

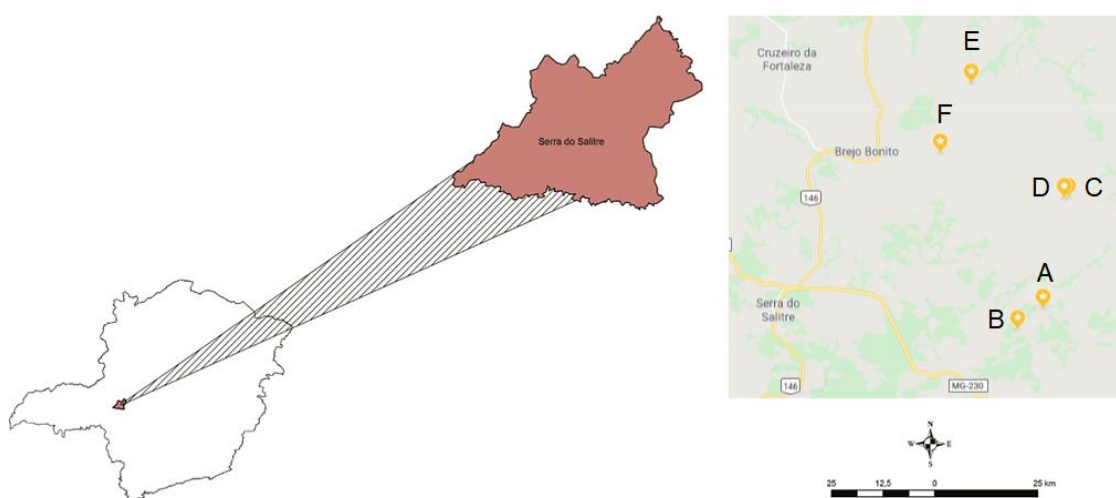


Figura 3 Localização geográfica das fazendas inseridas na região da Serra do Salitre

4.2 – Design experimental

Na época da realização das coletas (2016), a região da Serra do Salitre contava com 14 produtores de QMA. Sendo assim, o número de propriedades foi adotado de acordo com o total de propriedades presentes na região, por meio de cálculo estatístico de amostragem: $\Delta = (t.CV)/\sqrt{n}$, donde $30 = (2.100)/\sqrt{n}$, obtendo um valor de $n = 45$ amostras (número mínimo a ser amostrado pela região). Dessa forma, seis produtores

certificados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA, Minas Gerais, Brasil) foram aleatoriamente selecionados para o estudo.

Amostras de leite, pingo e queijo em sete períodos de maturação distintos foram coletadas de seis produtores localizados no município de Serra do Salitre – MG. Assim, o delineamento experimental consiste em:

- Períodos de maturação: 1, 7, 14, 21, 28 45 e 60 dias
- Leite e soro-fermento: 6 (queijarias) x 2 (leite e soro-fermento)
- Queijos: 6 (queijarias) x 7 (períodos de maturação) x 2 (áreas do queijo a serem analisadas – casca e massa interna)
- Número de amostras:
 - Leite e soro-fermento: 12 amostras
 - Queijos (casca): 42 amostras
 - Queijos (massa interna): 42 amostras
 - Número total: 96 amostras

4.3 – Coleta das amostras

Todas as amostras foram coletadas a partir do mesmo lote de produção da respectiva propriedade rural. O mesmo lote de leite cru deu origem ao pingo e a todos os queijos durante o período de maturação. O leite cru foi coletado diretamente do tanque de expansão em frasco estéril de 25 mL e armazenado sob-refrigeração a 7°C até o momento do processamento. O pingo foi coletado diretamente de um balde limpo em frasco estéril de 25 mL e armazenado sob-refrigeração a 7°C até o momento do processamento. Os queijos foram envolvidos em papel alumínio autoclavado e armazenados sob-refrigeração a 7°C até o momento do processamento. Todas as amostras sob-refrigeração foram processadas em menos de 24h de armazenagem para evitar crescimento bacteriano que pudesse interferir nas análises das comunidades bacterianas.

As amostras de queijo foram obtidas em duplicatas para cada tratamento (duas rodas de queijo por período de maturação). Para as amostras da casca do queijo, lâminas de

bisturi estéreis foram utilizadas para raspar partes aleatórias das duplicatas, e então um *pool* de aproximadamente 3g foi formado a partir dessas duplicatas. Para o interior do queijo, novas lâminas de bisturi estéreis foram utilizadas para coletar partes aleatórias da massa interna das duplicatas, e então um *pool* de aproximadamente 3g foi formado a partir dessas duplicatas. Um cuidado extra foi tomado para evitar que a raspagem da casca pudesse adentrar a massa interna e vice-versa, de forma a evitar contaminação cruzada das amostras.

4.4 – Análises físico-químicas e aquisição de metadados

Umidade e acidez titulável das amostras de leite, pingo e queijos foram determinados de acordo com a metodologia empregada por Castro *et al.* (2016). Fatores abióticos como média da temperatura na região (°C) e precipitação média foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2018). Dados geográficos das fazendas como latitude, longitude e altitude foram obtidos a partir do IMA.

4.5 – Pré-tratamento das amostras para extração

Um total de 3g de cada amostra de queijo (casca e interior) foram diluídos (1:10) em 2% (v/v) de citrato de sódio em tubos Falcon e homogeneizados utilizando um UltraTurrax (24.000 RPM/1min). Para as amostras de leite e pingo, um total de 5 mL de cada amostra foi diluído em 2% (v/v) de citrato de sódio e também transferidos para tubos Falcon de 15 mL, e então foram centrifugados a 4.000 x G por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* remanescente foi diluído em 15 mL de citrato de sódio (2% v/v) e homogeneizado usando um Ultra Turrax (24.000 RPM/1min). Para todas as amostras, as lâminas do Ultra Turrax foram limpas com duas passagens em etanol a 70% (v/v), água deionizada. Então, 100 µL de álcool iso-amílico foi adicionado a 1.5 mL de cada homogenate (leite/pingo/queijo) e incubados em água quente a 45°C por 10 minutos, para então serem centrifugados a 10.000xG por 10 minutos. A camada de sobrenadante formada pela centrifugação foi descartada e o *pellet* remanescente foi incubado a 37°C por 10 minutos para que as soluções residuais evaporassem. Esse protocolo para o pré-tratamento de extração do DNA foi adaptado de Quigley e colaboradores (2012).

4.6 – Extração do DNA

Os *pellets* obtidos a partir do pré-tratamento foram suspensos em 500µL de tampão de lise (20 nmol/L de Tris HCl, 2 nmol/L de EDTA, Triton X-100 a 2%, 10 mg/mL de lisozima e 200 µg de lisostafina). Então, 10 µL de proteinase K (25 mg/mL) foram adicionados às amostras e incubados a 55°C por 1 hora. A suspensão dessas amostras foi transferida para novo micro tubos de 2.5 µL contendo 0.3g de *beads* de zircônio e agitadas por 10 minutos em um vórtex a velocidade máxima. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x G por 10 minutos, e 500 µL do sobrenadante foi transferido para novos micro tubos de 2.5 µL, e igual volume de fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico (25:24:1)µL foi adicionado e então as amostras foram centrifugadas a 12.000xG por 10 minutos. A fase aquosa da suspensão foi transferida para novos microtubos de 1.5 µL, sendo adicionado 1/10 do volume total em acetato de sódio e 2 volumes de etanol gelado. Um controle negativo (*no-template control* - NTC) foi incluído na extração de DNA e processado juntamente com todas as amostras para assegurar que os reagentes não estivessem contaminados com DNA estranho. As amostras foram armazenadas a -20°C até futuro uso. Para o processamento, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, centrifugadas a 14.000 RPM por 10 minutos e secadas por 5 a 10 minutos em uma estufa de secagem (aproximadamente 50°C). Os *pellets* secos foram purificados utilizando o *kit* de purificação Wizards SV Genomics Purification System (Promega, Wisconsin, USA), seguindo as recomendações do fabricante e armazenadas a -20°C até futuro uso.

4.7 – Preparo da biblioteca e sequenciamento de alto rendimento do gene rRNA 16S

A reação de *first-step* PCR foram realizadas utilizando DNA polimerase *pfu* (Promega) e utilizando os *primers* 5' das regiões hipervariáveis V3/4/5: 357_hmp (CCTACGGGAGGCAGCAG) e 926R_hmp (CCGTCAATTCMTTTRAGT), gerando *amplicons* de 570 bp. As concentrações dos reagentes foram: 10X tampão com MgSO₄; 200 µM de dNTP mix; 0.1 µM de cada um dos primers; 0.5 µg de *template* de DNA e 1.25 U de DNA polimerase *pfu*. Água livre de nucleasse (Promega) foi adicionada a um

volume final de 50 µL. Os ciclos foram: 95°C por 2 minutos; 95°C por 30 segundos; 72°C por 2 minutos e alongamento final a 72°C por 5 minutos.

Como descrito anteriormente, essa etapa de amplificação foi realizada no Brasil e, portanto, foi necessário o envio do material amplificado até a Áustria. O envio foi realizado seguindo todos os protocolos de envio de material genético preconizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Os *amplicons* foram pipetados em placas contendo 96 poços, o número exato de amostras a serem processadas, adicionados de dois micro tubos de 2 µL contendo o controle negativo (NTC). Para o envio, as placas foram seladas com fita seladora apropriada, acondicionadas em plástico-bolha e adicionadas de gelo seco, sendo enviadas por uma empresa privada (FedEX, Memphis, Tennessee, EUA).

Imediatamente à chegada dos *amplicons* no laboratório do instituto na Áustria (aproximadamente 4 dias), foi realizada uma quantificação utilizando Qubit 2.0 (Thermo Scientific). Após a quantificação, a purificação dos *amplicons* foi realizada utilizando o GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e novamente quantificadas no Qubit 2.0 (Thermo Scientific).

Os *amplicons* foram então enviados à uma *facility* (Microsynth, Balgach, Suíça), para a realização do *second-step* PCR, preparo das bibliotecas, sequenciamento de alto rendimento e pós-processamento, via plataforma Illumina® Miseq (Illumina, San Diego, California, EUA). As regiões hipervariáveis V3/4/5 do gene rRNA 16S foram amplificadas utilizando *primers* 5'-341F_CCTACGGGRSGCAGCAG (ZAKRZEWSKI et al., 2012) e 5'-909R_TTT CA-GYCTTGCGRCCGTAC (TAMAKI et al., 2011). As bibliotecas foram elaboradas pela ligação de sequências adaptadoras e *indexes* nos produtos de PCR purificados. O kit Nextera Preparation Kit (Illumina) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Os *amplicons* foram inseridos nos cartuchos Illumina MiSeq com cada sequência *paired-end* anexada

ao seu *index* correspondente. Após o sequenciamento, as sequências *paired-ends* correspondentes que formassem sobreposição entre si foram “costuradas” obtendo um tamanho aproximado de sequência de 298 bp.

4.8 – Processamento das *reads*

As sequências *paired-end* foram “demultiplexadas” em arquivos FASTQ e o fluxo de análises foi realizado utilizando Qiime v.1.9.1 (CAPORASO, et al., 2010). Sequências de baixa qualidade foram eliminadas usando um limite de $q > 19$ pela linha de comando `-phred_quality_threshold` e a checagem e filtragem de quimeras foi realizada usando o programa Usearch 6.1, por meio da comparação das sequências obtidas contra a base de dados de referência Gold (<http://drive5.com/uchime/gold/fa>). As sequências foram agrupadas em *operational taxonomic units* (OTU) com um limite mínimo de 97% de similaridade em relação a base de dados de referência SILVA SSU (PRUESSE, et al., 2007) e posteriormente alinhadas. OTUs com menos de 10 sequências por OTU foram excluídos do *dataset*, para prevenir viés nas análises de bioinformática. Para as medidas de diversidade α , foi utilizado a linha de comando `alpha_diversity.py` e as seguintes medidas de diversidade foram calculadas: número de OTUS por amostra, Shannon, Simpson e Chao1. Para a medida de diversidade β , uma matriz de distância UNIFRAC (LOZUPONE e KNIGHT, 2005) foi calculada usando medidas do tipo *ponderada* (que leva em conta a abundância e distância filogenética dos OTUS) e *unweighted* (que leva em conta apenas as distâncias filogenéticas dos OTUS). A visualização dos PCoA bidimensionais foi realizada por meio do programa Emperor (VAZQUEZ-BAEZA et al., 2013) e também pelo próprio QIIME (`--make_2d_plots.py -i unponderada_unifrac_pc.txt -m arquivo_metadados.txt -b 'tratamento'`).

4.9 – Visualização dos dados

Os arquivos originados do fluxograma de análise do QIIME foram processados utilizando o programa phyloseq v.1.20.0 (MCMURDIE e HOLMES, 2013), para a

produção dos histogramas utilizando o pacote ggplot2 v.2.2.1 no ambiente do phyloseq. Ambos os programas foram implementados no RStudio v.1.0.143 (RSTUDIO, 2015).

4.10 – Teste de variabilidade significativa entre os grupos

Uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar diferenças significativas entre a riqueza e a diversidade das amostras, utilizando o programa Graphpad Prism v.5.0 (Graphpad software, San Diego, California, EUA). A significância estatística entre as amostras foi realizada utilizando análise de variância permutacional (adonis), utilizando a distância de matrix UNIFRAC do tipo *não ponderada* como base de cálculo. Para verificar se houve variabilidade entre a interação amostra-metadado, um método de análise de distância baseada em redundância (db-RDA) foi aplicado, também utilizando *não ponderada* UNIFRAC como base de cálculo para análise de ordenação restrita. Ambas linhas de comando foram utilizadas via QIIME pelo comando `--compare_categories.py`.

4.11 – OTUs diferencialmente abundantes

A análise de OTUs diferencialmente abundantes foi realizada utilizando o pacote DeSeq2 v.1.16.1 (LOVE, HUBER e ANDERS, 2014), no ambiente do phyloseq. De acordo com McMurdie e Holmes (2014), nenhuma rarefação de espécies foi realizada para a análise de abundância diferencial. Apenas amostras com menos que 1.000 OTUS por *reads* na contagem total foram removidas. Então, a variância-média dependente de dados foi calculada e testada para abundância diferencial ($p < 0.05$), baseado num modelo de distribuição binomial negativo.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Visões gerais das comunidades bacterianas no leite, pingo, casca e interior dos queijos.

Um total de 4.821,455 sequências foram obtidas, resultando em 1.202 OTUS. A tabela 1 mostra o número total de OTUs por amostra. As amostras com baixas contagens foram eliminadas a partir de um limite mínimo de 3.066 sequências por amostra, obtendo um total de 91 amostras (n=91). Conforme a tabela 3, as amostras de queijo e casca referentes às fazendas A, C e D foram eliminadas.

Tabela 3. Número de sequências em relação à fazenda, origem e tempo de maturação

Fazenda	Origem	Tempo de maturação	Número de sequências
A	Leite	zero	13290.0
A	Pingo	zero	61523.0
A	Casca	1	12723.0
A	Interior	1	42576.0
A	Casca	7	414.0
A	Casca	7	37823.0
A	Interior	7	67938.0
A	Interior	14	1890.0
A	Casca	14	34546.0
A	Interior	21	68089.0
A	Interior	28	65605.0
A	Casca	28	85570.0
A	Interior	45	24866.0
A	Casca	45	38421.0
A	Casca	60	10779.0
A	Interior	60	31607.0
B	Leite	zero	22938.0
B	Pingo	zero	40323.0
B	Interior	1	28964.0
B	Casca	1	43496.0
B	Casca	7	45581.0
B	Interior	7	80522.0
B	Casca	14	44152.0
B	Interior	14	73935.0

B	Interior	21	62614.0
B	Casca	21	105655.0
B	Casca	28	79703.0
B	Interior	28	101316.0
B	Casca	45	71434.0
B	Interior	45	89380.0
B	Casca	60	24340.0
B	Interior	60	34274.0
C	Leite	zero	16116.0
C	Pingo	zero	72685.0
C	Casca	1	48538.0
C	Interior	1	127231.0
C	Casca	7	46058.0
C	Interior	7	46233.0
C	Casca	14	164.0
C	Chesse rind	14	20310.0
C	Interior	21	33477.0
C	Interior	28	1746.0
C	Casca	28	3066.0
C	Interior	45	11967.0
C	Casca	45	38216.0
C	Interior	60	9405.0
D	Leite	zero	5072.0
D	Pingo	zero	45328.0
D	Casca	1	59396.0
D	Interior	1	90042.0
D	Casca	7	6638.0
D	Interior	7	72839.0
D	Interior	14	34361.0
D	Interior	21	3417.0
D	Interior	21	66480.0
D	Casca	21	91365.0
D	Interior	28	46114.0
D	Casca	28	64437.0
D	Interior	45	56349.0
D	Casca	45	69276.0
D	Interior	60	1557.0
D	Casca	60	57122.0
D	Casca	14	47387.0
E	Leite	zero	14884.0
E	Pingo	zero	63000.0

E	Casca	1	47057.0
E	Casca	1	47485.0
E	Interior	1	69520.0
E	Interior	7	86267.0
E	Casca	7	94543.0
E	Interior	14	57586.0
E	Casca	21	42979.0
E	Casca	28	58753.0
E	Interior	28	90756.0
E	Casca	45	21374.0
E	Interior	60	31368.0
E	Casca	60	38575.0
E	Interior	21	69784.0
E	Interior	45	72870.0
F	Leite	zero	28702.0
F	Pingo	zero	42629.0
F	Interior	1	68972.0
F	Casca	1	81791.0
F	Interior	7	46088.0
F	Casca	7	209871.0
F	Interior	14	52598.0
F	Casca	14	70717.0
F	Interior	21	4885.0
F	Casca	21	90519.0
F	Casca	28	17107.0
F	Casca	45	47865.0
F	Interior	45	81997.0
F	Casca	60	39099.0
F	Interior	60	39858.0
F	Casca	60	47788.0
F	Interior	28	78465.0

Após a rarefação, um total de 1.009 OTUs foram associados a seis filos: *Firmicutes* (87%), *Proteobacteria* (7.5%), *Actinobacteria* (3.7%), *Bacteroidetes* (0.5%), *Deinococcus-Thermus* (0.15%) e *Acidobacteria* (0.15%). Conforme mostra a tabela 4, o número de OTUs observados foi significativamente maior ($p < 0.05$), uma vez que o dia 14 apresentou aumento significativo do número de OTUS em relação ao dia um.

Tabela 4. Análise estatística de riqueza de OTUs em relação ao período de maturação, fazenda e origem

Tempo de maturação									
	0	1	7	14	21	28	45	60	<i>p</i> -value
OTUs observados	70 ± 28 ^{a,b}	56.1 ± 18.67^a	76.73 ± 26.27 ^{a,b}	108.8 ± 40^b	87 ± 32.09 ^{a,b}	91.82 ± 46.61 ^{a,b}	98.73 ± 38.25 ^{a,b}	92.09 ± 29.07 ^{a,b}	<0.05*
Chao 1	158 ± 21	626 ± 41	290 ± 30	289 ± 33	310 ± 34	290 ± 29	167 ± 86	258 ± 136	NS
Shannon	221 ± 111	229 ± 128	251 ± 97	266 ± 139	248 ± 126	275 ± 90	257 ± 131	142 ± 126	NS
Simpson	0.54 ± 0.24	0.57 ± 0.32	0.68 ± 0.13	0.74 ± 0.14	0.61 ± 0.24	0.62 ± 0.16	0.65 ± 0.20	0.55 ± 0.21	NS
Fazenda									
	A	B	C	D	E	F	<i>p</i> -value		
OTUs observados	95.08 ± 39.63 ^{a,b}	74.5 ± 25^b	85.2 ± 37.85 ^{a,b}	74.3 ± 22.23 ^b	117.5 ± 45^a	79.9 ± 24.26 ^b	<0.05**		
Chao 1	120 ± 24	102 ± 22	155 ± 20	145 ± 58	175 ± 61	231 ± 12	NS		
Shannon	209 ± 110	215 ± 109	123 ± 103	304 ± 100	305 ± 113	247 ± 087	NS		
Simpson	0.55 ± 0.18 ^{a,b}	0.6 ± 0.21 ^{a,b}	0.45 ± 0.27^a	0.78 ± 0.23^b	0.73 ± 0.21^b	0.6 ± 0.22 ^{a,b}	<0.05**		
Origem									
	Leite	Pingo	Interior	Casca	<i>p</i> -value				
OTUs observados	84 ± 30	58 ± 17	81 ± 26	94 ± 43	NS				
Chao 1	123.89 ± 33.4	175.46 ± 27.4	169.729 ± 2.69	146.596 ± 2.39	NS				
Shannon	2.28 ± 1.33	2.18 ± 0.7	2.33 ± 1.18	2.36 ± 1.32	NS				
Simpson	0.64 ± 0.21	0.48	0.62 ± 0.21	0.64 ± 0.20	NS				

* Os contrastes de tempo de maturação foram testados entre todos os grupos e as diferenças não significativas foram marcadas com as mesmas letras

** Os contrastes da fazenda foram testados entre todos os grupos e as diferenças não significativas foram marcadas com as mesmas letras

O número total de OTUs observados foi significativamente maior nas fazendas B, E e F quando comparadas com a fazenda E ($p < 0.05$). De acordo com o índice de diversidade de Simpson, as fazendas D e E apresentaram maior diversidade ($p < 0.05$) quando comparadas à fazenda C. Não foram observadas diferenças significativas de riqueza estimada para os índices de Chao1 e Shannon. Esses dados demonstram que a variabilidade dentro de cada amostra não foi significativa, o que pode ser justificado pela baixa abundância de OTUs raros. A figura 4.A mostra uma visão holística da

dinâmica populacional bacteriana ao longo dos períodos de maturação em relação à origem. Observa-se que houve diferença significativa em relação aos tratamentos (adonis: R^2 : 0.05, $p < 0.001$), para os níveis taxonômicos de família e de gênero, apesar da baixa correlação. A figura 3.C indica que os fatores associados aos períodos de maturação entre 45 e 60 dias foram linearmente mais significativos em relação aos

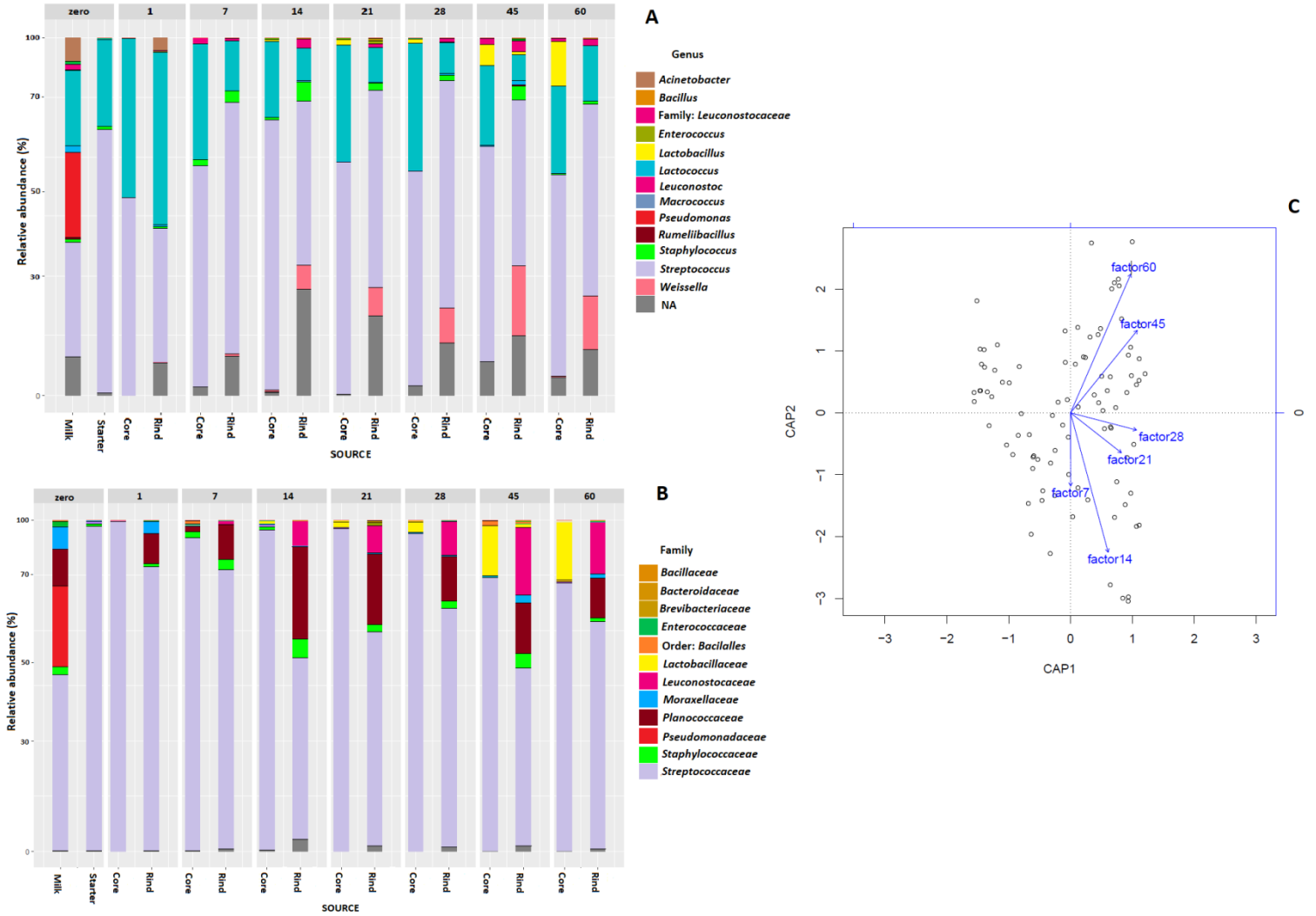


Figura 4. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) ao longo do período de maturação.

A - Abundância relativa (%) da população microbiana do leite, pingo e queijos (casca e interior) do 1º ao 60º dia de maturação em nível do gênero. Box cinza horizontais de zero a 60 representam o tempo de maturação, respectivamente (adonis: R^2 : 0,05, $p < 0,001$).

B - Abundância relativa (%) da população microbiana do leite, pingo e queijos (casca e interior) do 1º ao 60º dia de maturação em nível de família. Box cinza horizontais de zero a 60 representam o tempo de maturação, respectivamente (adonis: R^2 : 0,05, $p < 0,001$).

C - Análise de redundância baseada em distância para fator de maturação (db-RDA: $p < 0,001$, pseudo-f 1,932). Cada fator representa um tempo de maturação

outros períodos de maturação. De fato, há perceptível aumento da abundância relativa das famílias *Leuconostocaceae* e *Lactobacillaceae*, especialmente à partir do 14º dia em diante. Essas duas famílias englobam potencialmente microrganismos iniciadores da fermentação (SLAB) e não iniciadores (NSLAB). Dessas, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* são os microrganismos mais amplamente utilizados como fermentos e possuem grande importância econômica (SAVIJOKI et al., 2006). De acordo com Pasquale et al., (2016) e Savijoki et al., (2006), associando a grande prevalência de OTUS de *Lactococcus* e *Streptococcus/Streptococcaceae* ao longo do período de maturação, é possível que esse grupo microbiano esteja exercendo uma chamada proteólise secundária, fornecendo uma maior concentração de aminoácidos essenciais para o crescimento das NSLAB. Isso se deve ao fato de que as SLAB possuem em sua estrutura uma caseinase associada à membrana, o que facilita a quebra da caseína em peptídeos e aminoácidos que por ventura possam ser aproveitados pelas NSLAB. A presença de *Streptococcus thermophilus* no leite, pingo e queijos frescos é de extrema importância, além de ser justificada pelo fato de que linhagens específicas como a LMG 18311 apresentam baixos requerimentos de aminoácidos, possuindo a habilidade de produzir uma gama de compostos voláteis derivados de aminoácidos, em virtude de seu maquinário metabólico apresentar aminoácidos biosintetizados e enzimas conversoras de aminoácidos. *Lactococcus lactis* é capaz de produzir mais de 100 oligopeptídeos diferentes, em virtude da presença da proteinase chamada PrtP (STEELE, 2012). É possível que em períodos mais longos de maturação, a população relativa de *Lactococcus* e *Streptococcus/Streptococcaceae* diminua gradativamente, ao passo que a população de outras famílias associadas às fermentações tardias pudesse aumentar significativamente. No presente estudo, contudo, não é possível confirmar tal fato, embora as evidências, principalmente no 45º e 60º dia de maturação apontem para esse acontecimento. De acordo com Gatti et al. (2014), A relação entre SLAB e NSLAB é modulada pelo tipo de cultura adicionada ao queijo leite, as condições de produção de queijos e a duração da maturação do queijo. Entretanto, o longo período de maturação não é uma característica comumente observada nos QMA tradicionais, embora atualmente novas variedades desses queijos estejam surgindo, associando longos períodos de maturação e a afinação, realizada por queijeiros profissionais, em cavernas

ou ambientes geograficamente e estruturalmente distintos daqueles encontrados nas queijarias das propriedades rurais. Esses fatores reforçam a ideia da atual legislação de que é necessário o estabelecimento de regulamentos específicos para cada tipo de queijo oriundo do QMA tradicional, tanto pela mudança nos aspectos físicos, quanto pela mudança nos aspectos sensoriais, fortemente influenciados pelas dinâmicas populacionais bacterianas como observado nesse estudo.

As figuras 5.A e 5.B mostram a abundância relativa de amostras de leite, pingo, queijos (casca e interior) em relação às fazendas em nível de gênero e família, respectivamente. (11%), *Weissella* (8%) e *Lactobacillus* (6%) estavam entre os OTUs mais prevalentes em todas as amostras, ao passo que *Pseudomonas* (2%) foi mais abundante nas amostras de leite. Resultados semelhantes foram descritos por Arcuri e colaboradores (2013), que encontraram *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) e *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) como sendo os microrganismos predominantes em queijos Minas artesanal coletados nas regiões do Serro, Cerrado, Serra da Canastra e Araxá, via análise DGGE. Lacerda e colaboradores (2011) também isolaram e caracterizaram *L. lactis* e *S. salivarius* como os microrganismos predominantes em queijos ao 7º e ao 60º dia de maturação, respectivamente. Castro e colaboradores (2016) isolaram e identificaram bactérias de queijos Minas artesanal da região de Campo das Vertentes e encontraram uma ampla predominância de *Enterococcus* spp. nos produtos. As espécies de *Lactobacillus* foram mais frequentes em detecção por *length-heterogeneity* PCR em queijos da região da Serra do Salitre, conforme descrito por Perin e colaboradores (2017).

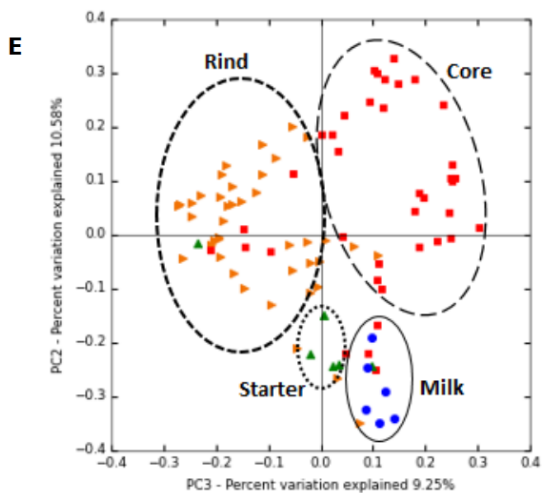
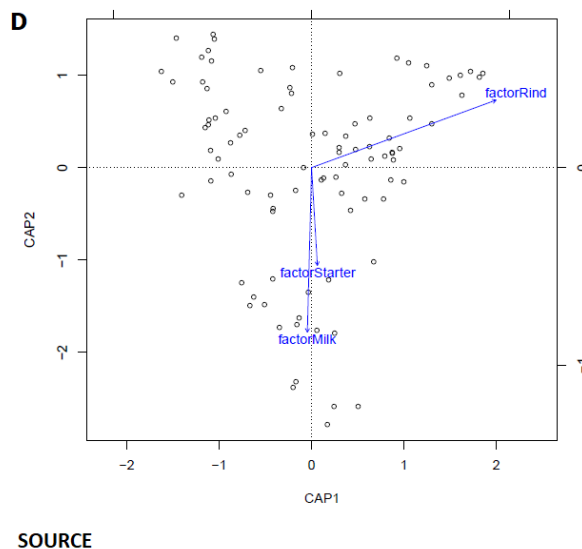
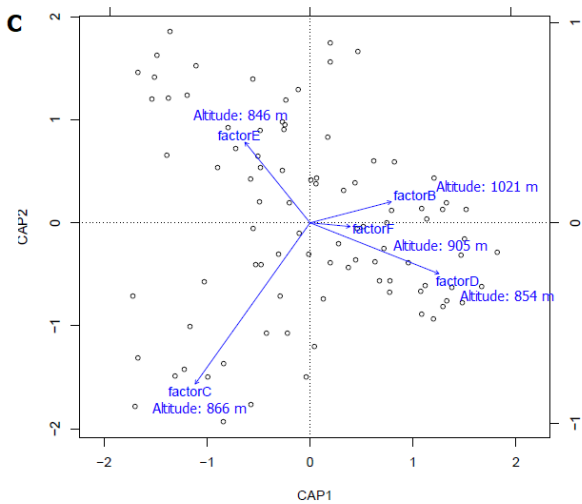
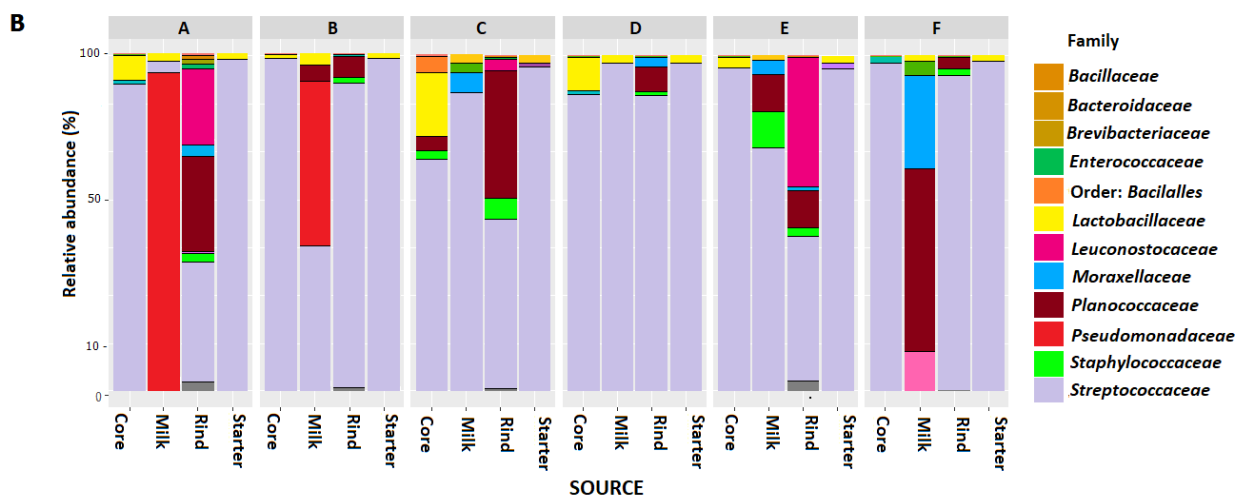
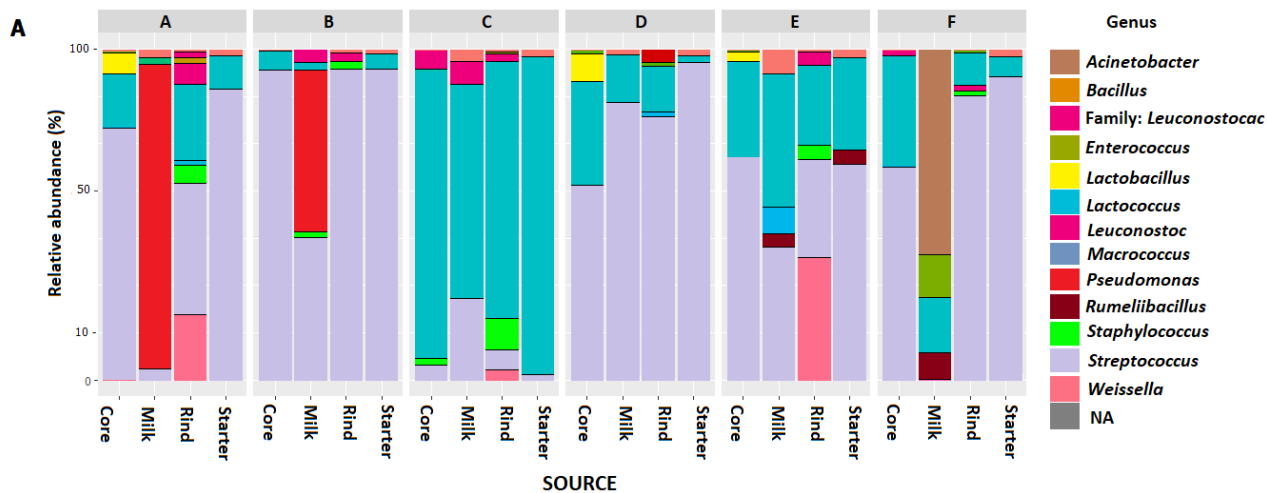


Figura 5. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação às fazendas.

A - Abundância relativa (%) da população microbiana do leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação às fazendas, em nível do gênero. Box cinza horizontais de A a F representam as fazendas, respectivamente (adonis: R^2 : 0.17, $p < 0,001$).

B - Abundância relativa (%) da população microbiana do leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação às fazendas, em nível de família. Box cinza horizontais de A a F representam as fazendas, respectivamente (adonis: R^2 : 0.12, $p < 0,001$).

C - Análise de redundância baseada em distância para fator fazenda (db-RDA: $p < 0,001$, pseudo-f 3.57). Cada fator representa uma fazenda

D - Análise de redundância baseada em distância para fator origem (db-RDA: $p < 0,001$, pseudo-f 3.98). Cada fator representa uma origem

E- Análise de coordenada principal bidimensional (2D - PcoA) de matriz de distância não ponderada UNIFRAC de leite (círculos azuis), pingo (triângulos verdes), casca e interior (quadrados vermelhos e triângulos laranjas, respectivamente), representados por linhas circulares diferentes

5.2 – Comunidades bacterianas no leite

As amostras de leite mostraram alta abundância relativa de OTUs de *Pseudomonas* e *Streptococcus*, seguido por OTUs classificados como *Lactococcus* e *Acinetobacter*. *Streptococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Staphylococcaceae* e *Planococcaceae* estavam entre as famílias mais abundantes. As diferenças entre as fazendas foram observadas em níveis de gênero e família, ao passo que as fazendas A e B foram aquelas com maior abundância relativa de OTUs de *Pseudomonas* e *Pseudomonadaceae*. As fazendas C e D mostraram maior abundância relativa de OTUs de *Streptococcus* e *Lactococcus* e OTUs de *Streptococcaceae*, enquanto a fazenda E apresentou maior abundância relativa de OTUs de *Streptococcaceae* e *Staphylococcaceae*. A fazenda F apresentou maior abundância relativa de OTUs de *Acinetobacter*, *Enterococcus* e da família *Moraxellaceae*. Esses resultados estão de acordo com Desmaures e Gueguén (2007); Michel e colaboradores (2001) que encontraram alta variabilidade entre fazendas. No presente estudo, essa variabilidade entre as fazendas se deve possivelmente às diferentes práticas de ordenha realizadas pelos produtores como limpeza de tetos, limpeza da ordenhadeira e da linha de ordenha, fontes indiretas como alimentação do gado, manejo de descarte de resíduos, água potável e água de lavagem, currais e sala de ordenha; superfícies externas como prateleiras, prateleiras, paredes e pisos (MONTEL et al., 2014; QUIJADA, et al., 2018). De acordo com Gobbetii (2018) e Frétin (2018), após a ordenha as primeiras contaminações microbianas são via o canal e a superfície do teto. A pele do teto é uma grande fonte de contaminação microbiana para o leite, sendo responsável por inocular *Staphylococcus*, corineformes, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* e *Pseudomonas*.

5.3 – Comunidades bacterianas no pingo

Em relação ao pingo, a grande maioria dos OTUs foram compostos de *Streptococcus* e *Lactococcus*, com uma grande dominância da família *Streptococcaceae*, endossando a ideia de que o pingo deve contribuir imensamente para a maior abundância de OTUs de *Streptococcus* no ambiente do queijo, ao passo que o leite pode introduzir outros microrganismos como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Brevibacterium* e também da família *Planococcaceae* (fig. 4A, 3B, 5A, 5B). De acordo com Irlinger e colaboradores (2015), *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. Lactis* ssp. *cremoris* são os maiores constituintes de SLAB mesofílicas em culturas iniciadoras, amplamente utilizadas na produção de queijos e frequentemente combinadas com o gênero *Streptococcus*. Até o presente momento, esse é o primeiro estudo descrevendo uma forte associação entre culturas iniciadoras naturais e a família *Streptococcaceae*. Esse fato aponta no sentido da importância das tradições na produção do QMA serem mantidas, uma vez que leite e pingo podem contribuir com uma microbiota endógena única para esses queijos (MONTEL et al., 2014). No presente estudo, todas as amostras de pingo apresentaram resultados muito similares em relação à abundância relativa, como observado nas figuras 4A, 4B, 5A e 5B. A maioria dos OTUs associados à *Streptococcaceae* e *Lactococcus* não apresentaram diferença significativa em relação à variabilidade entre fazendas. De acordo com Gatti e colaboradores (2014), temperatura de cozimento da massa, a manutenção de um gradiente de temperatura durante a fermentação do soro e o aumento da acidez pode levar à seleção de uma microbiota característica, consistindo principalmente de microrganismos termofílicos, acidúricos e BAL moderadamente resistentes ao calor. O pingo é coletado no ato da prensa do queijo à forma, e armazenado sob temperatura ambiente de um dia para o outro, devendo ser esse um dos principais fatores associados à predominância desses microrganismos nos pingos da região da Serra do Salitre. Outros estudos são necessários para estabelecer uma comparação entre a microbiota do pingo da Serra do Salitre em relação às demais regiões, de forma a verificar quais seriam outros fatores intrínsecos ou extrínsecos responsáveis por direcionar a mudança microbiana dos pingos.

5.4 – Comunidades bacterianas no interior dos queijos

A microbiota do interior dos queijos foi principalmente composta de OTUs de *Streptococcaceae* e *Lactobacillaceae* em todas as fazendas. O gênero mais abundante foi *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*. De Pasquale e colaboradores (2016) ao avaliarem a distribuição espacial da microbiota em queijos Fiori Sardo, Pecorino Romano e Pecorino Siciliano encontraram grande prevalência dessas famílias nos queijos Fiori Sardo. A fazenda C mostrou maior abundância relativa de OTUs de *Lactococcus* em comparação com as outras fazendas. Curiosamente, nenhum OTU associado à família *Pseudomonadaceae* e/ou *Pseudomonas* foram detectados nos queijos das fazendas A e B. Durante a produção do queijo, as principais mudanças na composição microbiana ocorrem durante a acidificação da massa e na maturação, que é endossado pela detecção de OTUs de *Lactobacillus* no interior desses queijos. (O’SULLIVAN, *et al.*, 2014; OGIER *et al.*, 2004). De Pasquale e colaboradores (2016) também descrevem que a presença de proteólises secundárias estão mais associada a regiões distintas do queijo, mais próximas à casca. No presente estudo é possível supor que o interior dos queijos possui perfil de fermentação diferenciado, sendo afetado tanto pela prevalência de *Streptococcus* quanto do aumento na abundância relativa de *Lactobacillaceae* a partir do 28º dia de maturação. Em virtude das mudanças físico-químicas, a pressão seletiva na microbiota é intensa, conseqüentemente favorecendo espécies microbianas que são especificamente adaptadas às condições do ambiente (IRLINGER e MOURNIER, 2009; GOERGES *et al.*, 2008), e possivelmente influenciados pelo “Efeito Jameson” – um termo usado para descrever o fato de que uma população, outrora de rápido crescimento, apresenta decréscimo extremamente rápido após um curto período de crescimento por causa da limitação em alguns nutrientes ou competição com populações de microrganismos específicos (JAMESON, 1962). De acordo com esse estudo, Luiz e colaboradores (2016) isolaram e identificaram microrganismos da região de Araxá ao longo do período de maturação (de 1 a 57 dias) no período seco e chuvoso e encontraram que *Lactococcus* apresenta crescimento considerável no início do processo de maturação, enquanto as espécies de *Lactobacillus* tendem a estabelecer lenta dominância no ambiente do queijo. Bouton e colaboradores (2009) descreveram que no interior de queijos maturados, compostos

voláteis associados ao *flavor* do queijo são afetados somente por *Lactobacilli*. Mais estudos são necessários para verificar a influência e o impacto da prevalência da família *Streptococcaceae* e do crescimento ao longo do período de maturação da família *Lactobacillaceae* nos perfis metabólicos e sensoriais desses queijos.

5.5 – Comunidades bacterianas na casca dos queijos

As amostras de casca mostraram diferenças lineares quando comparadas com outras fontes. Ainda, OTUs de *Streptococcus* foram dominantes dentre todas as fazendas, seguidos por OTUs de *Lactococcus*. A fazenda A mostrou uma maior abundância relativa de OTUs de *Brevibacterium*, *Staphylococcus* e *Weissella*, enquanto OTUs pertencentes à família *Moraxellaceae* foram mais presentes na fazenda D. A fazenda E mostrou maior abundância relativa de OTUs de *Weissella*, enquanto os OTUs de *Leuconostoc* foram mais abundantes na casca dos queijos da fazenda F. Os mais prevalentes OTUs nas cascas dos queijos foram classificados como *Streptococcaceae*, *Planococcaceae* e *Staphylococcaceae*. Ecossistemas do queijo podem estar associados à presença de microrganismos singulares, levando assim a uma interação microbiana única entre as comunidades, podendo favorecer no desenvolvimento de *flavors*, e contribuindo para uma “assinatura do queijo”. Ademais, essas interações microbianas são mais frequentemente relacionadas às cascas dos queijos e as suas interações com as intervenções humanas no processo (CHEESEMAN et al., 2014; PASSERINI et al., 2010). Assinaturas específicas dos queijos podem ser afetadas por uma grande diversidade de amostras na casca, relativas mais à presença de um grupo de microrganismos diferentes do que espécies individuais. Isso pode explicar o motivo de *Staphylococcus* ser um gênero comumente associado aos QMA, principalmente pela manipulação diária das rodas de queijo, seja para realizar a viragem ou a salga (CASTRO et al., 2016), além do fato de que o uso do leite cru permite uma grande inoculação desse gênero no queijo, já que esse microrganismo é um dos principais causadores de mastites subclínicas em vacas. Muitos filotipos são comuns a uma grande variedade de queijos, mas apresentam variedade na abundância relativa e dos níveis de complexidade dentro da comunidade microbiana. A microbiota da casca dos queijos é caracterizada por serem muito complexas, abrigando Filos como *Firmicutes* (*Lactobacillus* ssp., *Lactococcus* ssp., *Enterococcus* ssp., *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus equorum, *Staphylococcus sciuri*), *Actinobacteria* (*Arthrobacter* spp., *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium jeotgali*, *Corynebacterium variabile*), *Proteobacteria* (*Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Halomonas* spp., *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas formosensis*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Proteus* spp.), *Bacteroidetes* (*Sphingobacterium lactis*), yeasts (*Candida* spp., *Debaromyces* spp., *Geotrichum* spp.) and moulds (*Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Scopulariopsis* spp.) (IRLINGER et al., 2015; SCHORNSTEINER et al., 2014). A família *Planococcaceae* foi prevalente em todas as amostras da casca e em todas as fazendas, podendo ser considerada específica destes queijos e indicar que essa família pode desempenhar um papel significativo no processo de maturação, embora estudos que abordem o papel dessa família em alimentos sejam escassos. De acordo com Wang e colaboradores (2015), supõe-se que a família *Planococcaceae* possa afetar a qualidade e o *flavor* de bebidas fermentadas por produzir compostos metabólicos secundários, o que também pode estar ocorrendo nos queijos. Curiosamente, a espécie *Rummelliibacillus*, um membro da família *Planococcaceae*, foi previamente isolado dos solos da região do Cerrado, onde também se localiza a região da Serra do Salitre (que outrora fazia parte da região do Alto Paranaíba, agora chamada Cerrado). (COBA et al., 2012). Até o presente momento, esse é o primeiro estudo descrevendo a prevalência dessa família associada às cascas dos queijos. De acordo com esse estudo, Wolfe e colaboradores (2014) descreveram o gênero *Jeotgalibacillus*, um membro da família *Planococcaceae*, como sendo uma população sub-dominante em cascas de queijos europeus. O papel da *Weissella* e da família *Leuconostocaceae* ainda não foram elucidados de forma clara quando associados aos queijos (CHOMBOMORALES et al., 2016; FUKA et al., 2013; MASOUD et al., 2012). De acordo com McSweeney e Sousa (1999) *Leuconostoc* spp. são utilizados como fermentos secundários em queijos do tipo holandês, adicionados com a intenção de favorecer uma produção primária de diacetil e CO₂ nos queijos. Esobar-Zepeda e colaboradores (2016) descreveram que a presença desses microrganismos pode revelar uma autêntica assinatura no queijo Cotija. Litoupoulou-Tzanetaki e Tzanetakis (2014) isolaram ambos os gêneros de uma queijaria grega, enquanto Settani e colaboradores (2012) e Masoud e colaboradores (2012) descreveram a presença desses microrganismos em superfícies de madeira nos contêineres utilizados para produção de queijo e também em leite cru. A

presença das famílias *Planococcaceae* e *Leuconostocaceae* na casca sugere que o QMA é fortemente influenciado pelo ambiente (manipulação das rodas de queijo, prateleiras de maturação, salas de maturação), destacando o conceito de localização geográfica e microbiota regional, uma vez que muitos microrganismos estão presentes nas cascas dos queijos também estão presentes no ambiente de origem (QUIJADA et al., 2018; ENGEL et al., 2010; VERDIER-METZ et al., 2012). Bokulich e Mills (2013), Georg e colaboradores (2008) e Mounier e colaboradores (2005) também descreveram que os ambientes de processamento formam nichos funcionais distintos, selecionando espécies com melhor desempenho naquele ambiente em detrimento às espécies oriundas da inoculação.

As figuras 5C e 5D mostram a db-RDA entre as fazendas (db-RDA: $p < 0.001$, pseudo-f 3.57/ adonis: $R^2: 0.17$, $p < 0.001$) e origem (db-RDA: $p < 0.001$, pseudo-f 3.98/ adonis $R^2: 0.12$, $p < 0.001$), indicando que esses fatores contribuem para a variabilidade entre diversidade microbiana. Curiosamente, as fazendas E (altitude de 846 m) e C (altitude de 866 m) foram mais discriminantes em contraste com outros valores de altitude, tendo ambas apresentando maior diversidade em nível de gênero e família, o que pode indicar uma interação entre a altitude e outros fatores bióticos como o pasto, a alimentação, a composição da raça, qualidade da água, etc. A figura 4E mostra uma análise coordenada principal (PcoA) de uma matriz de distância não ponderada UNIFRAC de amostras de leite, pingo, interior e casca, indicando que a filogenia é dependente da origem. De Filippis e colaboradores (2016), detectaram diferenças na expressão gênica dentro de amostras microbianas de casca e interior de queijos, o que pode justificar essa separação filogenética. De Pasquale e colaboradores (2016) também identificaram perfis metabólicos diferenciados em amostras do interior do queijo e amostras da região limite entre interior e casca, principalmente de níveis de proteólise e de síntese de compostos voláteis. De acordo com os resultados desse trabalho, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar que esses processos também estejam ocorrendo no QMA da região da Serra do Salitre. Wolfe e colaboradores (2014) mostraram que a divergência na composição da comunidade é melhor explicada pelo tipo da casca (lavada, mofada ou natural) do que pelo país de origem do produto, tratamento do leite ou origem do leite, sendo esses fatores fracamente associados com alterações na comunidade. No

presente estudo, apesar dos baixos valores de correlação, fazenda e origem são fatores discriminantes para a diversidade bacteriana.

5.6 – Fatores abióticos desempenham papel relevante na dinâmica populacional bacteriana

A figura 7.A e a tabela 5 mostram a diversidade bacteriana relativa a abundância em nível de família das espécies ao longo do período de maturação correlacionado com a acidez (em °D) do leite, pingo, casca e interior dos queijos, bem como da umidade para cada amostra, dada em porcentagem

Tabela 5. Valores de umidade (%) e acidez titulável (°D) para as amostras de leite, pingo e queijos (interior e casca)

Origem	Período de maturação	Fazenda	Umidade (%)	Acidez (°D)
Leite	zero	A	87,3	0,15
		B	86,9	0,16
		C	88,1	0,14
		D	87,6	0,18
		E	86,9	0,17
		F	87,9	0,15
Pingo	zero	A	92,3	0,45
		B	95	0,6
		C	93,7	0,57
		D	90	0,71
		E	91,2	0,5
		F	93,3	0,78
Queijo (casca e interior)	1	A	55,33	0,17
		B	54,55	0,14
		C	49,44	0,11
		D	57,31	0,11
		E	48,48	0,27
		F	49,22	0,21
Queijo (casca e interior)	7	A	43,4	0,19
		B	39,89	0,17
		C	29,71	0,34
		D	36,08	0,26
		E	41,83	0,18
		F	30,75	0,23
Queijo (casca e interior)	14	A	39,65	0,27
		B	34,84	0,31
		C	31,16	0,4
		D	35,18	0,41
		E	38,79	0,42
		F	32,28	0,42

Queijo (casca e interior)	21	A	31,88	0,4
		B	28,65	0,53
		C	26,94	0,51
		D	32,38	0,55
		E	31,87	0,6
		F	31,75	0,4
Queijo (casca e interior)	28	A	28,38	0,45
		B	24,21	0,59
		C	22,6	0,87
		C	22,6	0,87
		D	26,22	0,62
		E	28,42	0,63
Queijo (casca e interior)	45	A	29,45	0,45
		B	27,75	0,59
		C	18,45	0,87
		D	25,42	0,62
		E	23,37	0,63
		F	29	0,72
Queijo (casca e interior)	60	A	21,16	0,53
		B	19,54	0,58
		C	17,37	0,68
		D	19,82	0,64
		E	21,97	0,65
		F	26,04	0,36

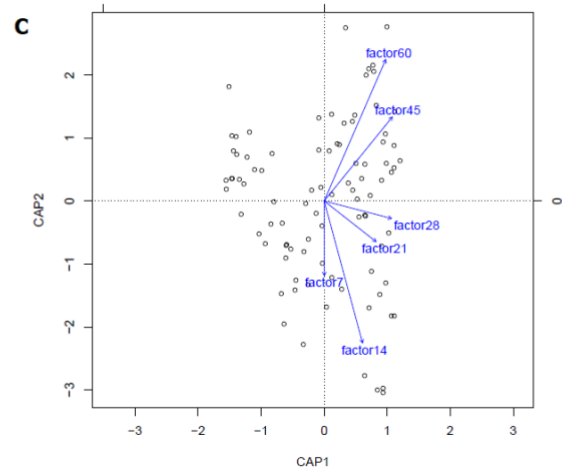
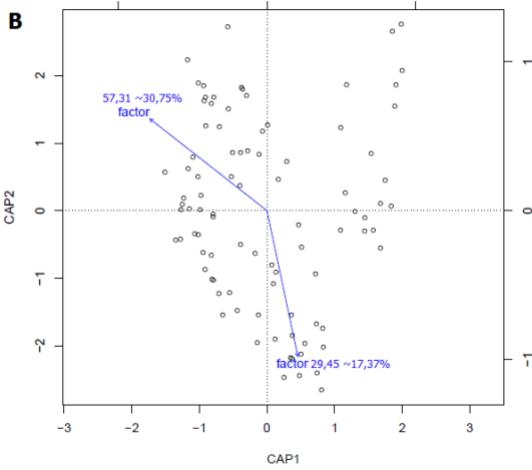
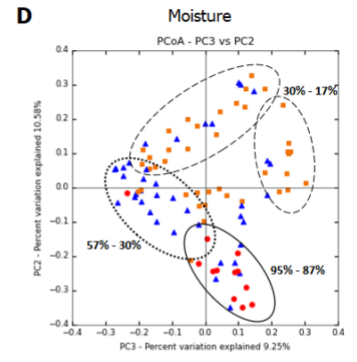
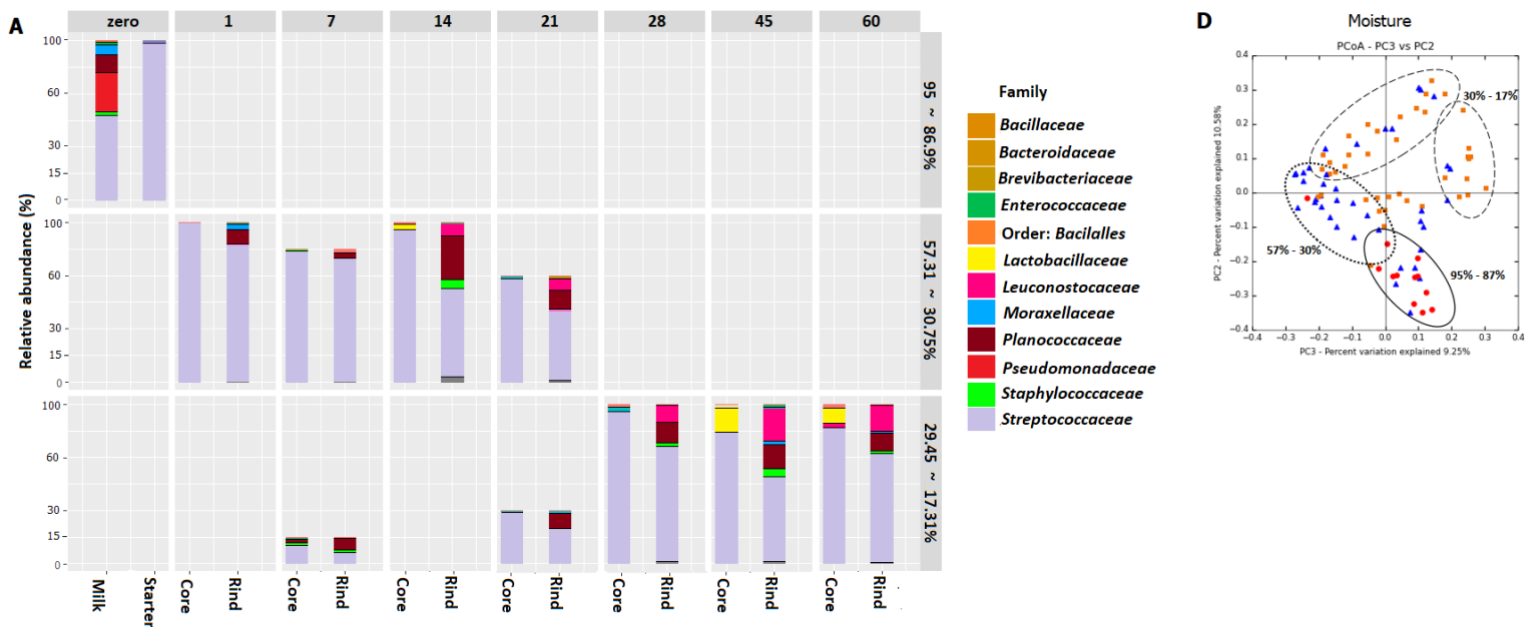


Figura 6. Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação às fazendas.

A - Abundância relativa (%) da população microbiana do leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação ao % de umidade, em nível de família. Box cinza horizontais de 1 a 60 representam os períodos de maturação e os box verticais representam os intervalos de umidade, em %, respectivamente (adonis $R^2 = 0.65$, $p < 0.01$).

B- Análise de redundância baseada em distância para fator umidade (db-RDA: $p < 0,001$, pseudo-f 3.42). Cada fator representa um valor de umidade (em intervalos, dados em %)

C - Análise de redundância baseada em distância para fator maturação (db-RDA: $p < 0,001$, pseudo-f 1.93). Cada fator representa um período de maturação

D- Coordenadas Principais (2D-PCoA) de matrizes UNIFRAC não ponderadas de diferentes porcentagens de umidade, representadas por diferentes linhas de círculos. Quadrados alaranjados representam um teor de umidade de 17 a 30%; triângulos azuis representam 30 a 57% de umidade e círculos vermelhos representam 87 a 95% de umidade

A família *Planococcaceae* foi prevalente ao longo de todo o período de maturação e não foi afetada pela umidade, o que suporta a suposição anterior de que essa família é de fato prevalente no ambiente e consequentemente associada à casca do queijo. As famílias *Leuconostocaceae* e *Lactobacillaceae* mostraram aumento na abundância relativa em valores de baixa umidade ao longo do período de maturação, sendo explicado pela sua natureza NSLAB (GOBBETTI et al., 2018 e WOUTERS et al., 2002). Wolfe e colaboradores (2014) relataram que a umidade é o melhor direcionador da dinâmica populacional, sendo significativamente associado ao gradiente de umidade aferido nas cascas de queijos lavados, naturais e mofados. No presente estudo, o teor de umidade de todas as origens foi aferido ao longo do período de maturação, sendo as comunidades microbianas moderadamente correlacionadas com esse fator (adônis $R^2 = 0.65$, $p < 0.01$). PCoA (fig. 5D) mostra agrupamentos específicos de comunidades microbianas, bem como uma relação linear entre umidade (fig. 5B) (db-RDA $p < 0.01$, pseudo-F: 3.42). O período de maturação também apresentou relação linear para esse modelo ($p < 0.01$, pseudo-F: 1.93), (fig. 5C), com os fatores 45° dia e 60° dia de maturação sendo mais discriminantes quando comparados aos outros períodos de maturação. Em virtude da baixa atividade de água e maior concentração de O_2 , um ambiente adverso é estabelecido nas superfícies desses queijos, atrasando o crescimento de NSLAB até períodos posteriores (DE FILIPPIS et al., 2016). No presente estudo, esses fatores abióticos são distintos pelo aumento da abundância relativa das famílias *Leuconostocaceae* e *Lactobacillaceae*.

A figura 6.A e a tabela 6 mostram a diversidade e a abundância relativa em nível de família das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) ao longo do período de maturação, em relação aos valores de acidez titulável para cada amostra, fornecidos em Dornic. Como esperado em menor teor de acidez, as famílias *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* e *Streptococcaceae* foram mais abundantes quando comparadas a um maior teor de acidez (BACHMAN e SPAHR, 1995). Isso pode ser explicado pelo fato de que os membros da família *Streptococcaceae* estão agindo como SLAB e também pela interação dos membros dessa família com o gênero *Lactococcus* (DE FILIPPIS, et al., 2014; ERCOLINI et al., 2008; FOX et al., 2004). Os resultados mostram que a acidez foi moderadamente correlacionada (adônis $R^2 = 0.43$, $p < 0.01$) e linearmente

significante (dr-RDA $p < 0.01$, pseudo-F: 3.00) com a mudança na comunidade microbiana (figura 7.B). O gráfico PCoA (figura 7.C) mostra agrupamentos distintos de origem e acidez, possivelmente pelo estabelecimento de interações microbianas relacionadas com os processos fermentativos, uma vez que a família *Streptococcaceae* associada ao leite consiste de diferentes OTUs quando comparada com aquelas encontradas no pingo, que naturalmente apresenta maior acidez que o leite, em virtude do processo de fermentação natural desse produto. A família *Planococcaceae* foi surpreendentemente prevalente em ambos os valores de acidez (0.17 a 0.31 e 0.45 a 0.78), indicando que essas bactérias são resistentes às variações de pH e desempenham papel relevante em ambos os cenários, provavelmente estabelecendo fortes interações com a família *Leuconostocaceae* na superfície desses queijos, levando a uma separação natural dos filotipos. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar essa hipótese. No presente estudo, o pH de todas as origens foi medido e também mostrou correlação moderada com as mudanças nas populações microbianas ao longo do período de maturação (adônis $R^2 = 0.43$, $p < 0.001$), apresentando resultados deveras semelhantes àqueles apresentados pela acidez titulável. De acordo com Sadler e Murphy (2010), a acidez titulável não é relacionada ao pH pelo fato de que a detecção de acidez é baseada somente na concentração total de ácido láctico em uma amostra, ao passo que o pH é uma função combinada de acidez titulável e bases conjugadas, suportando a ideia de que NSLAB estão de fato contribuindo para a redução do pH do meio pelo metabolismo da via do ácido láctico.

A temperatura média da região também influenciou as mudanças na população microbiana ao longo do período de maturação, como observado na figura 7.A, enquanto as famílias *Leuconostocaceae* e *Lactobacillaceae* atingiram maiores valores de abundância relativa a uma temperatura média de 23°C (adônis $R^2: 0.04$, $p < 0.001$). No presente estudo, o aferimento regular da temperatura diária não foi possível em virtude do fato de que alguns produtores tiveram dificuldade em manipular o termostato dado a eles. Os dados de temperatura média foram adquiridos de uma estação meteorológica próximo de todas as fazendas. Apesar do fato desses valores serem apenas uma média estimada, pode-se assumir que a temperatura média influencia e direciona as mudanças na população microbiana especialmente em temperaturas acima de 22°C.

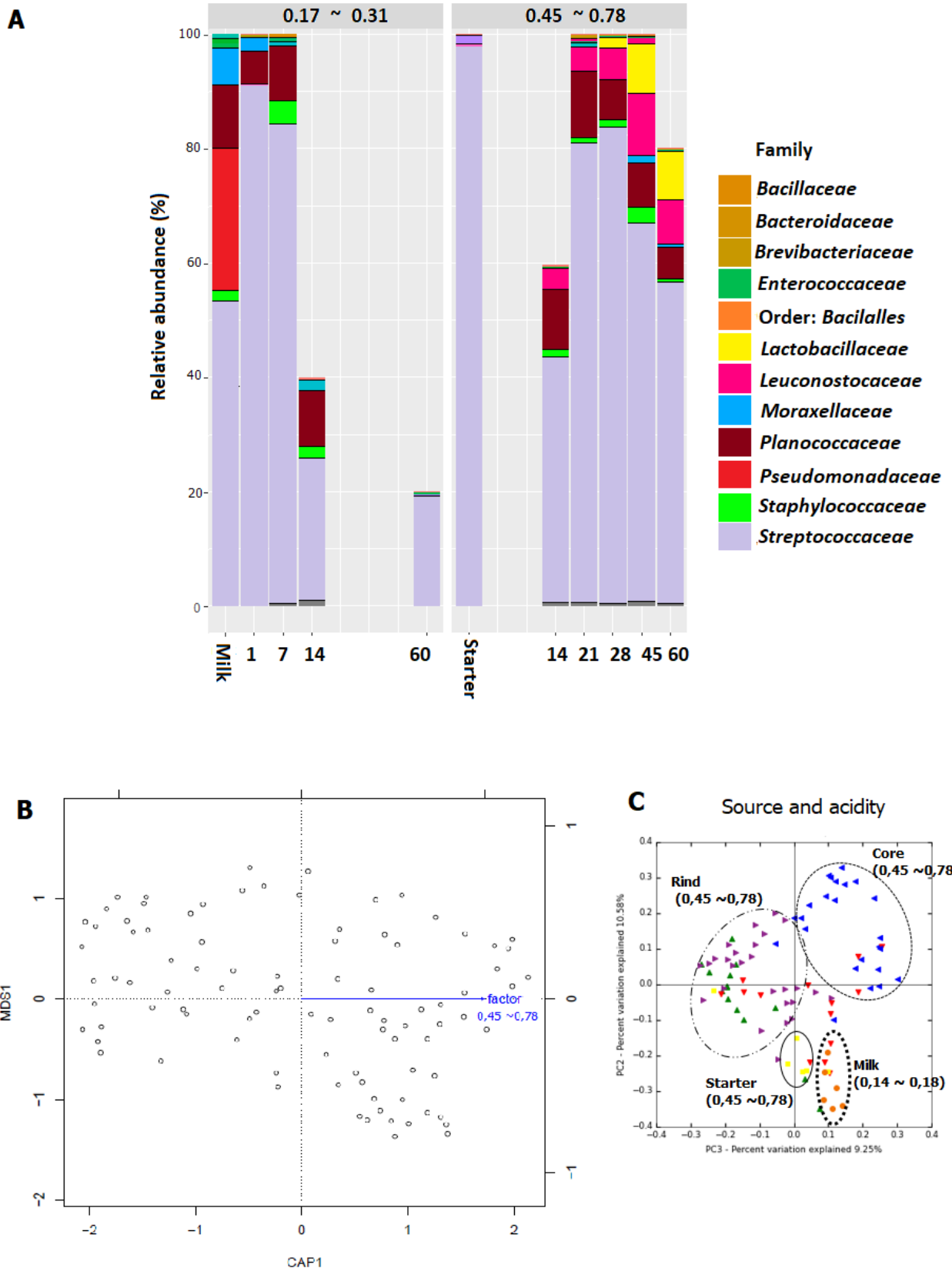


Figura 7 - Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação ao teor de acidez
 A - Abundância relativa (%) da população microbiana do leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação ao teor de acidez, em nível de família. Box cinza horizontais representam os intervalos de acidez, em °D, respectivamente (adonis $R^2 = 0.43$, $p < 0.01$).

B- Análise de redundância baseada em distância para fator umidade (db-RDA: $p < 0,001$, pseudo-f 3.42). Cada fator representa um valor de umidade (em intervalos, dados em %)

C - Coordenadas Principais (2D-PCoA) das matrizes não ponderadas UNIFRAC a partir de intervalos combinados de fonte e acidez, representados por diferentes linhas circulares. Círculos laranja representam valores de acidez do leite de 0.14 a 0.18 °D; os quadrados amarelos representam valores de acidez do pingo de 0.45 a 0.78 °D; triângulos roxos representam valores de acidez da casca de 0,45 a 0,78 °D e triângulos azuis representam valores de acidez do interior de 0,45 a 0,78 °D.

A figura 8.B mostra os fatores 22°C e 23°C sendo linearmente diferentes (db-RDA $p < 0.001$, pseudo-F: 2.09). Esse fato também endossa a importância da localização geográfica, pois as amostras desse estudo foram coletadas no período seco e a média de temperatura é notoriamente maior que a temperatura média observada em outras regiões produtoras de QMA.

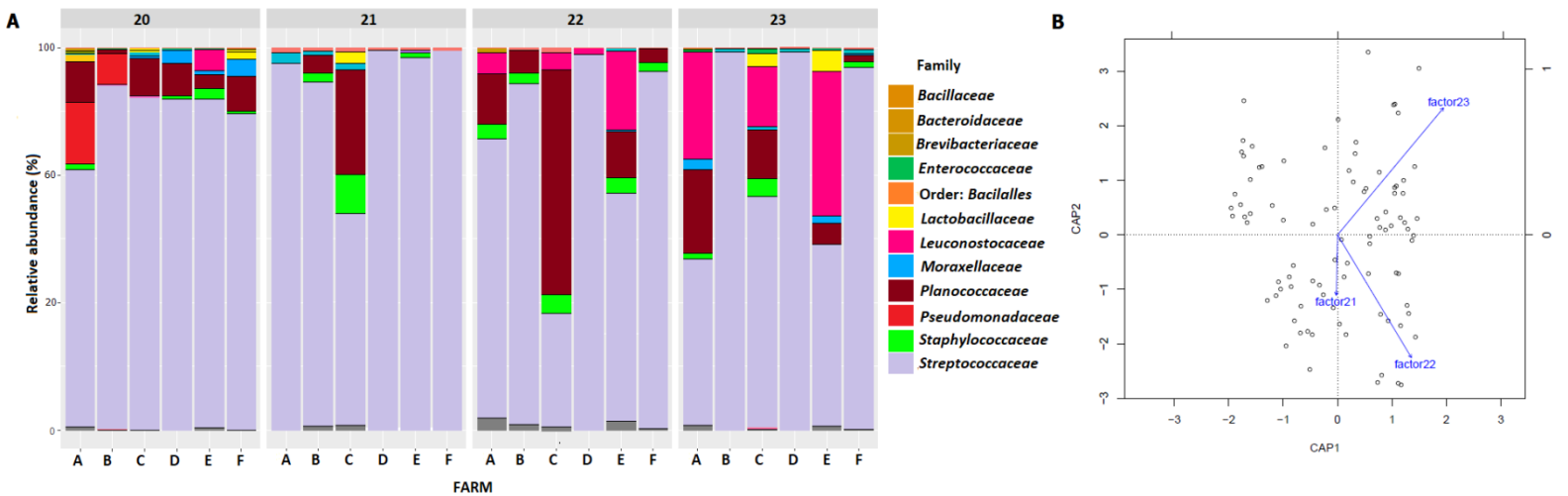


Figura 8 - Dinâmica populacional das amostras de leite, pingo e queijos (casca e interior) em relação à temperatura média da região
A - Abundância relativa (%) da população microbiana das fazendas (média dos valores de leite, pingo e queijos), em relação à temperatura média, em nível de família. Box cinza horizontais representam os valores médios de temperatura, em °C, respectivamente (adonis $R^2 = 0.04$, $p < 0.01$).
B - análise de redundância baseada na distância do conteúdo de temperatura média ($p < 0,001$, pseudo-F: 2,09). Cada fator representa uma temperatura média da região.
NA - amostras não atribuídas

5.7 – OTUs diferencialmente abundantes

De forma a investigar mudanças específicas na abundância relativa dos OTUs, uma análise no programa DESeq2 foi realizada para detectar quais OTUs foram muito ou pouco representados, associados à origem e aos fatores abióticos. Valores negativos para o \log_2 foldchange implica que o OTU é mais abundante no segundo fator em relação ao primeiro. A tabela 6 mostra os OTUs diferencialmente abundantes em relação à origem das amostras. Os OTUS *Planococcaceae*, *Staphylococcus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Streptococcus agalactiae* e *Lactococcus* foram significativamente mais abundantes que no pingo e no leite, quando comparados ao interior dos queijos (média de 6.78 vezes mais enriquecido), o que pode ser explicado pelo fato de que tanto o leite quanto o pingo são mais próximos filogeneticamente, embora ainda distintos, como mostra a análise multivariada (figura 4.E). *Macrococcus*

caseolyticus é considerado um microrganismo ambiental, desaparecendo quando o leite e/ou queijo são submetidos a altas temperaturas, e.g. *pasta fillata* cheeses. A presença dessas espécies em baixas abundâncias no leite podem estar associadas a um longo período de armazenagem sob temperatura irregular (GIANINNO *et al.*, 2009; RANDAZZO, *et al.*, 2002). *Streptococcus agalactiae* é um microrganismo muito bem descrito na literatura associado à mastite (SOGGIU *et al.*, 2018). *Planococcaceae* e *Weissella* foram mais abundantes no pingo quando comparados ao leite, indicando que o leite pode ser responsável por inocular microrganismos associados ao grupo dos SLAB no queijo. A casca do queijo mostrou mais OTUs diferencialmente abundantes quando comparados ao interior dos queijos, onde somente *Lb. brevis* e *Lb. zae* estavam associados ao interior. De Filippis e colaboradores (2016) também descreveram que a maturação do queijo foi comandada por poucos lactobacilli NSLAB, e.g. *Lb. casei* e *Lb. buchneri*, grupos cuja abundância foi maior no interior dos queijos.

Tabela 6. Análise DESeq2 mostra OTUs diferencialmente abundantes por comparação em relação a origem

Origem	Abundância de OTU	log2FoldChange
Pingo x interior	↑ <i>Macrococcus caseolyticus</i>	9.50
	↑ <i>Planococcaceae</i>	9.02
	↑ <i>Streptococcus agalactiae</i>	7.00
	↑ <i>Staphylococcus</i>	5.80
	↑ <i>Lactococcus</i>	4.45
	↓ <i>Streptococcus</i>	-2.20
Pingo x leite	↑ <i>Planococcaceae</i>	14.00
	↑ <i>Weissella</i>	13.90
	↓ <i>Streptococcus agalactiae</i>	-9.60
	↓ <i>Lactococcus garvieae</i>	-10.30
	↓ <i>Streptococcus</i>	-10.32
	↓ <i>Enterobacteriaceae</i>	-10.50
Pingo x casca	↓ <i>Streptococcus</i>	-3.60
	↓ <i>Planococcaceae</i>	-5.45
	↓ <i>Lactococcus</i>	-6.16
	↓ <i>Streptococcus dispersa</i>	-6.45
	↓ <i>Staphylococcus</i>	-7.43

	↓ <i>Weissella</i>	-9.77
Leite x casca	↑ <i>Pseudomonas</i>	13.27
	↑ <i>Lactococcus garviae</i>	12.83
	↑ <i>Streptococcus agalactiae</i>	8.62
	↓ <i>Streptococcus</i>	-4.32
Leite x interior	↑Enterobacteriaceae	9.75
	↑ <i>Macrococcus caseolyticus</i>	9.50
	↑ <i>Lactococcus garviae</i>	9.50
	↑Planococcaceae	6.80
	↑ <i>Streptococcus agalactiae</i>	8.76
	↑ <i>Staphylococcus</i>	5.87
	↑ <i>Lactococcus</i>	4.45
Casca x interior	↑ <i>Weissella</i>	8.60
	↑ <i>Staphylococcus</i>	8.20
	↑ <i>Brevibacterium</i>	8.10
	↑ <i>Corynebacterium variable</i>	8.70
	↑ <i>Staphylococcus sciuri</i>	8.10
	↑ <i>Staphylococcus aureus</i>	8.10
	↑ <i>Staphylococcus equorum</i>	7.90
	↑ <i>Macrococcus caseolyticus</i>	7.65
	↑ <i>Brevibacterium aureum</i>	7.70
	↑ <i>Pseudomonas</i>	4.30
	↑Micrococcaceae	4.20
	↓ <i>Streptococcus</i>	-2.90
	↓ <i>Lactococcus</i>	-2.80
	↓ <i>Lactobacillus brevis</i>	-2.40
	↓ <i>Lactobacillus zeae</i>	-2.70

Os valores negativos de Log2FoldChange indicam que o OTU é mais abundante no segundo fator quando comparado ao primeiro, conforme mostrado pelas setas PARA CIMA ou PARA BAIXO. A tabela está mostrando apenas valores significativos para Log2FoldChange ($p < 0,05$).

A presença de OTUs de *Brevibacterium* e *Corynebacterium* é importante para a maturação do queijo devido à sua atividade proteolítica, produzindo compostos voláteis sulfurosos ou amônia (ELISKASES-LECHNER e GINZINGER, 1995). Carnio e colaboradores (2000) descreveram que *S. equorum* é conhecido por produzir compostos aromáticos e por trazer pigmentos alaranjados na casca de queijos. De fato, alguns

queijos tinham a tendência de apresentar pontos alaranjados, principalmente nas cascas. Como esperado, OTUs de NSLAB classificados como *Brevibacterium*, *Weissella* e *Lactobacillus* foram mais abundantes em menores valores de acidez titulável, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6. Análise DESeq2 mostra OTUs diferencialmente abundantes por comparação em relação ao teor de acidez titulável

Acidez (°D)	Abundância de OTU	Log2FoldChange
0,17 ~ 0,31 x 0,45 ~ 0,78	↓ <i>Brevibacterium aureum</i>	-7.42
	↓ <i>Weissella</i>	-5.85
	↓ <i>Lactobacillus brevis</i>	-5.44
	↓ <i>Lactobacillus zeae</i>	-5.33
	↓Micrococcaceae	-3.94
	↑ <i>Lactococcus</i>	2.80

Os valores negativos de Log2FoldChange indicam que o OTU é mais abundante no segundo fator quando comparado ao primeiro, conforme mostrado pelas setas PARA CIMA ou PARA BAIXO. A tabela está mostrando apenas valores significativos para Log2FoldChange ($p < 0,05$).

Esses dados reforçam a ideia de que o tempo de maturação deve ser adequado para que o estabelecimento dessas bactérias aconteça concomitante ao aumento da acidez titulável. A tabela 8 mostra que somente nos menores valores de umidade a abundância de OTUS de *Streptococcus*, *Lb. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *S. Agalactiae* e *Weissella* foram superiores. De acordo com os resultados, De Filippis e colaboradores (2016) constataram que NSLAB aos 10 dias de maturação foram significativamente mais abundantes quando houve redução relativa da umidade e aumento da temperatura na maturação, quando comparados ao controle. No presente estudo, NSLAB iniciaram aumento na abundância relativa ao 14º dia de maturação, alcançando valores maiores no 45º e 60º dia de maturação. Curiosamente, não somente NSLAB foram diferencialmente abundantes, mas também OTUs de *Streptococcus*, o que pode estar relacionando a uma adaptação específica desse gênero ao ambiente.

Tabela 8. Análise DESeq2 mostra OTUs diferencialmente abundantes por comparação em relação ao teor de umidade

% de umidade	Abundância de OTU	Log2FoldChange
29.45 ~ 17.37%	↓ <i>Streptococcus</i>	-1.266
	↓ <i>Lactobacillus brevis</i>	-3.96
	↓ <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-4.43
	↓ <i>S.agalactiae</i>	-4.45
	↓ <i>Weissella</i>	-5.38

Os valores negativos de Log2FoldChange indicam que o OTU é mais abundante no segundo fator quando comparado ao primeiro, conforme mostrado pelas setas PARA CIMA ou PARA BAIXO. A tabela está mostrando apenas valores significativos para Log2FoldChange ($p < 0,05$).

6 – CONCLUSÕES

A comunidade bacteriana do QMA é altamente influenciada pelas comunidades bacterianas do leite e do pingo. As mudanças na estrutura da comunidade bacteriana ao longo do período de maturação estão moderadamente relacionadas aos fatores abióticos tais como localização geográfica, umidade e acidez titulável. Parece haver uma adaptação ambiental dessas bactérias, como mostrado nos agrupamentos distintos de PcoA em relação à origem, umidade e acidez. *Streptococaceae* e *Planococcaceae* foram prevalentes nos queijos ao longo do período de maturação, ao passo que *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* apareceram em estágios tardios da maturação. A família *Planococcaceae* é associada ao aspecto ambiental da região e possivelmente desempenha um papel relevante no processo de maturação, especialmente nas cascas dos queijos. É possível dizer que as assinaturas microbianas, bem como as interações com outras comunidades microbianas dependem da presença dessa família no queijo. Novos estudos são necessários para elucidar os efeitos putativos benéficos dessa família nos queijos em relação aos parâmetros físico-químicos e análises funcionais da comunidade microbiana.

7 - REFERÊNCIAS

- ABEIJON MUKDSI, M.C., FALENTIN, H., MAILLARD, M.B., CHUAT, V., MEDINA, R.B., PARAYRE, S., THIERRY, A. The secreted esterase of *Propionibacterium freudenreichii* has a major role in cheese lipolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* v.80, p.751–756, 2014.
- ALEGRÍA, Á., SZCZESNY, P., MAYO, B., BARDOWSKI, J., KOWALCZYK, M., Biodiversity in Traditional Polish Cheese Oscypek Determined by Culture-dependent and-independent Approaches. *App. Environ. Microbiol.*, v.06081-11, 2012.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* v.25, p.3389-3402, 1997.
- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.*, v.59, n.1, p.143–169, 1995.
- AMIR, A., ZEISEL, A., ZUK, O., *et al.*, Highresolution microbial community reconstruction by integrating short reads from multiple 16S rRNA regions. *Nucleic Acids Res.*, v.41, p.e205, 2013.
- ANDERSON, M.J., WILLIS, T.J. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology*, 84, 511–525, 2003.
- AOAC International. *Official methods of analysis of AOAC*. 16 ed. Arlington, VA: AOAC International, 1995.
- ARCURI, E.F., SHEIKHA, A.F., RYCHLIK, T., ISABELLE, P.M., MONET, D. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control*. v.30, p.1–6. 2013.
- BACHMANN, H.P., SPAHR, U. The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. *J. Dairy Sci.*, v.78, n.3, p.476–483, 1995.
- BAROSS, J. A.; LENOVICH, L. M. Halophilic and osmophilic microorganisms. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, DC, p. 199-212, 1992.
- BAUM, Fedorova, M., Ebner, J., Hoffmann, R., Pischetsrieder, M. Analysis of the endogenous peptide profile of milk: identification of 248 mainly casein-derived peptides. *J. Proteom. Res.*, v. 12, n. 12, p. 5447-5462, 2013.
- BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L., COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* v.11, p.259–274, 2001.
- BILLS, D.D., DAY, E.A. Determination of the major free fatty acids of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, v.47, p.733–738, 1964.
- BLACK, S. F. et al. Rapid RAPD analysis for distinguishing *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes using a capillary air thermal cycler. *Lett. Appli. Microbiol*, v. 20, n. 3, p. 188-190, 1995
- BODDY, L., WIMPENNY, J.W.T. Ecological concepts in food microbiology. *J. App. Bacteriol.*, v.73, n.s21, 1992.
- BOKULICH, N.A., MILLS, D.A. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *App. Envir. Microbiol.*, v. 79, n. 17, p. 5214-5223, 2013.

BONAÏTI, C., PARAYRE, S., IRLINGER, F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *Int. J. Food Microbiol.* v.107, p.171–179, 2006.

BORELLI, B.M., Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus enterotoxigênicos* durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra e MG. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 120, 2006.

BOUTON, Y., BUCHIN, S., DUBOZ, G., POCHE, S., BEUVIER, E.. Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiol.* v.26, n. 2, p.183–191, 2009.

BRADLEY, R.D., HILLIS, D.M. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Mol. Biol.Evol.*, v.14, p.592-593, 1997.

BRAGG, L., STONE, G., IMELFORT, M., HUGENHOLTZ, P., TYSON, G.W. Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia. *Nat. Methods*, v.9, p.425-426, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2006. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acessado em 10 de dezembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57 de 15 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acessado em 10 de dezembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011c. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acessado em 10 de dezembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acessado em 10 de dezembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000. Critérios de funcionamento e controle da produção de queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acessado em 10 de dezembro de 2018.

BRAY J.R., CURTIS, J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27, 326–349, 1957

CAI, Y., SUN, Y. ESPRIT-Tree: hierarchical clustering analysis of millions of 16S rRNA pyrosequences in quasilinear computational time. *Nucleic Acids Res.*, v.39, p.e95, 2011.

CALLON, C., DELBÈS, C., DUTHOIT, F., MONTEL, M.C. Application of SSCPPCR fingerprint to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* v.29, p.172-180, 2006.

CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* v.50, p.131–149, 1999.

CAPORASO, J.G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.*, v.7, n.5, p.335–336, 2007.

- CARNIO, M.C., HOLTZEL, A., RUDOLF, M., HENLE, T., JUNG, G., SCHERER, S. The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P(1) is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* v.66, n. 2378–2384, 2000..
- CASTRO, R.D., OLIVEIRA, L.G., SANT'ANNA, F.M., LUIZ, L.M.P., SANDES, S.H.C., SILVA, C.I.F., SILVA, A.M., NUNES, A.C., PENNA, C.F.A.M., SOUZA, M.R. 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 dry and rainy seasons. *J. Dairy Sci.* v.99, p.1–11, 2016.
- CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N., ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, v.69, p.330-339, 2007.
- CHALITA, M.A.N.; SILVA, R.O.P.; PETTI, R.H.V.; SILVA, C.R.L. Algumas Considerações sobre a fragilidade de concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. *Informações Econômicas, SP*, v.39, n.6, jun. 2009
- CHEESEMAN, K., ROPARS, J., RENAULT, P., DUPONT, J., GOUZY, J., BRANCA, A., ABRAHAM, A.L., CEPPI, M., CONSEILLER, E., DEBUCHY, R., MALAGNAC, F., GOARIN, A., SILAS, P., LACOSTE, S., SALLET, E., BENSIMON, A., GIRAUD, T., BRYGOO, Y. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat. Commun.* V.5, p.2876, 2014.
- CHICH, J.F., MARCHESSEAU, K., GRIPON, J.C. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: Purification and characterization. *Int. Dairy J.*, v.7, p.169–174, 1997.
- CHOMBO-MORALES, P., KIRCHMAYR, M., GSCHAEDLER, A., LUGO-CERVANTES, E., VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT. Food Sci. Technol.* v.65, p.1153-1161., 2016. doi:10.1016/j.lwt.2015.09.044.
- CHRISTENSEN, J. E., DUDLEY, E. G., PEDERSON, J. A., STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Van Lee.*, v.76, n.1-4, p.217-246, 1999.
- COBA, M.S.M., MAGALHAES, K.T., SILVA, C.F., DIAS, D.R., DUARTE, W.F., SCHWAN, R.F. Culturable bacteria from soils of the Brazilian Cerrado. *Prime J. Microbiol. Res.* v.2, p.131-136, 2012..
- COLE, J.R., CHAI, B., FARRIS, R.J. *et al.* The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids. Res.* v.35, p.169–172, 2007.
- COLE, J.R., WANG, Q., FISH, J.A., CHAI, B., MCGARRELL, D.M., SUN, Y., BROWN, C.T., PORRAS-ALFARO, A., KUSKE, C.R., TIEDJE, J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*, v.42, n.1, p.D633–D642, 2014.
- COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* : numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J Bacteriol.* v.194, p.410–433, 1970.
- CUMMINS, C. S. *et al.* The genus *Propionibacterium*. *The Prokaryotes.*, n. Ed. 2, p. 834-849, 1992.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nature Rev. Microbiol.*, v.3, n.6, p.470-478, 2005.
- DARILMAZ, D.O., BEYATLI, Y. Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. *Anaerobe* v.18, p.122–127, 2012.

- DE FILIPPIS, F., GENOVESE, A., FERRANTI, P., GILBERT, J. A., ERCOLINI, D. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scien. Rep.* v.6, p.21871, 2016.
- DE FILIPPIS, F., LA STORIA, A., STELLATO, G., GATTI, M. ERCOLINI, D. A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS ONE*. v.9, n.2, p. e89680, 2014..
- DE PASQUALE, I., DI CAGNO, R., BUCHIN, S., DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M. Spatial Distribution of the Metabolically Active Microbiota within Italian PDO Ewes' Milk Cheeses. *PLoS ONE*, v.11, n.4, p. e0153213, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0153213
- DE PASQUALE, I., DI CAGNO, R., BUCHIN, S., DE ANGELIS, M. GOBBETTI, M. Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata Caciocavallo Pugliese cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* v.80, p.6243–6255, 2014..
- DEETH, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *Int. Dairy J.*, v. 16, n. 6, p. 555-562, 2006.
- DEETH, H.C., TOUCH, V. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Austral. J. Dairy Technol.*, v.55, p.153–168, 2000.
- DEL CHIERICO, Federica et al. Meta-omic platforms to assist in the understanding of NAFLD gut microbiota alterations: tools and applications. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 15, n. 1, p. 684-711, 2014.
- DELBÈS, C., ALI-MANDJEE, L., MONTEL, M.C. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Env. Microbiol.* v.73, p.1882-1891, 2007.
- DELCHER, A.L., PHILLIPPY, A., CARLTON, J., SALZBERG, S.L. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Res.*, v.30, p.2478-2483, 2002.
- DELGADO, F.J. *et al.* Free fatty acids and oxidative changes of a raw goat milk cheese through maturation. *J. Food Sci.* v. 76, n. 4, p. C669-C673, 2011.
- DELONG, E.F., PRESTON, C.M., MINCER, T., RICH, V., HALLAM, S.J., FRIGAARD, N.-U., MARTINEZ, A., SULLIVAN, M.B., EDWARDS, R., BRITO, B.R., *et al.* Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. *Science*, v.311, p.496-503, 2006.
- DESANTIS, T.Z., HUGENHOLTZ, P., LARSEN, N., *et al.* Greengenes, a chimera checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* v.72, p.5069–5072, 2006.
- DESMASURES, N., GUÉGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality raw milk diversité et influence des conditions de production. *Lait* v.81, p.575–592, 1997.
- DINSDALE, E.A., EDWARDS, R.A., HALL, D., ANGLY, F., BREITBART, M., BRULC, J.M., FURLAN, M., DESNUES, C., HAYNES, M., LI, L., *et al.* Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*, v.452, p.629-632, 2008.
- EDGAR, R.C., HAAS, B.J., CLEMENTE, J.C., QUINCE, C., KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinfo.*, v.27, p.2194-2200, 2011.
- ELISKASES-LECHNER, F., GINZINGER, W. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait*. v.75, p.571–583, 1995.
- EL-SAFETY, M.S., ISAMIL, A.A. Addition of free fatty acids to improve the flavour and accelerate the ripening of Domiati cheese made from reconstituted milk. *J. Dairy. Res.* v.9, p.671–675, 1982.

ELSHAHED, M.S., YOUSSEF, N.H., SPAIN, A.M., SHEIK, C., NAJAR, F.Z., SUKHARNIKOV, L.O., ROE, B.A., DAVIS, J.P., SCHLOSS, P.D., BAILEY, V.L., *et al.* Novelty and Uniqueness Patterns of Rare Members of the Soil Biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* v.74, p.5422-5428, 2008.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Programa do Queijo Minas Artesanal, 2014. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

ENGEL, A.S. Microbial diversity of cave ecosystems, in: Loy, A., Mandl, M., Barton, L.L., (Eds.), *Geomicrobiology: Molecular and environmental perspective*. Springer, New York, pp. 219-238, 2010.

ERCOLINI, D., FRISSE, G., MAURIELLO, G., SALVATORE, F., COPPOLA, S. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* v.124, p.164–170, 2008.

ESCOBAR-ZEPEDA, A., SANCHEZ-FLORES, A., BARUCH, M.Q. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol.* v.57, p.116-127, 2016. doi: 10.1016/j.fm.2016.02.004.

EWING, B., HILLIER, L.D., WENDL, M.C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, v.8, n.3, p.175–185, 1998.

FAULKNER, A. *et al.* Seasonal changes in the fat composition and concentration of citrate and related metabolites in cows' milk. *J. Dairy Res.*, v. 53, n. 02, p. 223-227, 1986.

FDA. *Bacteriological and analytical manual*. Mclean, 1995.

FEDERHEN, S. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Res.*, v.40, p.136–143, 2012.

FERNANDEZ-ESPLA, M.D., FOX, P.F., Effect of adding *Propionibacterium shermanii* NCDO 853 or *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IFPL 731 on proteolysis and flavor development of Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* v.46, p.1228–1234, 1998.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. *et al.* Seasonal variation of the free fatty acids contents of Spanish ovine milk cheeses protected by a designation of origin: A comparative study. *Int. Dairy J.*, v. 16, n. 3, p. 252-261, 2006.

FERROCINO, I., COCOLIN, L. Current perspectives in food-based studies exploiting multi-omics approaches. *Curr. Opinion Food Sci.*, n.13, p.10–15, 2017

FISHER, R.A. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics*, 7, 179–188, 1936

FITZ-GERALD, H. D. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids*, v. 2, p. 247, 1995.

FITZGERALD, R.J., MURRAY, B.A., WALSH, D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.*, v.134, p.980S–988S, 2004.

FLICEK, P., BIRNEY, E. Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature Metho.*, v.,6, p.6-12, 2009.

FLICEK, P., BIRNEY, E. Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature Metho.*, v.6, p.S6-S1, 2009.

FODA, E.A., HAMMOND, E.G., REINBOLD, G.W., HOTCHKISS, D.K. Role of fat in flavour of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, v.57, p.1137–1142, 1974.

- FOX, P. F. et al. Biochemistry of cheese ripening. In: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Springer US, 1993. p. 389-438.
- FOX, P.F. Acceleration of cheese ripening. *Food Biotechnol.*, v.2, p.133–185, 1988.
- FOX, P.F. Fundamentals of cheese science. Springer Science & Business Media, 2000
- FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., GUINEE, T.P.,. Cheese: Chemistry, Physics, Microbiology, Elsevier, London, 2004.
- FOX, P.F., STEPANIAK, L. Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.*, n.3, p.509–530, 1993.
- FOX, P.F., WALLACE, J.M. Formation of flavour compounds in cheese. *Adv. App. Microbiol.*, v.45, p.17–85, 1997.
- FOX, Patrick F.; MCSWEENEY, Paul LH. Dairy chemistry and biochemistry. 1998.
- FRANK, J.F., MARTH, E.H. Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk. *J. Food Prot.* n.40, v.11, p.754–759, 1977.
- FRÉTIN, M., MARTIN, B., RIFA, E., VERDIER-METZ, I., POMIÈS, D., FERLAY, A., et al. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific Reports*, v.8, p.200, 2018.
- FU, L., NIU, B., ZHU, Z., WU, S., LI, W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinfo.*,v.28, p.3150-3152, 2012.
- FUKA, M.M., WALLISCH, S., ENGEL, M., WELZL, G., HAVRANEK, J., SCHLOTTER, M. Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. *PLoS One* v.8, p. 11, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0080734.
- FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Rev.Inst. Lat. Can. Tos.*, v. 35, n. 210, p. 33-36, 1980.
- GATTI, M. *et al.*. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *J. Dairy. Sci.*, v. 97, n. 2, p. 573-591, 2014.
- GATTI, M., BOTTARI, B., LAZZI, C., NEVIANI, E., MUCCHETTI, G. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 2, p. 573-591, 2014.
- GAVRISH, E.I., KRAUZOVA, V.I., POTEKHINA, N.V., KARASEV, S.G., PLOTNIKOVA, E.G., ALTYNTSEVA, O.V., KOROSTELEVA, L.A., EVTUSHENKO, L.I. Three new species of brevibacteria- *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Mikrobiologiya*. v.73, p.218–225, 2004.
- genomic code: inferring Vibrionaceae niche specialization. *Nat. Rev. Microbiol.*
- GIANNINO, M.L., MARZOTTO, M., DELLAGLIO, F., FELIGINI, M. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* v.130, n.3, p.188-195, 2009.
- GOBBETTI, M., ANGELIS, M., DICAGNO, R., RIZZELLO, C. The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese, in: Weimer, B.C. (Ed.), *Improving the Flavour of Cheese*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 121–156, 2007

- GOBBETTI, M., DI CAGNO, R., CALASSO, M., NEVIANI, E., FOX, P.F., DE ANGELIS, M. Drivers that establish and assemble the lactic acid bacteria biota in cheeses, *Trends in Food Sci. Technol.*, 2018 doi: 10.1016/j.tifs.2018.06.010.
- GOBBETTI, M., MINERVINI, F., RIZZELLO, C.G. Angiotensin Converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.*, v.57, p.172–188, 2004.
- GOERGES, S., MOUNIER, J., REA, M.C., GELSOMINO, R., HEISE, V., BEDUHN, R., COGAN, T.M., VANCANNEYT, M., SCHERER, S. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South German red smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* n.74, p.2210–2217, 2008.
- GOERGES, S., MOUNIER, J., REA, M.C., GELSOMINO, R., HEISE, V., BEDUHN, R., COGAN, T.M., VANCANNEYT, M., SCHERER, S. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south German red smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* v.74, p.2210-2217, 2008.
- GOERGES, S., MOUNIER, J., REA, M.C., GELSOMINO, R., HEISE, V., BEDUHN, R., COGAN, T.M., VANCANNEYT, M., SCHERER, S. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South German red smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* v.74, p.2210–2217, 2008.
- GOMEZ-RUIZ, J. A., RAMOS, M., RECIO, I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.*, v.12, p.697–706, 2002.
- GOODFELLOW, M; MANFIO, G. P.; CHUN, J. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: CLARIDGE, M.F., DAWAH, H.A., WILSON, M.R. *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, London, 1997. p. 25–59;
- GOODFELLOW, Michael *et al.* *The biology of the Actinomycetes*. Academic Press Inc., 1984.
- GOODFELLOW, Michael. Microbial systematics: background and uses. In: *Applied microbial systematics*. Springer Netherlands, 2000. p. 1-18.
- GOODFELLOW, MICHAEL; WAYNE, LAWRENCE G. Taxonomy and nomenclature. *The biology of the mycobacteria*, v. 1, p. 471-521, 1982.
- GOWER, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 53,325–338, 1966.
- GRIMONT, P.A.D. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.*
- HAAS, B.J., GEVERS, D., EARL, A.M., FELDGARDEN, M., WARD, D.V., GIANNOUKOS, G., *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.*, v.21, p.494-504, 2011.
- HAMAD, S.H. 20 Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food. In: *Progress in Food Preservation*, p. 405, 2012.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Mic. Mol. Bio. Rev.*, v.64, n.4, p.669–685, 2004.
- HARTMAN, A.L., RIDDLE, S., MCPHILLIPS, T., LUDASCHER, B., EISEN, J.A. Introducing W.A.T.E.R.S.: a workflow for the alignment, taxonomy, and ecology of ribosomal sequences. *BMC Bioinfo.*, v.11, p.317, 2010.

- HARTMANN, M., HOWES, C.G., VANINSBERGHE, D., YU, H., BACHAR, D., CHRISTEN, R., *et al.* Significant and persistent impact of timber harvesting on soil microbial communities in Northern coniferous forests. *ISME J.*, v.6, p.2199-2218, 2012.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Application of multilocus enzyme electrophoresis and restriction fragment length polymorphism analysis to the typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk, nondairy foods, and clinical and veterinary sources. *App. Env. Microbiol.*, v. 60, n. 5, p. 1547-1553, 1994.
- HELLMANN, J.J., AND FOWLER, G.W. Bias, precision, and accuracy of four measures of species richness. *Ecol. App.* v.9, p.824-834, 1999.
- HERBERT, R. A.; SUTHERLAND, J. P. Chill storage. The microbiological safety and quality of food, p. 101-121, 2000.
- HIGHLANDER, S.K. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems. *Anim. Health Res. Rev.*, v.13, n.1, p.40–53, 2012.
- HILL, M.O. Correspondence Analysis—neglected multivariate method. *Applied Statistics*, 23, 340–354, 1974.
- HILL, M.O. Reciprocal averaging—eigenvector method of ordination. *Journal of Ecology*, 61, 237–244, 1973.
- HOLMSTRÖM, C., KJELLEBERG, S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* v.30, p.285–293, 1999.
- HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B.M., PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* v.180, p.4765–4774, 1998.
- HUGENHOLTZ, P., HUBER, T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.53, p.289-293, 2003.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, v.486, p.207–214, 2012.
- HURLEY, M. J. et al. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *Int. Dairy J.*, v. 10, n. 10, p. 673-681, 2000.
- HUSE, S.M., MARK WELCH, D.B., VOORHIS, A., SHIPUNOVA, A., MORRISON, H.G., EREN, A.M., SOGIN, M.L.: VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinfo.*, v.15, n.1, p.41, 2014.
- HUSE, S.M., WELCH, D.M., MORRISON, H.G., SOGIN, M.L. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.*, v.12, p.1889-1898, 2010.
- HUSON, D.H., AUCH, A.F., QI, J., SCHUSTER, S.C. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.*, v.17, n.3, p.377–86, 2007.
- HUSS, John. Methodology and ontology in microbiome research. *Biolog. Theo.*, v. 9, n. 4, p. 392-400, 2014.
- HUTCHESON, K. A test for comparing diversities based on the shannon formula. *J. Theo. Bio.* v.29, p.151-154, 1970.

HUTCHINSON, E. The niche: an abstractly inhabited hypervolume. **In** *The Ecological Theatre and the Evolutionary Play*, pp. 26-78. New Haven, CO: Yale University Press, 1965.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=316680>> Acesso em 04 janeiro 2019. 2018.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=316680&idtema=147&search=minas-gerais|serra-do-salitre|pecuaria-2017>> Acesso em 04 agosto 2019

IMA, INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lista de produtores cadastrados no programa do Queijo Minas Artesanal - atualizada em 17/07/2018. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal-. Acessado em 04 de janeiro de 2019.

IMA, INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lista de produtores cadastrados no programa do Queijo Minas Artesanal - atualizada em 17/07/18. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal-. Acesso em 10 de dezembro de 2018.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL – IPHAN. Modo artesanal....Disponível em: <<http://portal.iphan.gov.br/portal/montarDetalheConteudo.do?id=13925&sigla=Institucional&retorno=detalheInstitucional>>. Acesso em: 10 jan 2019

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Queijo Minas artesanal. <http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>. 2016. (acessado em 05 dez. 2018).

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Chuva acumulada mensal x nº de dias com chuva Serra do Salitre (MG)—para o ano: 2016 até 22/12/2016. <http://inmet.gov.br> (acessado em 02 jan. 2019).

IRLINGER, F., LAYEC, S., HELINCK, S., DUGAT-BONY, E. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Lett.* v.362, p.1-11, 2015.

IRLINGER, F., MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* v.20, p.142–8, 2009.

ISHIKAWA, M., KODAMA, K., YASUDA, H., OKAMOTO-KAINUMA, A., KOIZUMI, K., YAMASATO, K. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.* v.44, p.308-313, 2006.

JAMESON, J.E. A discussion of the dynamics of Salmonella enrichment. *J. Hyg.* v.60, p.193-207, 1962. JAMESON, J.E., A discussion of the dynamics of Salmonella enrichment. *J. Hyg.* v.60, p.193-207, 1962.

JANDA, J.M., ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* v.45, p.2761–2764, 2007.

JANSSEN, P.H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* v.72, p.1719-1728, 2006.

JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media. 2012.

JONES, R. T., ROBESON, M. S., LAUBER, C. L., HAMADY, M., KNIGHT, R., FIERER, N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME J.*, v.3, n.4, p.442-453, 2009.

JURKOWSKI, A., REID, A.H., LABOV, J.B. 2007. Metagenomics: a call for bringing a new science into the classroom (while it's still new). *CBE-Life Sciences Education* v.6, n.4, p.260–265, 2007.

- KENNEDY, A., SMITH, K. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, v.170, p.75-86, 1995.
- KILARA, A., PANYAM, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, v.43, p.607–633.
- KIM, M., LEE, K.H., YOON, S.W., KIM, B.S., CHUN, J., YI, H. Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era. *Genomics Inform.* v.11, n.3, p.102-113, 2013.
- KLIJN, N., WEERKAMP, A.H., DE VOS, W.M. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* n.61, p.788–792, 1995.
- KÖLJALG, U., NILSSON, R.H., ABARENKOV, K., *et al.* Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol.*, v.22, n.21, p.5271–5277, 2013.
- KORHONEN, H., PHILANTO, A. Food-derived bioactive peptides-Opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Design* n.9 p.1297–1308, 2003.
- KORHONEN, H., PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides— opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.*, v.9, p.1297–1308, 2003.
- KORNACKI, J.L. What Factors Are Required for Microbes to Grow, Survive, and Die?. In: *Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment*. Springer New York, 2010. p. 103-115.
- KORNACKI, J.L., MARTH, E.H. Thermal inactivation of *Salmonella senftenberg* and *Micrococcus freudenreichii* in retentates from ultrafiltered milks. *Lebensm. Wiss. U-Technol.* v.26, p.21–27, 1993.
- KUCZYNSKI, J., LAUBER, C.L., WALTERS, W.A., PARFREY, L.W., CLEMENTE, J.C., GEVERS, D., KNIGHT, R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat. Rev. Genet.*, v.13, n.1, p.47–58, 2012.
- KUMAR, S., CARLSEN, T., MEVIK, B.H., ENGER, P., BLAALID, R., SHALCHIAN-TABRIZI, K., *et al.* CLOTU: an online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation. *BMC Bioinfo.*, v.12, p.182, 2011.
- LACERDA, I.C.A., GOMES, F.C.O., BORELLI, B.M., FARIA JUNIOR, C.L.L., FRANCO, G.R., MOURÃO, M.M. MORAIS, P.B., ROSA, C.A. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture independent 16S rRNA gene sequence analysis. *Braz. J. Microbiol.* v.42, p.650–657, 2011. doi:10.1590/S1517-83822011000200029
- LAI, Z., ZOU, Y., KANE, N.C., *et al.* Preparation of normalized cDNA libraries for 454 Titanium transcriptome sequencing. *Methods Mol. Biol.*, v.888, p.119–133, 2012.
- LANE, D. J., PACE, B., OLSEN, G.J., STAHL, D.A, SOGIN, M.L., PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.82, p.6955–6959, 1985.
- LANGSRUD, T., REINBOLD, G.W. Flavor development and microbiology of Swiss cheese — a review. III. Ripening and flavor production. *J. Milk Food Technol.* v.36, p.593–609, 1973.
- LARPIN-LABORDE, S., IMRAN, M., BONAÏTI, C., BORA, N., GELSOMINO, R., GOERGES, S., IRLINGER, F., GOODFELLOW, M., WARD, A., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., SCHERER, S., GUÉGUEN, M., DESMASURES, N. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Can. J. Microbiol.* v.57, p.651–660, 2001.

- LASERSON, J., JOJIC, V., KOLLER, D. Genovo: de novo assembly for metagenomes. *J. Comp. Bio.*, v.18, p.429-443, 2011.
- LEE, J.H., YI, H., JEON, Y.S., WON, S., CHUN, J. TBC: a clustering algorithm based on prokaryotic taxonomy. *J. Microbiol.*, v.50, p.181-185, 2012.
- LEGENDRE P, ANDERSON M.J. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69, 1–24, 1999.
- LEITE, M.O. Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 64, 1993.
- LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* v.15, p.67–78, 2004.
- LEVEAU J.H.J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* v.119, p.279–300, 2007.
- LIAO, L., XU, X.W., JIANG, X.W., WANG, C.S., ZHANG, D.S., NI, J.Y., WU, M. Microbial diversity in deep—sea sediment from the cobalt—rich crust deposit region in the Pacific Ocean. *FEMS Microb. Eco.* v.78, p.565–585, 2011.
- LICITRA, G., OGIER, J.C., PARAYRE, S., PEDILIGIERI, C., CARNEMOLLA, T., FALENTIN, H., MADEC, M.N., CARPINO, S., LORTAL, S. Variability of bacterial biofilms of the “Tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. *Appl. Env. Microbiol.* v.73, p.6980-6987, 2007.
- LIMA, C., LIMA, L., CERQUEIRA, M., FERREIRA, E., ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Veterinária Zootec.* v.61, p.266e272, 2009.
- LIPMAN, D., PEARSON, W. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, v.227, n.4693, p.1435–1441, 1985.
- LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N. The microfloras of traditional greek cheeses, in: Donnelly, C., (Eds.), *Cheese and Microbes*. ASM Press., Washington, pp. 177-218, 2014.
- LOVE, M., ANDERS, S., HUBER, W. Differential analysis of count data—the DESeq2 package. *Genome Biol.* V.15, p.550, 2014.
- LOZUPONE, C., LLADSER, M.E., KNIGHTS, D., STOMBAUGH, J., KNIGHT. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J.*, v.5, p.169–172, 2011.
- LOZUPONE, C.A., KNIGHT, R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* v.32, p.557–578, 2008.
- LUIZ, L.M.P, CASTRO, R.D., SANDES, S.H.C, SILVA, J.G., OLIVEIRA, L.G., SALES, G.A., NUNES, A.C., SOUZA, M.R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA-J. Food.* v.15, n.1, 125-128, 2017.
- LUO, G., WANG, W., ANGELIDAKI, I. Anaerobic digestion for simultaneous sewage sludge treatment and CO biomethanation: process performance and microbial ecology. *Environ. Sci. Technol.* n.47, p.10685–10693, 2013.
- LUO, TSEMENTZI, D., KYRPIDES, N. *et al.* Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS one*, v. 7, n. 2, p. e30087, 2012.

- MACEDO, A.C.; MALCATA, F. Xavier. Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *Int. Dairy J.*, v. 6, n. 11, p. 1087-1097, 1996.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F., FONSECA, L. M. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, vol. 24, n. , p. 516-521, 2004.
- MAGURRAN, A.E. Ecological diversity and its measurements. Princeton: Princeton University press, 1988.
- MANSO, M. A., LÓPEZ-FANDINO, R. Angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity of bovine; ovine; and caprine kappa-casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *J. Food Prot.* v.66, p.1686–1692, 2003.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209–220, 1967.
- MARGESIN, R., SCHINNER, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* v.5, p.73–83, 2001.
- MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W.E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* v.437, p.376–380, 2005.
- MARSHALL, R. T. *Standard methods for the examination of dairy products*. 1992.
- MASOUD, W., VOGENSEN, F.K., LILLEVANG, S., ABU AL-SOUD, W., SØRENSEN, S.J., JAKOBSEN, M. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* v.153, p.192–202, 2012.
- MCMURDIE, P.J., HOLMES, S. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Comput. Biol.*, v.10, n.4, p. e1003531, 2014.
- MCSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, v.80, p.293–324, 2000.
- MCSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*. v.80, n.3, p.293-324, 2000.
- MCSWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F. Cheese: methods of chemical analysis. In: *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Springer US, 1993. p. 341-388.
- MEISEL H, GOEPFERT A., GÜNTHER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft* 52 307–311.
- MEISEL, H., FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.*, v.9, p.1289–1295, 2003.
- MEISEL, H., GOEPFERT, A., GÜNTHER, S. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwis.*, v.52, p.307–311, 1997.
- MENESES, J. N. C. Queijo artesanal de Minas: Patrimônio cultural do Brasil. Dossê interpretativo, v.1 Belo Horizonte, 2006.
- MENGONI, AL. et al. Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, v.1231, Springer Science+Business Media. Nova Iorque, 2015.

MERGAREJO NETTO, M. *A geografia do queijo minas artesanal*. 2011. 420 f. Tese (Doutorado em Geografia) — Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

MICHEL, V., HAUWUY, A., CHAMBA, J. F., La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait*. v.81, n.5, p.575-592, 2001.

MILLER, J.R., KOREN, S., SUTTON, G. Assembly algorithms for next generation sequencing data. *Genomics*, v.95, p.315-327, 2010.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002. Regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864, de 1 de agosto de 2008. Altera o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002a. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011. Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 23., de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2018. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em 04 de janeiro de 2019.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei 14.185 de 31 jan. 2002. Disponível em: <http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias_pdf/1022.pdf>. Acesso em: 05 jan 2019

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 694 de 17 nov. 2004. Disponível em: . Acesso em: 05 jan. 2019.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 874 de 2 out. 2007. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/355-portaria-874>. Acesso em: 05 jan. 2019.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1022 de 3 nov. 2009. Disponível em: . Acesso em: 05 jan. 2019

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1022 de 3 nov. 2009. Disponível em: <http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias_pdf/1022.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2019

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei 20.549 de 18 dez. 2012. Disponível em: . Acesso em: 05 jan. 2019

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei 20.549 de 18 dez. 2012. Disponível em: . Acesso em: 05 jan. 2019

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1397 de 13 fev. 2014. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1315-portaria-no-1397-de-13-de-fevereiro-de-2014 >. Acesso em: 05 jan. 2019

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1428 de 29 ago. 2014. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1556-portaria-no-1428-de-29-de-agosto-de-2014 >. Acesso em: 05 jan. 2019

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 1305, de 30 de abril de 2013. Estabelece diretrizes para produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: <http://www.ima.mg.gov.br/>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

MINAS GERAISa. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 594 de 10 jun. 2003. Acesso em: 05 jan 2019

MINAS GERAISa. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1397 de 13 fev. 2014. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/242-portaria-591 Acesso em: 05 jan. 2019

MINAS GERAISb. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 591 de 26 mai. 2003. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/242-portaria-591 >. Acesso em: 05 jan 2019.

MINAS GERAISb. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1428 de 29 ago. 2014. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1556-portaria-no-1428-de-29-de-agosto-de-2014 >. Acesso em: 05 jan. 2019

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

MOUNIER, J., GELSOMINO, R., GOERGES, S., VANCANNEYT, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., SCHERER, S., SWINGS, J., FITZGERALD, G.F., COGAN, T.M. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* v.71, p.6489–6500, 2005.

MOUNIER, J., GOERGES, S., GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., BRENNAN, N.M., SCHERER, S., SWINGS, J., FITZGERALD, G.F., COGAN, T.M. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.* v.101, p.668-681, 2006.

MOUNIER, J., MONNET, C., VALLAEYS, T., ARDITI, R., SARTHOU, A.S., HÉLIAS, A., IRLINGER, F. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* v.74, p.72-181, 2008.

MUYZER G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.2, n.3, p.317–322, 1992.

NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, M., SAKAI, K., OKUBO, A., YAMAZAKI, S., NAKAMURA, YAMAMOTO, N., SAKAI, K., OKUBO, A., YAMAZAKI, S., TAKANO, T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, v. 78, n. 4, p. 777-783, 1995.

- NAWROCKI, E.P., KOLBE, D.L., EDDY, S.R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinfo.* v.25, p.1335-1337, 2009.
 NCBI. Standard flow format.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi?cmd=show&f=formats&m=doc&s=format#sff>, 2012.
- NILAKANTA, H., DREWS, K.L., FIRRELL, S., FOULKES, M.A., JABLONSKI, K.A. A review of software for analyzing molecular sequences. *BMC Res Notes.*, v.7, n.1, p.830–830, 2014.
- NOGALES, B., MOORE, E.R.B., LLOBET-BROSSA, E., ROSSELLO-MORA, R., AMANN, R., TIMMIS, K.N. Combined Use of 16S Ribosomal DNA and 16S rRNA To Study the Bacterial Community of Polychlorinated Biphenyl-Polluted Soil. *Appl Environ Microbiol.*, v.67, p.1874-1884, 2001.
- NOORDMAN, W.H., REISSBRODT, R., BONGERS, R.S., RADEMAKER, J.L.W., BOCKELMANN, W., SMIT, G. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *J. Appl. Microbiol.* v.101, p.637-646, 2006.
- O’SULLIVAN, D.J. Methods for Analysis of the Intestinal Microflora. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v.1, n.2, p.39-50, 2000.
- O’SULLIVAN, D.J., COTTER, P.D., O’SULLIVAN, O., GIBLIN, L., MCSWEENEY, P.L.H., SHEEHAN, J.J. Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* v.81, p.2525–2533, 2015. doi:10.1128/AEM.04054-14.
- OBERREUTER, H., CHARZINSKI, J., SCHERER, S. Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Microbiol-UK* v.148, p.1523–1532, 2002.
- ODUM, E.P. *Fundamentals of Ecology*, Philadelphia: Saunders, 1953.
- OGIER, J.C., LAFARGE, V., GIRARD, V., RAULT, A., MALADEN, V., GRUSS, A., LEVEAU, J.Y., DELACROIX-BUCHET, A. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* v.70, p.5628–5643, 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.9.5628-5643.2004>.
- OULAS, A., PAVLOUDI, C., POLYMENAKOU, P., PAVLOPOULOS, G. A., PAPANIKOLAOU, N., KOTOULAS, G., *et al.*, Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinfo. Bio. Ins.*, v.9, p.75–88, 2015.
- PACE, N. R., STAHL, D.A., LANE, D.J., OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* v.9, p.1–55, 1986.
- PASSERINI, D., BELTRAMO, C., CODDEVILLE, M., QUENTIN, Y., RITZENTHALER, P., DAVERAN-MINGOT, M.L., LE BOURGEOIS, P., 2010. Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE*, v.5, p.e15306, 2004..
- PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. *Einstein (São Paulo)*, v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012 .
- PATEL, G. K. et al. Physico-Chemical Characteristics and Fatty Acid Composition of Milk Fat of Krankrej Cows, II. Effect of Dietary Conditions. *Lipid/Fett*, v. 91, n. 4, p. 164-167, 1989.
- PATEL, J.B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* v.6, p.313–321, 2001.

- PEARSON, K., On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2, 559–572, 1901.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microb.*, v.14, p.257–263, 2006.
- Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Ant. van Lee.*, 76, 217–246, 1999.
- PERIN, L. M., SARDARO, M. L. S., NERO, L. A., NEVIANI, E., GATTI, M. BACTERIAL ECOLOGY OF ARTISANAL MINAS CHEESES ASSESSED BY CULTURE-DEPENDENT AND-INDEPENDENT METHODS. *Food Microbiol.* v.65, p.160-169, 2017.
- PERRY, K.S.P.; QUEIJOS: ASPECTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS. *Química Nova*, Vol. 27, No. 2, 293-300, 2004.
- PESSOA FILHO, M.A.C.P. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do cerrado. EMBRAPA, 2010. 29p.
- PETERSON, D.A., FRANK, D.N., PACE, N.R., *et al.* Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*, v.3, p.417–427, 2008.
- PISANU, S. *et al.* Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese and implications for its bioactive potential. *Int. Dairy J.*, v. 42, p. 26-33, 2015.
- PLUMMER, E., TWIN, D., BULACH, D.M., GARLAND, S.M., TABRIZI, S.N. A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data. *J. Proteomics Bioinform.* v.8, p.283-291, 2015.
- POŁKA, J., REBECCHI, A., PISACANE, V., MORELLI, L., PUGLISI, E. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiol.*, n.46, p.342-356, 2015.
- POVEDA, J. M., PÉREZ-COELLO, M. S., CABEZAS, L. Seasonal variations in the free fatty acid composition of Manchego cheese and changes during ripening. *Eur. Food Res. Techn.*, v. 210, n. 5, p. 314-317, 2000.
- POWERS, J.G., WEIGMAN, V.J., SHU, J., *et al.* Efficient and accurate whole genome assembly and methylome profiling of *E. coli*. *BMC Genomics* v.14, p.675, 2013.
- PROCTOR, G.N. Mathematics of microbial plasmid instability and subsequent differential growth of plasmid-free and plasmid-containing cells, relevant to the analysis of experimental colony number data. *Plasmid*. n.32, p.101–130, 1994.
- PRUESSE, E., PEPLIES, J., GLÖCKNER, F.O. SINA: accurate highthroughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinfo.*, v.28, p.1823-1829, 2012.
- PRUESSE, E., QUAST, C., KNITTEL, K., *et al.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* v.35, p.7188–7196, 2007.
- PRUESSE, E., QUAST, C., KNITTEL, K., FUCHS, B. M., LUDWIG, W., PEPLIES, J., GLÖCKNER, F. O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids res.*, v.35, n.21, 7188-7196, 2015.
- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.*, v.41, p.590–596, 2013.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., BERESFORD, T.P., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F. COTTER, P.D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.150, n.2-3, p.81-94, 2011.

- QUIJADA, N. M., MANN, E., WAGNER, M., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., HERNÁNDEZ, M., SCHMITZ-ESSER, S. Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. *Int. J. Food Microbiol.*, v.267, p.54-61, 2018.
- QUINCE, C., LANZEN, A., DAVENPORT, R.J., TURNBAUGH, P.J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinfo.* n v.12, p.38, 2011.
- QUINCE, C., LANZEN, A., DAVENPORT, R.J., TURNBAUGH, P.J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinfo.*,v.12, p.38, 2011.
- RADEMAKER, J.L.W., PEINHOPF, M., RIJNEN, L., BOCKELMANN, W., NOORDMAN, W.H. The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *Int. Dairy J.* v.15, p.785-794, 2005.
- RAES, J., LETUNIC, I., YAMADA, T., JENSEN, L.J., AND BORK, P. Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. *Mol. Syst. Biol.*, v.7, n.1, p.473, 2011.
- RAMOS, J.R.T., CARNEIRO, R.A., SOARES, C.S. *et al.* High efficiency application of a mate-paired library from nextgeneration sequencing to postlight sequencing: *Corynebacterium pseudotuberculosis* as a case study for microbial *de novo* genome assembly. *J. Microbiol. Methods*, v.95, p.441-447, 2013.
- RANDAZZO, C. L., TORRIANI, S., AKKERMANS, A. D., DE VOS, W.M., VAUGHAN, E.E. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* v.68, n.4, p.1882-1892, 2002..
- REA, M.C., GOERGES, S., GELSOMINO, R., BRENNAN, N.M., MOUNIER, J., VANCANNEYT, M., SCHERER, S., SWINGS, J., COGAN, T.M. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *J. Dairy Sci.* v.90, p.2200-2210, 2007.
- REEDER, J., KNIGHT, R. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nat. Methods*, v.7, p.668-669, 2010.
- REEN, F.J. *et al.* The genomic code: inferring Vibrionaceae niche specialization. *Nature Revs. Microbiol.*, v. 4, n. 9, p. 697-704, 2006.
- RESEARCH COUNCIL (U.S.) COMMITTEE ON METAGENOMICS: CHALLENGES AND FUNCTIONAL APPLICATIONS, N. The new science of metagenomics: revealing the secrets of our planet. 2007. 158p.
- RESENDE, M.F.S. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: Influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas, Escola de Veterinaria. Universidade Federal de Minas Gerais Minas Gerais, 2010.
- RIEHLE, K., COARFA, C., JACKSON, A., MA, J., TANDON, A., PAITHANKAR, S., RAGHURAMAN, S., MISTRETTA, T.A., SAULNIER, D., RAZA, S., DIAZ, M.A., SHULMAN, R., AAGAARD, K., VERSALOVIC, J., MILOSAVLJEVIC, A. The Genboree Microbiome Toolset and the analysis of 16S rRNA microbial sequences. *BMC Bioinfo.*, v.13, n.13, p.11, 2012.
- RIESENFELD, C.S., SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, v.38, p.525-552, 2004.

- RODRIGUES, D. et al. Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chem.*, v. 131, n. 4, p. 1414-1421, 2012.
- RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.*, v.11, n.1, p.3–11, 2001.
- RONAGHI, M., UHLÉN, M., NYRÉN, P. A sequencing method based on realtime pyrophosphate. *Science.*, v.281, n.5375, p.363–365, 1998.
- ROSEN, M.J., CALLAHAN, B.J., FISHER, D.S., HOLMES, S.P. Denoising PCR-amplified metagenome data. *BMC Bioinfo.*, v.13, p.283, 2012.
- ROSSI, F., DELLAGLIO, F., PELUSO, M., TORRIANI, S. Dairy propionibacteria: occurrence, resistance to technological stresses and antagonistic properties (Italian) *Industria Alimentari*. v. 39, p. 553–557, 2000.
- RSTUDIO TEAM; RStudio: Integrated Development for R, 2015. <http://www.rstudio.com/> (accessed 15 may 2018).
- RYHÄNEN, E. L., PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., E PAHKALA, E. A new type of ripened; low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* v.11, p.441–447, 2001.
- RYHÄNEN, F.-L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* v. 11, n. 4-7, p. 441-447, 2001
- SADLER, G. D., MURPHY, P. A. pH and titratable acidity. In: Nielsen, S.S., (Eds.), *Food analysis*. Springer, Boston, pp. 219-238, 2010.
- SAHINGIL, D. et al. Changes of proteolysis and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in white-brined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature. *J. Dairy Res.*, v. 81, n. 04, p. 394-402, 2014.
- SAITO, T., NAKAMURA, T., KITAZAWA, H., KAWAI, Y., ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* v.83, p.1434–1440, 2000.
- SALIPANTE, S.J., SENGUPTA, D.J., HOOGESTRAAT, D.R., et al. Molecular diagnosis of *Actinobaculum madurae* infection by 16S rRNA deep sequencing. *J. Clin. Microbiol.* N.51, p.4262–4265, 2013.
- SALIPANTE, S.J., SENGUPTA, D.J., ROSENTHAL, C. et al. Rapid 16S rRNA next-generation sequencing clinical of polymicrobial samples for diagnosis of complex bacterial infections. *PLoS One*, v.8, n.5, p.e65226, 2013.
- SANT'ANNA, F. M., ACURCIO, L. B., ALVIM, L. B., CASTRO, R. D., OLIVEIRA, L. G., SILVA, A. M., SOUZA, M. R. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, v.70, n.4, 592-601. 2017
- SAVIJOKI, K., INGMER, H., & VARMANEN, P. *Proteolytic systems of lactic acid bacteria*. *Appl. Microbiol Technol.* v.71, n.4, p.394–406, . 2006. doi:10.1007/s00253-006-0427-1
- SCHATZ, M.C., DELCHER, A.L., SALZBERG, S.L., et al. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. *Genome Res.*, v.20, p.1165–1173, 2010.

- SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Status of the microbial census. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, v.68, p.686, 2004.
- SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Toward a Census of Bacteria in Soil. *PLoS Comput. Biol.*, v.2, p.e92, 2006.
- SCHLOSS, P.D., WESTCOTT, S.L., RYABIN, T., *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.*, v.75, n.23, p.7537–7541, 2009.
- SCHOLZ, M. B., LO, C., CHAIN, P.S.G. Next Generation Sequencing and bioinformatics bottlenecks: the current state of the art. *Cur. Op. Biotech.*, v.23, p.9–15, 2012.
- SCHORNSTEINER, E., MANN, E., BEREUTER, O., WAGNER, M., SCHMITZ-ESSER, S. Cultivation independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *Int. J. Food Microbiol.* v.180, p.88–97, 2014.
- SEGATA, N., IZARD, J., WALDRON, L., GEVERS, D., MIROPOLSKY, L., GARRETT, W.S., HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Geno. Bio.* v.12, p.60, 2011.
- SENF, B. *et al.* The fatty acid pattern of the milk fat of Black-Pied cows. *Milchwis.*, v. 25, n. 9, p. 510-14, 1970.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. História do queijo no Brasil. São Paulo: SEBRAE-SP, 2004.
- SETTANNI, L., DI GRIGOLI, A., TORNAMBÉ, G., BELLINA, V., FRANCESCA, N., MOSCHETTI, G., BONANNO, A. Persistence of wild *Streptococcus thermophilus* strains on wooden vat and during the manufacture of a traditional Caciocavallo type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* v.155 n.1-2, p.73-81, 2012.
- SHAKYA, M., GOTTEL, N., CASTRO, H. *et al.* A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PLoS One*, 8, e76382, 2013.
- SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. *Bell Sys. Techn. J.*, v.27, p.379-423, 1948.
- SHARON, I; BANFIELD, J. Genomes from metagenomics. *Science.*, v.342, n.1057, p.1057-1058, 2013.
- SIEUWERTS, S., DE BOK, F.A., HUGENHOLTZ, J., VAN HYLCKAMA, V., LIEG, J.E.T. Unravelling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Env. Microbiol.* v.74, p.4997-5007, 2008.
- SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. *Nature*, v.163, p.688-688, 1949.
- SIPOLA M., FINCKENBERG P., KORPELA R., VAPAATALO H., NURMINEN M-L. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.* n.69, p.103–111, 2002.
- SIPOLA, M., FINCKENBERG, P., KORPELA, R., VAPAATALO, H., NURMINEN, ML. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.* v.69, p.103–111, 2002.
- SLEATOR, R.D., SHORTALL, C., HILL, C. Metagenomics. *Lett. Appl. Microbiol.* v.47, n.5, p.361-366, 2008.

- SOGGIU, A., RONCADA, P., PIRAS, C. Proteomics in Milk and Dairy Products, in: Almeida, A.M., Eckersall, D., Miller, I., (Eds.), *Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology*. Springer, New York, pp. 169-193, 2018.
- SOGIN, M.L., MORRISON, H.G., HUBER, J.A., *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.103, n.32, p.12115–12120, 2006.
- STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G., GRIMONT, P.A.D., KÄMPFER, P., MAIDEN, M.C.J., NESME, X., ROSSELLÓ-MORA, R., SWINGS, J., TRÜPER, H.G., VAUTERIN, L., WARD, A.C., WHITMAN, W.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.52, p.1043–1047, 2002.
- STADHOUDERS, J., VERINGA, H.A. Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Nether. Milk Dairy J.*, v.27, p.77–91, 1973.
- STAHL, D. A., LANE, D.J., OLSEN, G.J., PACE, N.R.. 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* v.49, p.1379–1384, 1985.
- STALEY, J.T., KONOPKA, A., Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *An. Rev. Microbiol.*, v.39, p.321-346, 1985.
- STEELE, J., BROADBENT, J., KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Curr. Opin. Biotech.*, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2013.
- STEIN, J. L., MARSH, WU, T.L., K.Y., SHIZUYA, H. DELONG, E.F.. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* v.178p.591–599, 1996.
- STOCKER, G., SNAJDER, R., RAINER, J., TRAJANOSKI, S., GORKIEWICZ, G., TRAJANOSKI, Z., THALLINGER, G.G. SnowMAN: High-throughput Phylotyping, Analysis and Comparison of Microbial Communities. In: *the American Society for Microbiology 110th General Meeting*, San Diego-California, 2010.
- SUL, W. J., COLE, J. R., JESUS, E. D. C., WANG, Q., FARRIS, R. J., FISH, J. A., & TIEDJE, J. M. Bacterial community comparisons by taxonomy-supervised analysis independent of sequence alignment and clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.108, n.35, p.14637-14642, 2011.
- SWAN, K.A., CURTIS, D.E., MCKUSICK, K.B., VOINOV, A.V., MAPA, F.A., CANCELLA, M.R. High-throughput gene mapping in *Caenorhabditis elegans*. *Geno. Res.* v.12, n.7, p.1100–1105, 2002.
- TAMAKI, H., WIGHT, C. L., LI, X., LIN, Q., HWANG, C., WANG, S., THIMMAPURAM, J., KAMAGATA, Y., LIU, W.T. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PLoS One*. v.6, p.e25263, 2011.
- TAUZIN, J., MICLO, L., GAILLARD, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine as2-casein. *FEBS Lett.*, v.531, p.369–374, 2002.
- THIERRY, A., DEUTSCH, S.M., FALENTIN, H., DALMASSO, M., COUSIN, F., JAN, G., New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* v.149, p.18–27, 2011.
- THIERRY, A., MAILLARD, M.B., 2002. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait* v.82, p.17–32, 2002.

THOMAS, T., GILBERT, J., MEYER, F. Metagenomics—a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform. Exp.*, v.2, n.3, p.3, 2012.

THOMPSON, F.L., BRUCE, T., GONZALEZ, A., *et al.* Coastal bacterioplankton community diversity along a latitudinal gradient in Latin America by means of V6 tag pyrosequencing. *Arch Microbiol.*, v.193,n.2, p.105–114, 2011.

TOELSTEDE, S., HOFMANN, T. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, n. 8, p. 2795-2804, 2008

TRINGE, S., VON MERING, C., KOBAYASHI, A., SALAMOV, A., CHEN, K., CHANG, H., PODAR, M., SHORT, J., MATHUR, E., DETTER, J., *et al.* Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v.308, p554-557, 2005.

TRINGE, S.G., VON MERING, C., KOBAYASHI, A., *et al.* Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v.308, n.5721, p.554–557, 2005.

TURNBAUGH, P.J., LEY, R.E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C.M., KNIGHT, R., GORDON, J.I. The human microbiome project. *Nature*. v.449, p.804–810, 2007.

TYAKHT, A. V., KOSTRYUKOVA, E. S., POPENKO, A. S., BELENIKIN, M. S., PAVLENKO, A. V. *et al.* Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature comm.*, v. 4, 2013. v.15, p.684–711, 2014.

v.34, p.541–546, 1981.

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DEVOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* v.60, p.407–438, 1996.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA., 1995.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração. v.2.0.1. 76p. Disponível in: http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf. Acessado in: 23 de janeiro de 2016.

VENTER, J., REMINGTON, K., HEIDELBERG, J., HALPERN, A., RUSCH, D., EISEN, J., WU, D., PAULSEN, I., NELSON, K., NELSON, W., *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, v.304, p.66 – 74, 2004.

VERDIER-METZ, I., GAGNE, G., BORNES, S., MONSALLIER, F., VEISSEIRE, P., DELBÈS-PAUS, C., MONTEL, M.C. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.* v.78, p.326–333, 2012.

VERMEIRSEN, V., VAN CAMP, J., VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Brit. J. Nutr.*, v.92, p.357–366, 2004.

VIRGILI, R. *et al.* Sensory-chemical relationships in Parmigiano-Reggiano cheese. *LWT-Food Sci. Tech.*, v. 27, n. 5, p. 491-495, 1994.

VON MERING, C., HUGENHOLTZ, P., RAES, J., TRINGE, S.G., DOERKS, T., JENSEN, L.J., WARD, N., BORK, P. Quantitative Phylogenetic Assessment of Microbial Communities in Diverse Environments. *Science*, v.315, p.1126-1130, 2007.

WAN, M., FARUQ, J., ROSENBERG, J.N., *et al.* Achieving high throughput sequencing of a cDNA library utilizing an alternative protocol for the bench top next-generation sequencing system. *J. Microbiol. Methods* v.92, p.122–126, 2013.

WANG, L., WANG, Y.Y., WANG, D.Q., XU, J., YANG, F., LIU, G., ZHANG, D.Y., FENG, Q., XIAO, L., XUE, W.B., GUO, J., LI, Y.Z., TAO, J. Dynamic changes in the bacterial community in Moutai liquor fermentation process characterized by deep sequencing. *J. Inst. Brew.* v.121, n.4, p.603-608, 2015.

WANG, Q., GARRITY, G.M., TIEDJE, J.M., *et al.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* v.73, p.5261–5267, 2007.

WANG, X., SU, X., CUI, X., & NING, K. MetaBoot: a machine learning framework of taxonomical biomarker discovery for different microbial communities based on metagenomic data. *Peer J.*, v.3, p.e993, 2015.

WARD, N.L., CHALLACOMBE, J.F., JANSSEN, P.H., HENRISSAT, B., COUTINHO, P.M., WU, M., XIE, G., HAFT, D.H., SAIT, M., BADGER, J., *et al.* Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, p.2046-2056, 2009.

WESLEY, I. V., WESLEY, R. D., HEISICK, J., HARRELL, F., WAGNER, D., & BRYNER, J. Restriction enzyme analysis in the epidemiology of *Listeria monocytogenes*. In: *Microbial Toxins in Foods and Feeds*. Springer, Boston, MA, 1990. p. 225-238.

WETZELS, S.U., MANN E., POURAZAD, P., QUMAR, M., PINIOR, B., METZLER-ZEBELI, B.U., WAGNER, M., SCHMITZ-ESSER, S., ZEBELI, Q. Epimural bacterial community structure in the rumen of Holstein cows with different responses to a long-term subacute ruminal acidosis diet challenge *J. Dairy Sci.* v.100, p.1–16, 2017.

WHITE, A.G., WATTS, G.S., LU, Z. *et al.* (2014) Environmental arsenic exposure and microbiota in induced sputum. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.21, p.2299–2313, 2014.

WHITTAKER, H. Evolution of diversity in plant communities. In *Diversity and Stability in Ecological Systems.*, n.22. p.178-195. Brookhaven Symposia in Biology: Upton New York, 1969.

WHITTAKER, R.H., LEVIN, S.A., ROOT, R.B. Niche, habitat and ecotope. *Amer. Natural.* v.107, p. 321-338, 1973.

WIJESUNDERA, C., DRURY, L., MUTHUKU-MARAPPAN, K., GUNASEKARAN, S., EVERETT, D. W. Flavour development and the distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheese made from skim milk homogenized with AMF or its fractions. *Austral. J. Dairy Technol.*, v.53, p.107, 1998.

WILLIAMS, A. G., NOBLE, J., TAMMAM, J., LLOYD, D., BANKS, J. M. Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, v.12, p.841–852, 2002.

WILLNER, D., FURLAN, M., SCHMIEDER, R., GRASIS, J.A., PRIDE, D.T., RELMAN, D.A., ANGLY, F.E., MCDOLE, T., MARIELLA, R.P.J.R., ROHWER, F. *et al.*: Metagenomic detection of phage-encoded platelet-binding factors in the human oral cavity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.108, p.4547-4553, 2011.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* v.63, p.3741–3751, 1997.

WIMPENNYJ, W.T. Spatial order in microbial ecosystems. *Biol. Revs.* v.56, p.295-342, 1981.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*, v.51, n.2, p.221–271, 1987.

WOLFE, B., BUTTON, J.E., SANTARELLI, M., DUTTON, R.J. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, v.158, n. 2, p. 422-433, 2014.

WOOLEY, J.C., YE, Y. Metagenomics: facts and artifacts, and computational challenges. *J. Comp. Sci. Tec.* v.25, p.71–81, 2010.

WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* v.12, p.91–109, 2002.

WRIGHT, E.S., YILMAZ, L.S., NOGUERA, D.R. DECIPHER, a searchbased approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, p.717-725, 2012.

XIA, L.C., CRAM, J.A., CHEN, T., FUHRMAN, J.A., SUN, F. Accurate genome relative abundance estimation based on shotgun metagenomic reads. *PLoS One*, v.6, n.12, p.e27992–e27992, 2011.

XIE, G., CHAIN, P.S., LO, C.C., LIU, K.L., GANS, J., MERRITT, J., QI, F. Community and gene composition of a human dental plaque microbiota obtained by metagenomic sequencing. *Mol. Oral Microbiol.* v.25, p.391-405, 2010.

YAMAMOTO, N., EJIRI, M., MIZUNO, S. Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Des.* v.9, p.1345–1355, 2003.

ZAKRZEWSKI, M., GOESMANN, A., JAENICKE, S., JUNEMANN, S., EIKMEYER, F., SZCZEPANOWSKI, R., AL-SOUD, W.A., SORENSEN, S., PUHLER, A., SCHLUTER, A. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *J. Biotechnol.* v.158, p.248–258, 2012.

ZHANG, T.; ZHANG, X., YE, L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS one*, v.6, n.10, p.e26041, 2011.

8. ANEXOS

8.1 – Formulário de envio para requerimento de exportação de animais vivos, material de multiplicação animal, micro-organismos, produtos de origem animal ou material biológico de origem animal não destinados à alimentação humana ou animal



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL

REQUERIMENTO PARA EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS, MATERIAL DE MULTIPLICAÇÃO ANIMAL, MICRO-ORGANISMOS, PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL OU MATERIAL BIOLÓGICO DE ORIGEM ANIMAL NÃO DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO HUMANA OU ANIMAL

Ao:

Senhor Chefe do Serviço de Sanidade Agropecuária – SSA / SFA / UF, em Minas Gerais
(Unidade da Federação)

Solicito autorização para exportação da mercadoria caracterizada neste requerimento, tendo em vista o Decreto nº 24.548, de 03 de julho de 1934, e o Decreto N° 5741 de 30 de março de 2006, e para o referido fim presto as informações que se seguem:

1. IDENTIFICAÇÃO DA MERCADORIA

- 1.1 () Animal Vivo (especificar espécie, raça/linhagem, sexo) *ler item 1.1 para preenchimento* **OU**
1.2 () Material de Multiplicação Animal (especificar o material, espécie, raça/linhagem) *ler item 1.2 para preenchimento* **OU**
1.3 (X) Produto de Origem Animal ou Material Biológico de Origem Animal não destinado ao consumo humano ou animal (especificar espécie de origem, forma de obtenção, processamento e forma de preservação) *ler item 1.3 para preenchimento* **OU**
1.4 () Micro-organismo ou outro agente de interesse veterinário *(ler item 1.4 para preenchimento)*:

DESCRIÇÃO

Amplicon do gene 16S obtido por PCR de DNA total bacteriano extraído de queijos Minas artesanal da região da Serra do Salitre. O amplicon foi obtido por meio de reação de PCR simples em DNA obtido pelo método de extração fenol-clorofórmio e posteriormente armazenadas em água livre de nuclease. Os amplicons serão enviados à Austrália para pesquisa da microbiota presente na amostra.

A mercadoria relacionada neste requerimento é geneticamente modificada ou obtida a partir de animais geneticamente modificados? () Sim (X) Não

1.5 Quantidade *(ler item 1.5 para preenchimento)*: 3 placas de microtitulação de 96 poços com volume final de 25 microlitros de DNA e amplicons diluídos em tampão TE e água, respectivamente

1.6 Finalidade *(ler item 1.6 para preenchimento)*:
Pesquisa científica e tecnológica

2. EXPORTADOR *(ler item 2 para preenchimento)*:

NOME OU RAZÃO SOCIAL: Felipe Machado de Sant'Anna
CGC/CNPJ: 063.914.426-81
ENDEREÇO: Avenida Antônio Carlos, 6627

Requerimento para exportação versão 1.0

1

CIDADE/ESTADO/PAÍS: Belo Horizonte/Minas Gerais/Brasil
TELEFONE/FAX: +55-31-998542351 / +43-066-0826-6317
EMAIL: vetfelipem@gmail.com

3. ESTABELECIMENTO DE ORIGEM/PRODUÇÃO *(ler item 3 para preenchimento):*

NOME OU RAZÃO SOCIAL: Escola de Veterinária da UFMG
CGC/CNPJ: _____
ENDEREÇO: Avenida Antônio Carlos, 6627
CIDADE/ESTADO: Belo Horizonte/Minas Gerais/Brasil
TELEFONE/FAX: +55-31-409-2133
EMAIL: _____
REGISTRO NO MAPA: _____
(Se couber)

4. ESTABELECIMENTO DE PROCEDÊNCIA/ARMAZENAMENTO *(Se couber, ler item 4 para preenchimento):*

NOME OU RAZÃO SOCIAL: _____
CGC/CNPJ: _____
ENDEREÇO: _____
CIDADE/ESTADO: _____
TELEFONE/FAX: _____
REGISTRO NO MAPA: _____
(Se couber)

5. IMPORTADOR *(ler item 5 para preenchimento):*

NOME OU RAZÃO SOCIAL: Veterinaermedizinische Universitaet Wien
ENDEREÇO: Veterinaerplatz, 1
PO Box 1220
CIDADE/ESTADO/PAÍS: Vienna/Austria
TELEFONE/FAX: +43 1250773510
EMAIL: Stefanie.Wetzels@vetmeduni.ac.at

6. ESTABELECIMENTO DE DESTINO *(ler item 6 para preenchimento):*

NOME OU RAZÃO SOCIAL: Veterinaermedizinische Universitaet Wien
CGC/CNPJ: _____
ENDEREÇO: Veterinaerplatz, 1
PO Box 1220
CIDADE/ESTADO: Vienna/Austria
TELEFONE/FAX: +43 1250773510
EMAIL: Stefanie.Wetzels@vetmeduni.ac.at

7. TRANSPORTE *(ler item 7 para preenchimento):*

MEIO DE TRANSPORTE: Avião
EMPRESA AÉREA - Nº DO VOO / NOME DO NAVIO / Ainda não foi definido
PLACA DO VEÍCULO RODOVIÁRIO: _____

DATA PROVÁVEL DE EMBARQUE

Maio de 2017

UNIDADE/SERVIÇO DE VIGILÂNCIA AGROPECUÁRIA
INTERNACIONAL DE EGRESSO DO BRASIL

Aeroporto Internacional Tancredo Neves, Confins, MG

PAÍS DE DESTINO:

Austria

LOCAL DE DESEMBARQUE NO PAÍS DE DESTINO

Schwechat Flughafen, Wien

PAÍS DE TRÂNSITO (QUANDO HUVER):

8. TERMO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA PELA QUARENTENA (Se couber, ler item 8 para preenchimento):

EU, _____ CRMV Nº _____

DECLARO QUE ASSUMO A FUNÇÃO DE RESPONSÁVEL TÉCNICO PELA QUARENTENA DOS ANIMAIS ESPECIFICADOS NESTE REQUERIMENTO E RESPONSABILIZO-ME PELA TRANSMISSÃO DAS INFORMAÇÕES REFERENTES A OCORRÊNCIAS SANITÁRIAS E ÓBITOS (QUANDO HOVER), ALÉM DE FORNECER, POR MEIO DE ATESTADOS, OS RESULTADOS DE ENSAIOS LABORATORIAIS, VACINAÇÕES, TRATAMENTOS, DENTRE OUTRAS INFORMAÇÕES QUE FOREM REQUERIDAS PELO MAPA.

Estabelecimento para Isolamento/Quarentena:

ENDEREÇO: _____
CIDADE/ESTADO: _____
TELEFONE/FAX: _____
EMAIL: _____

ASSINATURA: _____

9. CONTATO PARA ESCLARECIMENTOS E OUTROS FINS: (ler item 9 para preenchimento):

O IMPORTADOR REPRESENTANTE LEGAL OUTRO:

NOME OU RAZÃO SOCIAL: Marcelo Resende de Souza
ENDEREÇO: Avenida Antônio Carlos, 6627
CIDADE/ESTADO: Belo Horizonte, Minas Gerais
TELEFONE/FAX: +55-31-99942-1091
EMAIL: Marceloresende51@gmail.com

10. DOCUMENTOS ANEXOS OU A SEREM ANEXADOS (ler item 10 para preenchimento):

- a. CÓPIA DA FATURA PRÓ-FORMA IDENTIFICANDO A MERCADORIA
- b. DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO
- c. CÓPIA DA PROCURAÇÃO PASSADA PELO IMPORTADOR
- d. LICENÇA DE EXPORTAÇÃO DO IBAMA
- e. TERMO DE FECHAMENTO DE QUARENTENA, EMITIDO POR FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO
- f. RESULTADOS DE ENSAIOS LABORATORIAIS, VACINAÇÕES E TRATAMENTOS, CONFORME SOLICITAÇÃO DO PAÍS IMPORTADOR
- g. AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO EMITIDA PELO PAÍS IMPORTADOR
- h. ATESTADO EMITIDO POR MÉDICO VETERINÁRIO QUE PERMITA CERTIFICAR AS EXIGÊNCIAS DO PAÍS IMPORTADOR
- i. DECLARAÇÃO EMITIDA PELO INTERESSADO QUE PERMITA CERTIFICAR AS EXIGÊNCIAS DO PAÍS IMPORTADOR
- j. COMPROVAÇÃO DE CADASTRO DE PESSOA FÍSICA OU JURÍDICA
- k. OUTROS: ESPECIFICAR

..... DE DE

MARCELO RESENDE DE SOUZA 
NOME E ASSINATURA DO REQUERENTE / REPRESENTANTE LEGAL