

**CÉSAR LÚCIO LOPES DE FARIA JÚNIOR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LACTICAS PRESENTES  
EM AMOSTRAS DE PINGOS DAS REGIÕES DA SERRA  
DA CANASTRA E DA SERRA DO SALITRE UTILIZANDO  
MÉTODOS DEPENDENTES E INDEPENDENTES DE  
CULTIVO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
BELO HORIZONTE**

**2007**

CÉSAR LÚCIO LOPES DE FARIA JÚNIOR

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LACTICAS PRESENTES EM  
AMOSTRAS DE PINGOS DAS REGIÕES DA SERRA DA CANASTRA  
E DA SERRA DO SALITRE UTILIZANDO MÉTODOS DEPENDENTES  
E INDEPENDENTES DE CULTIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

As culturas iniciadoras naturais (“pingos”), essenciais ao desenvolvimento do sabor e aroma dos queijos, utilizadas na fabricação dos queijos Minas artesanais das regiões da Serra da Canastra e da Serra do Salitre são usadas durante o processo de fabricação dos queijos de maneira empírica. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar a comunidade bacteriana presente em amostras de “pingos” provenientes das regiões da Serra da Canastra e da Serra do Salitre utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo. As amostras de “pingo” foram coletadas em três propriedades rurais de cada região. As espécies identificadas em altas contagens populacionais pelo método dependente de cultivo de pingos da Serra da Canastra, foram: *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus cereus*-similar, na propriedade rural A; *L. lactis* e *B. cereus*-similar, na propriedade B; *B. cereus* e *B. cereus*-similar, na propriedade C. Para a Serra do Salitre, as espécies prevalentes nas três fazendas foram *L. lactis* e *B. cereus*-similar. Já pelo método independente de cultivo as espécies encontradas na Serra da Canastra (duas propriedades estudadas por este método) foram: *L. lactis* e *Streptococcus salivarius*, na propriedade rural A; *L. lactis*, *B. cereus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides* e uma espécie semelhante a bactéria não cultivável (EF051484–nº GenBank), na propriedade B. Nas duas propriedades estudadas por este método na região da Serra do Salitre, as espécies prevalentes foram: *L. lactis* e uma espécie semelhante ao clone de bactéria não cultivável (AY668120–nº Genbank), na propriedade D; e *L. lactis*, *Lactococcus garviae*, *L. mesenteroides*, *Vagococcus carniphilus* e os clones de bactérias não cultiváveis com os códigos de acesso (Genbank) EF071401, AY911184, AY960268, DQ343062 e DQ342413, na propriedade E. A comparação entre a frequência de espécies identificadas pelo método dependente de cultivo e àquela obtida pelo método independente de cultivo mostrou diferenças significativas entre a composição das comunidades bacterianas nas amostras de “pingo” de uma mesma região e entre regiões diferentes.

## Abstract

Natural starter cultures (pingos) are essential to development of chesse flavor, and they are used in a empirical way during the manufacture of artisanal Minas cheese produced in the regions of Serra da Canastra and Serra do Salitre. The objective of this work was to identify the bacterial community present in pingo samples from Serra da Canastra and Serra do Salitre by dependent and independent-cultivation methods. Pingo samples were collected from three farms at each region. The species identified in high counting number by dependent culture method at Serra da Canastra were: *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* – like, at farm A; *Lc. lactis* and *B. cereus*-like, at farm B; *B. cereus* and *B. cereus*-like, at farm C. At Serra do Salitre, prevalent species were *Lc. lactis* and *B. cereus*-like at the three farms studied. On the other hand, by independent-cultivation method the species found at Serra da Canastra (two farms were sampled by this method) were: *Lc. lactis* and *Streptococcus salivarius*, at farm A; *Lc. lactis*, *B. cereus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides* and a species similar to uncultured bacteria (EF051484- Genbank number), at farm B. In the two farms studied by this method in Serra do Salitre, prevalent species were: *Lc. lactis* and a species like an uncultured bacterial clone (AY668120 – GenBank number), at farm D; *Lc. lactis*, *Lactococcus garviae*, *Le. mesenteroides*, *Vagococcus carniphilus* and the uncultured bacterial clones similar to those deposited in GenBank with accession numbers EF071401, AY911184, AY960268, DQ343062 and DQ342413, were obtained at farm E. The comparison between frequency of species identified by cultivation dependent method and that obtained by independent-cultivation method showed significant difference among the species composition of bacterial communities present in pingos at same region and from different regions.

## 1. Relevância e Justificativa

Os produtos agrícolas tradicionais fazem parte da cultura de um povo e constituem um patrimônio a ser preservado como testamento do passado. Resultantes da ação dos elementos naturais (clima, vegetação, etc.) e ação humana, esses produtos, embora marcados pelo passado, devem evoluir sem cessar para que continuem atendendo as exigências crescentes do mercado consumidor. Em vários países, sobretudo na Europa, os queijos artesanais adquirem um lugar privilegiado no patrimônio gastronômico e cultural. Juntamente com os queijos de leite cru, eles deram à França sua notoriedade de “país do queijo”. Esta reputação vem acompanhada das necessárias garantias de segurança e higiene a que o consumidor tem direito

No Brasil, o queijo Minas artesanal, pela sua importância na história e identidade cultural do povo mineiro, foi tombado pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (IEPHA-MG), aumentando assim a consciência sobre os bens históricos de Minas Gerais. As etapas sequenciais de produção do queijo Minas artesanal são: obtenção do leite cru integral; filtração através dos tecidos; adição de pingo e coalho líquido; coagulação; quebra da coalhada com pás ou colheres grandes; mexedura; repouso e decantação por alguns minutos; dessoragem retirando 2/3 do soro (uso de balde); moldagem em formas plásticas sobre mesa dessoradora; prensagem manual; primeira salga; segunda salga; coleta do pingo; remoção do excesso de sal; secagem em formas; desenformagem e armazenamento à temperatura ambiente.

Acredita-se que as bactérias lácticas presente nos pingos (soro - fermento natural característico da região) utilizados na produção do queijo Minas artesanal são fundamentais para desenvolvimento do sabor e aroma do mesmo, durante o período de maturação do queijo Minas artesanal. Assim sendo, este trabalho é relevante, pois visa identificar as bactérias lácticas presentes em amostras de pingo de duas importantes regiões produtoras de queijo Minas artesanal (Serra da Canastra e Serra do Salitre) levando ao

fornecimento de dados sobre as culturas iniciadoras naturais (pingos), as quais são usadas de maneira empírica. O uso de métodos moleculares dependentes e independentes de cultivo para identificação das bactérias lácticas presentes nas amostras de pingo, justifica este trabalho, uma vez que fornece um meio de identificar tanto as espécies cultiváveis quanto as não cultiváveis. Os resultados do mesmo podem levar a uma compreensão melhor da diversidade de espécies bacterianas que compõe as amostras de pingo características de cada região.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Considerações Gerais**

Os processos de fabricação de queijos tiveram origem há mais de 8.000 anos e atualmente existem mais de 1.000 tipos de queijos em todo mundo, cada um deles com características únicas em relação à forma, textura e sabor. A produção dos diversos queijos compreende técnicas que transformam grande parte dos componentes num produto de fácil conservação, com menor quantidade de água, grande valor nutritivo e sabor agradável. A maioria dos queijos é produzida a partir da combinação de quatro ingredientes: leite, renina, microrganismos e sal, por meio de uma série de etapas das quais fazem parte a coagulação, a produção de ácidos, a dessoragem, a salga e a maturação. Variações na especificação desses ingredientes e nas etapas de processamento levam à obtenção dos mais variados tipos de queijos (Beresford et al., 2001).

No Brasil, a fabricação de queijos é relativamente recente, firmando-se do ponto de vista industrial no início do século XX, sobretudo a partir da década de 20, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses no sul de Minas e holandeses na região de Santos Dumont e Barbacena (Furtado, 1991). Em Minas Gerais, cuja produção leiteira representa 30% da produção nacional, destaca-se dentre os derivados do leite: o queijo Minas artesanal, bastante difundido e comercializado no Brasil.

### **2.2 O queijo**

O queijo é um produto obtido de leite integral padronizado, magro ou desnatado, coagulado natural ou artificialmente. Pode ser adicionado ou não de substâncias permitidas na legislação específica e submetido às manipulações necessárias para a formação das características próprias (Brasil, 1996).

O Ministério da Agricultura do Abastecimento e Reforma Agrária, em atendimento ao Mercosul, estabeleceu o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos produtos lácteos. Define-se como queijo fresco aquele que está pronto para o consumo, logo após sua fabricação e por queijo maturado aquele

que sofreu trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade considerada, por um período igual ou superior a 15 dias (Pereira et al., 1999b). No caso de queijos fabricados com leite higienizado e não pasteurizado, o processo de maturação deve ser realizado a uma temperatura de 5 °C, durante um tempo não inferior a 60 dias (Brasil, 1998a).

Os queijos são classificados pela legislação levando-se em consideração além do período de maturação, as seguintes características:

#### I. Teor de umidade:

- queijos de baixa umidade (conhecidos como de massa dura): umidade até 35,9%;
- queijos de média umidade (geralmente conhecidos como de massa semi-dura): umidade entre 36,0% e 45,9%;
- queijos de alta umidade (geralmente conhecidos como “macios” ou de massa branda): umidade entre 46,0% e 54,0%;
- queijos de muito alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou “mole”): umidade não inferior a 55,0%.

#### II. Conteúdo de matéria gorda:

- extra gordo ou duplo creme: quando contém o mínimo de 60,0%;
- gordos: quando contém entre 45,0 e 59,9%;
- semi-gordo: quando contém entre 25,0 e 44,9%;
- magros: quando contém menos de 10,0%.



### III. Tratamento térmico da massa:

- queijos de massa crua: a massa não sofre nenhum aquecimento além do necessário à coagulação do leite;
- queijos de massa semi cozida: são aqueles cuja massa é aquecida no máximo até 42 °C;
- queijos de massa cozida: a massa é tratada acima de 42 °C;
- queijos de massa filada: a massa sofre um tratamento complementar a uma temperatura superior a 70 °C;
- queijos de massa fundida: são aqueles obtidos pela fusão a quente de um ou mais tipos de queijos, com a adição de sais fundentes, acidulantes e condimentos.

Essa classificação aplica-se a todos os queijos e não impede o estabelecimento de denominações e requisitos mais específicos, característicos de cada variedade de queijo e que aparecem geralmente nos padrões individuais. A identidade de cada queijo deverá obedecer às definições químicas, físicas e sensoriais de cada variedade. As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o regulamento do Mercosul sobre as condições higiênicas sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos que elaboram alimentos (Reis, 1998).

### **2.3 O queijo Minas artesanal**

O queijo Minas artesanal surgiu em meados do século XVIII, durante a “corrida do ouro”, quando um grande número de pessoas se deslocou para o interior mineiro a partir das demais regiões do país (Vargas et al., 1998). A produção de queijos artesanais no Brasil iniciou-se no período colonial por portugueses que traziam consigo rebanhos bovinos. Os animais tinham parte de sua escassa produção leiteira destinada à fabricação de um tipo de queijo

semelhante ao da Serra Estrela português. A diferença básica entre o queijo português e o produzido no Brasil é o tipo de material usado para a coagulação do leite. Em Portugal eram utilizados extratos de flores e brotos que no Brasil foram substituídos por estômago seco e salgado de bezerro ou de cabrito. (Vargas et al., 1998).

Atualmente a produção de queijos em Minas Gerais é muito representativa no contexto nacional. Em 2001, o Brasil produziu 394.175 toneladas de queijos sob inspeção federal e presumi-se que a produção informal tenha sido ainda maior. Calcula-se que a participação mineira seja equivalente a 42% do total, o que representa 165.554 toneladas. Soma-se a esse total o queijo Minas artesanal, cuja produção foi estimada em 42,2 mil toneladas por ano (INDI, 2002).

A fabricação de queijos a partir de leite cru é mais comum em regiões montanhosas devido à dificuldade de transporte do leite. As áreas planas, em geral, possuem maiores facilidades de transporte, o que motiva os produtores a enviar seu leite a laticínios ou cooperativas.

Segundo a definição do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Origem Animal (Brasil, 1998a), o queijo Minas Padrão é o produto obtido do leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensado mecanicamente e devidamente maturado durante 20 dias. Embora a pasteurização do leite permita melhorar a qualidade do queijo Minas a prolongar a vida de prateleira, este continua a ser produzido de forma artesanal (com leite cru) e em quantidade expressiva em algumas regiões de Minas Gerais (Oliveira, 1999).

Segundo a Lei 14.185 (IMA, 2002), é considerado queijo Minas artesanal o queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem e que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas. Em função da política de pagamento do leite, os produtores têm preferido produzir o queijo Minas na própria fazenda, não tendo qualquer assistência, o que resulta na obtenção de um produto de composição e características bastante variadas,

comprometendo sua qualidade final e acarretando problemas na sua comercialização.

Os queijos artesanais, quando obtidos do leite oriundo de vacas sadias mantidas sobre pastos naturais, apresentam características de segurança sanitária, mesmo quando o tempo de cura é bem reduzido e a atividade de água no produto acabado é bem elevada (Vargas et al., 1997). Contudo, a manutenção de vacas sadias depende de fatores como: I. abundância de massa verde disponível para os animais, II. manejos operacional e zootécnico do rebanho e III. nível da imunidade conservada ou imputada pelo rebanho (Pereira et al., 1993; Vargas et al., 1997).

Uma das características de fabricação deste queijo é a utilização do pingão, resultante da dessoragem dos queijos e coletado de um dia para o outro. Esse soro coletado contém várias espécies de bactérias lácticas responsáveis por conferir características típicas desta classe de queijo, além de inibir fermentações indesejáveis (Furtado, 1980).

### **2.3.1 O queijo Minas artesanal da Serra da Canastra**

O queijo Minas da Serra da Canastra é fabricado a dezenas de anos, de maneira empírica e tradicional, com leite cru, nos municípios de Tapira, Vargem Bonita e regiões próximas, tendo como centro polarizador o município de São Roque de Minas, onde este produto tem as características mais representativas. As características micro-climáticas da região possibilitam a interação de condições e agentes que proporcionam o sabor característico e singular do produto. De acordo com os dados do IMA (1999), foram cadastrados cerca de 830 produtores na Serra da Canastra, responsáveis pela produção de 373,5 toneladas de queijo por mês (Borelli, 2006).

O queijo Minas curado da Serra da Canastra é o principal ingrediente na fabricação do pão de queijo e é indicado pelos pequenos e médios produtores como sendo o mais adequado em virtude do sabor picante e aroma amanteigado moderado, características que conferem sabor peculiar ao produto (Oliveira, 1999). No entanto, entre as dificuldades apontadas pelos produtores de pão de queijo, encontram-se as qualidades higiênico-sanitária e sensorial do queijo Canastra. Uma vez que o queijo é produzido de forma

artesanal, este não apresenta uniformidade em suas propriedades físico-químicas e organolépticas, o que dificulta a padronização do pão de queijo.

### **2.3.2 O queijo Minas artesanal da Serra do Salitre**

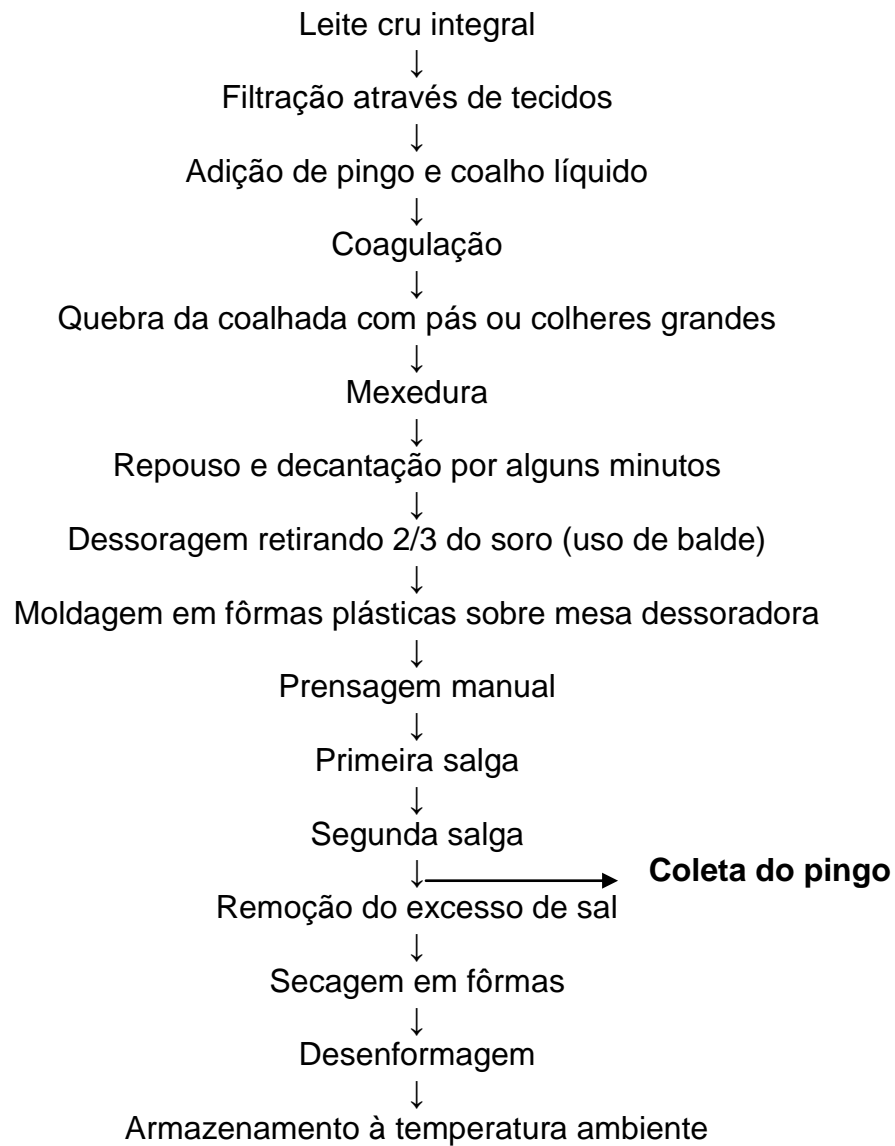
Localizado na região do Alto Paranaíba, o município da Serra do Salitre é uma zona muito conhecida na fabricação de queijos artesanais. Sua produção, em torno de 129 ton./mês, proveniente de 260 queijarias, é comercializada como queijo Araxá, originário do município de Araxá.

A comunidade de Catulé possui 95 queijarias e contribui com 1/3 da produção do município da Serra do Salitre. Organizados por meio de uma Associação Comunitária ativa na defesa dos interesses de seus associados, estes produtores estão constituindo uma cooperativa que deverá no futuro, cuidar do abastecimento de insumos e comercialização do queijo. Atualmente a comercialização faz-se pelos atravessadores (queijeiros), de forma semelhante às demais regiões produtoras de queijos Minas artesanais (Lima, 2005).

Normalmente os queijos são produzidos em uma dependência ou cômodo situado nas proximidades da casa ou do curral, conhecida na região como queijaria. A produção da semana acumula-se em prateleiras de madeira e semanalmente é vendida por queijeiros e transportada para a cidade de São Paulo e interior de Minas Gerais (Furtado, 1980). O transporte dos queijos é feito por meio de caminhonetes e caminhões, todos com carroceria aberta, representando risco para quem os comercializa e para o consumidor (Lima, 2005).

### **2.4 Tecnologia de fabricação**

O queijo Minas artesanal é produzido a partir de leite cru, na própria fazenda, sem acompanhamento tecnológico, resultando na obtenção de um produto de composição variada, e características de sabor, aroma, corpo e textura bastante diferenciados, o que pode comprometer a qualidade final (Siqueira et al., 1986). A cozinha, onde o queijo é produzido, é geralmente caracterizada por uma construção simples, de alvenaria, quase nunca azulejada, situada nas proximidades do curral. Para a fabricação dos queijos,



**Figura 1:** Fluxograma das etapas de fabricação do queijo Minas artesanal

utiliza-se o leite cru recém-ordenhado e geralmente não se mistura o leite ordenhado a tarde àquele ordenhado pela manhã, por receio da ocorrência de um defeito conhecido como estufamento precoce. Algumas fazendas fazem duas fabricações, uma com o leite da manhã e outra com o leite da tarde (Lima, 2005; Borelli 2006).

O leite é coado em panos, diretamente dentro de um barril de plástico onde a fabricação é realizada. Em seguida, adiciona-se o coalho, dissolvido no pingão, e então o leite é misturado. O pingão é um soro-fermento muito peculiar e característico da região. Ele é coletado durante a noite a partir do soro que escorre dos queijos cobertos com sal grosso. Dessa forma, a microbiota bacteriana nativa é bastante tolerante ao sal. A quantidade de pingão adicionada varia entre 0,2 a 0,5 litro para cada 100 litros de leite. Após a adição do pingão e do coalho, o leite é deixado coagular por um período de aproximadamente uma hora. Em seguida, a coalhada é quebrada, rusticamente, com o auxílio de uma pá de madeira ou plástico, e são obtidos grãos de tamanhos irregulares submersos em um soro geralmente leitoso ou amarelado. A coalhada é deixada para decantar por 10 a 15 minutos para que ocorra a liberação do soro (Lima, 2005; Borelli 2006).

A massa coagulada decantada é coletada em peneiras e prensada manualmente, em formas de plástico; em algumas fazendas a massa é prensada no interior de panos. A bancada é lavada com água corrente para a retirada dos restos de soro ou massa. Os queijos são cobertos com sal grosso e deixados em repouso por 5-6 horas. Um recipiente é colocado no piso, logo abaixo do furo existente na porção inclinada da bancada, para a coleta do soro que será utilizado como pingão no dia seguinte. Após o repouso inicial (5-6 horas), o sal grosso é removido da superfície dos queijos e estes são virados, recobertos com sal e deixados, na mesma posição, até o dia seguinte (Lima, 2005; Borelli 2006).

O sal, então, é removido e os queijos são mantidos nas formas onde ficam secando por mais 24 horas. Os queijos são retirados das formas e levemente raspados, com o auxílio de um ralinho, para que a casca fique bem fina. Os queijos são colocados em prateleiras e virados todos os dias. Estes são mantidos curando nas prateleiras à temperatura ambiente por até 10 dias,

ou de acordo com a demanda dos consumidores, sendo até mesmo comercializados frescos (Lima, 2005; Borelli, 2006).

O queijo Minas artesanal possui formato cilíndrico, com aproximadamente 14 cm de diâmetro e altura variando entre 4 e 6 cm. A casca é esbranquiçada, tendendo a se transformar em uma crosta fina e amarelada quando o queijo é curado por alguns dias. Internamente a massa é branca e consistente, às vezes ligeiramente quebradiça. O queijo apresenta olhaduras mecânicas de pequeno tamanho e algumas vezes, pequenas olhaduras irregulares. Devido ao processo de fermentação natural acentuado, a coalhada, mesmo não sendo prensada sofre uma dessoragem espontânea, o que resulta em queijos mais firmes e secos que outros de fabricação similar (IMA, 1999). O sabor é bastante típico e acentuadamente mais ácido que o do queijo Minas industrial (Furtado, 1991). Como não existe padronização no processo de fabricação quanto ao tempo de coagulação, tipo de coalho utilizado, prensagem, salga e teor de umidade do produto final, pode-se encontrar no mercado, uma grande variedade de queijos artesanais que não obedecem a qualquer padrão de identidade e qualidade (Borelli, 2006).

## **2.5 As bactérias do ácido láctico (BAL)**

As bactérias do ácido láctico são um grupo natural de bactérias Gram positivas, não móveis, não formadores de esporos, em geral catalase negativo, anaeróbias facultativas, bastonetes, cocos e cocobacilos fermentadores de carboidratos e álcoois originando principalmente ácido láctico como produto final da fermentação (Axelsson ,1998 apud Savijoki et al., 2006). A classificação taxonômica atual reconhece os seguintes gêneros de BAL: *Lactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Brochotrix*, *Pediococcus* e *Tetragenococcus* (Stlies & Holzapfel, 1997). Duas principais vias de fermentação de açúcar podem ser distinguidas entre as BAL. A via glicolítica (via Embden-Meyerhof-Parnas) que resulta em ácido láctico como produto final sendo denominada fermentação homoláctica. Na fermentação heteroláctica ocorre a via 6-fosfogluconato/fosfoquetolase, a qual resulta em quantidades

significativas de outros produtos finais como: etanol, acetato e CO<sub>2</sub> em adição ao ácido láctico produzido.

As BAL têm aplicações na fabricação de vários alimentos, bebidas e rações (Leroy & Devuyst, 2004 apud Savijoki et al., 2006). Além disso, certas linhagens de BAL, principalmente as linhagens do gênero *Lactobacillus* são comumente comercializadas como probióticos (Saxelin et al., 2005 apud Savijoki et al., 2006), outras linhagens do gênero *Lactobacillus* produzem peptídeos bioativos benéficos à saúde, a partir das proteínas do leite (Meisel & Bockelman 1999; Korhonen & Pihlanto 2003 apud Savijoki et al., 2006). Um outro ramo promissor das pesquisas usando BAL é o uso delas como veículo vacinal para moléculas com valor terapêutico (Nouaille et al., 2003 apud Savijoki et al., 2006). *Lactococcus lactis* é a BAL mais extensamente estudada e a segunda bactéria Gram positiva mais estudada em relação a sua genética, fisiologia e biologia molecular (Savijoki et al., 2006).

As bactérias lácticas são utilizadas como culturas iniciadoras comerciais para fabricação de vários alimentos fermentados por possuírem diversas características metabólicas tais como atividade proteolítica e de acidificação, síntese de bacteriocinas, resistência a bacteriófagos e produção de exopolissacarídeos (Ayad et al., 2004). Tais propriedades contribuem para o desenvolvimento do sabor, aroma, corpo e textura dos queijos assim como pode influir na proteólise e, em menor grau, na lipólise do queijo, fatores que contribuem para as características organolépticas do produto final (Kehagias et al., 1995; Oliveira, 1999). A produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas acidifica o leite auxiliando na formação do coágulo e dessoragem do mesmo (Oliveira, 1999). Assim os baixos valores de pH previnem o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores nos produtos lácteos. Indubitavelmente a aplicação mais importante das BAL é o seu uso como cultura iniciadora na fabricação de vários produtos lácteos fermentados. Em particular *Streptococcus thermophilus*, *Lc. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. bulgaricus* são amplamente usadas como culturas iniciadoras e são de grande importância econômica. Nos processos de fermentação do leite o sistema proteolítico das BAL exerce papel chave porque ele possibilita que elas cresçam no leite, portanto assegurando uma fermentação bem sucedida. As BAL são microrganismos fastidiosos que requerem uma fonte exógena de



aminoácidos e peptídeos, os quais são fornecidos pela proteólise da caseína (Savijoki et al., 2006).

O melhor conhecimento da ecologia microbiana dos alimentos fermentados pode ter conseqüências diretamente aplicáveis na melhoria do processo. Uma destas seria a definição de uma cultura iniciadora microbiana para padronização dos processos fermentativos na fabricação de diferentes produtos (Sanni, 1993). Dentre as bactérias associadas com a fermentação para a produção de alimentos, as BAL são de suma importância. Giraud et al. (1993) selecionaram culturas iniciadoras de BAL no estudo da produção de Gari, com o isolamento de *Lb. plantarum* produtoras de  $\alpha$ -amilase e linamarase. No entanto, o uso de uma única cultura iniciadora no processo pode limitar a produção de substâncias organolépticas que vão influenciar na qualidade dos alimentos. O uso de culturas mistas, com propriedades fisiológicas e metabólicas complementares pode ser melhor para a obtenção de um produto com propriedades nutricionais e higiênicas desejáveis (Lacerda, 2006).

De acordo com Sanni (1993) e Kimaryo et al. (2000), o uso de culturas iniciadoras pode ser apropriado para o controle e otimização do processo de fermentação, para diminuir os problemas de variações da qualidade organoléptica de alimentos fermentados. Antes de introduzir culturas iniciadoras em fermentação em pequena escala, deve-se avaliar se as mesmas contribuem significativamente para melhoria no processo e qualidade do produto, principalmente em relação à acidificação rápida ou acelerada, fermentação mais uniforme, atributos sensoriais desejáveis, riscos higiênicos reduzidos e alimentos seguros (Holzapfel, 1997). A predominância de culturas iniciadoras é baseada, principalmente, no sucesso competitivo da cultura iniciadora em relação à microbiota natural, resultando em uma boa padronização das propriedades sensoriais do alimento fermentado (Nancy et al., 2001)

O pingão, utilizado como cultura iniciadora no processo de fabricação do queijo Canastra, possui grande importância tanto em nível tecnológico de fabricação, pois constitui uma importante fonte de bactérias lácticas, como também na contaminação do leite. Uma vez que a cultura láctica apresenta importante papel no desenvolvimento das características organolépticas do

queijo, é de grande importância que se conheça os microrganismos presentes no pingo. Leite et al. (1995), em estudo sobre culturas lácticas provenientes do pingo resultante da fabricação de queijo Minas Curado do Serro (Minas Gerais), isolaram linhagens de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Streptococcus*.

Freitas et al. (1995), analisando amostras de queijo Beira Baixa Picante, fabricado em Portugal, verificaram que as populações de bactérias lácticas estavam em torno de  $10^7$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônia por grama de queijo (ufc/g) ao longo do processo de maturação. Dahl et al. (2000) citam que as bactérias do ácido láctico foi o grupo dominante ao longo do processo de maturação do queijo português Serra da Estrela, alcançando populações entre  $10^7$  a  $10^9$  ufc/g. Addis et al. (2001), analisando amostras de queijo Camembert e “blue-veined”, produzidas na Austrália, observaram a presença de bactérias do ácido láctico em populações entre  $10^7$  a  $10^9$  ufc/g. Lima (2005), analisando amostras de queijo Minas da Serra do Salitre, observou populações em torno de  $10^5$  a  $10^9$  ufc/g de bactérias lácticas ao longo do processo de maturação. Borelli (2006) analisando amostras de queijo Minas da Serra da Canastra observou que as populações de BAL estavam em torno de  $10^2$  a  $10^8$  ufc/g ao longo do processo de maturação.

## **2.6 Identificação das bactérias lácticas por métodos moleculares dependentes e independentes de cultivo**

Os queijos artesanais produzidos com leite cru exibem propriedades sensoriais variadas e complexas (Cogan *et al.*, 1997). Os microrganismos estão envolvidos no processo de maturação dos queijos; além de influenciarem o sabor, o aroma e a qualidade higiênico-sanitária dos mesmos. A fim de compreender melhor o papel da microbiota no desenvolvimento das qualidades sensoriais dos queijos, a descrição do ecossistema microbiano em relação à composição e às propriedades fisiológicas das espécies devem ser determinadas. A metodologia convencional para descrever a diversidade microbiana consiste na enumeração de grupos microbianos em vários meios de cultura, seguida da identificação dos microrganismos dominantes por métodos taxonômicos baseados em provas fisiológicas e bioquímicas, além das

características morfológicas. A comunidade microbiana dos queijos artesanais feitos com leite cru é constituída por BAL e outras bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras (Borelli, 2006). As BAL são os microrganismos associados às fermentações mais amplamente estudados e vários métodos foram desenvolvidos para identificá-las. A identificação por características fenotípicas consome tempo e nem sempre é confiável. Conseqüentemente, os métodos moleculares baseados em análises de ácidos nucléicos são mais amplamente utilizados.

Em um trabalho realizado por Ward & Timmins (1999), as espécies *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* foram identificadas pela PCR com a utilização de iniciadores específicos para cada uma dessas espécies, baseados em diferenças da região V1 do gene 16S do rRNA. Em estudo realizado por Guarneri et al. (2001), linhagens de *Lb. brevis* obtidas de alimentos, principalmente de produtos lácteos, foram identificadas pela PCR utilizando iniciadores específicos para o gene 16S rRNA. O uso da técnica de polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) e seqüenciamento da região 16S do rDNA, para o estudo da dinâmica de populações de *Lactobacillus* em culturas naturais de soro de queijo, foi realizado por Cocconcelli et al. (1997). A RAPD foi realizada, pelos autores, com um iniciador de seqüência arbitrária para amplificar a região 5' do gene 16S rRNA. Em um estudo realizado por De Angelis et al. (2001) em queijos italianos Ewe, isolados de *Lactobacillus* mesófilos foram caracterizados genotipicamente pela RAPD. Giraffa et al. (2001) identificaram *St. thermophilus* utilizando iniciadores específicos para um fragmento intragênico do gene *lacZ* de *St. thermophilus*.

Na caracterização molecular das populações bacterianas presentes durante o processamento de queijo mussarela tradicional, realizado por Morea et al.(1999), foram utilizados a RAPD e o seqüenciamento da região 16S do rDNA. As diferentes linhagens isoladas foram identificadas como *Le. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Le. lactis*, *St. thermophilus*, *St. bovis*, *St. uberis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. graviae*, *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus carnosus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *E. sulphureus* e *Enterococcus* spp. Mannu et al. (1999) realizaram a tipagem de linhagens de espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* isoladas de queijo artesanal Pecorino Sardo por RAPD, perfil

eletroforético plasmidial e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Por meio da análise de RAPD foram identificados 30 diferentes biotipos, enquanto pela combinação dos resultados obtidos pelo perfil eletroforético plasmidial e PFGE foram observados 27 genótipos para 49 isolados de enterococos. Os autores deste trabalho sugerem que apenas uma combinação de diferentes técnicas é capaz de fornecer um quadro completo da ecologia das populações microbianas naturais dos produtos lácteos.

As técnicas moleculares independentes de cultivo permitem a identificação de microrganismos a partir da extração direta de ácidos nucléicos, sem a necessidade de isolamento e cultivo prévios. As espécies *St. thermophilus*, *Lc. lactis*, *E. faecalis*, *Le. lactis* e *Lb. delbrueckii* foram identificadas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) da região V3 do 16S rDNA, feita a partir de DNA total extraído de amostras de mussarela (Coppola et al., 2001). Espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*, presentes em amostras do alimento tradicional coreano fermentado feito com vários vegetais (kimchi), foram identificadas por meio de biblioteca de clones 16S rDNA e seqüenciamento da região 16S do rDNA feitos a partir da extração do DNA total (Kim & Chun, 2005). As espécies *Lc. lactis*, *St. suis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. alimentarium* e *Lb. delbrueckii* foram identificadas por meio de biblioteca de clones da região 16S do rDNA e seqüenciamento parcial da região 16S do rDNA a partir da extração de DNA total do pozol (uma farinha de milho fermentada mexicana) (Escalante et al., 2001).

A composição da flora bacteriana inicial de carne de porco e seu desenvolvimento após armazenamento a 4 °C por quatro dias, foram analisados por meio de biblioteca de clones da região 16S do rDNA. As espécies *Acinetobacter johnsonii*, *A. Iwoffi*, *A. radioresistens*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. succinus*, *Macrocooccus caseolyticus* e *Psycrobacter* sp. foram identificadas na carne fresca. Clones de seis gêneros diferentes, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Lactobacillus* e *Eperythrozoon* foram encontrados na carne armazenada (Olsson et al., 2003).

A diversidade bacteriana de dois queijos franceses macios foi analisada utilizando métodos independentes de cultivo (clonagem da região 16S do rDNA e polimorfismo de conformação de fita simples – SSCP) e método dependente

de cultivo. A composição da microbiota variou de acordo com o método utilizado, sendo que *Lc. lactis* susp. *cremoris* NCDO 607 foi identificada apenas por clonagem, *St. thermophilus* foi identificada pelos dois métodos, uma bactéria semelhante a *Vibrio* sp. foi identificada apenas por método independente de cultivo e *Carnobacterium maltaromaticum* BA apenas pelo método dependente de cultivo (Feurer et al., 2004).

Considerando-se a importância sócio-econômica dos queijos Minas artesanais da Serra da Canastra e da Serra do Salitre e o uso de maneira empírica dos pingos durante o processo de produção dos mesmos, torna-se relevante identificar as espécies de bactérias lácticas presentes neste tipo de fermento natural. Para isso, a utilização de métodos dependentes e independentes de cultivo que forneçam dados sobre as espécies indígenas características de cada região, de maneira mais completa e mais próxima da realidade, é essencial para que no futuro sejam desenvolvidas culturas iniciadoras padronizadas para ambas as variedades regionais de queijo Minas artesanal.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar as bactérias lácticas presentes em amostras de pingos provenientes das regiões da Serra da Canastra e da Serra do Salitre utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

**3.2.1** - Isolar e identificar as bactérias lácticas presentes em amostras de pingos provenientes de três fazendas da região da Serra da Canastra e de três fazendas da região da Serra do Salitre utilizando testes fisiológicos, análise de restrição do DNA ribossomal e seqüenciamento parcial da região 16S do DNA ribossomal (rDNA).

**3.2.2** - Identificar as bactérias lácticas presentes em amostras de pingos provenientes de três fazendas da região da Serra da Canastra e três fazendas da região da Serra do Salitre por métodos moleculares independentes de cultivo (biblioteca de clones da região 16S do rDNA e posterior seqüenciamento parcial da região 16S do rDNA);

**3.2.3** - Comparar a diversidade de espécies de bactérias encontradas nas duas regiões utilizando os dois métodos.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Amostragem**

As amostras de "pingo" foram coletadas em agosto de 2005 nas regiões da Serra da Canastra e da Serra do Salitre, sendo coletadas três amostras de cada região. As amostras foram transportadas em frascos estéreis em caixas de isopor contendo gelo para o Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, do Departamento de Microbiologia - ICB da UFMG, para análise em um período máximo de 24h. O volume de 25 mL de cada amostra foi utilizado para o isolamento das bactérias lácticas. O volume restante de cada amostra foi congelado em freezer -20 °C para realização posterior da extração de DNA total e identificação da comunidade bacteriana por meio da biblioteca de clones 16S rDNA e posterior seqüenciamento.

### **4.2 Isolamento e quantificação de bactérias lácticas**

O volume de 25 mL de cada amostra de "pingo" foi homogeneizado em frascos contendo 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril para obtenção da diluição inicial  $10^{-1}$ . A partir dessa foram realizadas as diluições decimais seriadas. As bactérias lácticas foram isoladas pelo plaqueamento de alíquotas de 0,1 mL das diluições  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe - Difco) para o isolamento de lactobacilos, estreptococos e lactococos. O meio foi acrescido do antifúngico benomyl a 0,01% (p/v). As placas foram incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose a 25°C por 3 a 5 dias (Siqueira, 1995). Após o crescimento, os diferentes morfotipos de bactérias foram contados e purificados em ágar MRS. Os isolados foram conservados em caldo MRS acrescido de glicerol 10% (v/v) em freezer -80 °C.

#### **4.2.1 Testes presuntivos para identificação de bactérias lácticas**

Para caracterização dos isolados de bactérias lácticas foram realizados os seguintes testes: observação microscópica da morfologia celular, coloração de Gram e produção de catalase (Norris *et al.*, 1981). O teste para produção de gás carbônico a partir da glicose foi feito em caldo MRS contendo tubo de Durham invertido (Müller, 1990), caracterizando os isolados em homofermentativos ou heterofermentativos. Os seguintes testes foram realizados para agrupar os isolados em nível de gênero: crescimento a 10 °C durante sete dias, crescimento a 45 °C por 48 h, hidrólise de esculina, hidrólise de arginina e crescimento em caldo MRS contendo 2, 4 e 6,5% (p/v) de NaCl (Parente *et al.*, 1997).

#### **4.2.2 Identificação dos isolados de bactérias lácticas por análise de restrição do DNA ribossomal (ARDRA) e seqüenciamento parcial da região 16S do DNA ribossomal (rDNA)**

Após a realização dos testes presuntivos, as bactérias lácticas foram agrupadas de acordo com as semelhanças morfológicas e fisiológicas; as bactérias foram identificadas por ARDRA e/ou seqüenciamento parcial do 16S rDNA. Os isolados foram identificados em nível de espécie por amplificação pela PCR das regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S rDNA usando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* que se anelam nos genes 16S e 23S, seguido da análise do perfil de restrição dos produtos de PCR (Moreira *et al.*, 2005). O seqüenciamento parcial da região 16S do DNA ribossomal (rDNA) foi realizado para confirmar as identificações obtidas pela ARDRA e para identificar os isolados não identificados pela ARDRA (Morlon-Guyot *et al.*, 1998).

##### **4.2.2.1 Extração de DNA dos isolados de bactérias lácticas**

O DNA cromossômico foi extraído dos isolados crescidos em 10 mL de meio MRS. Após lavar as células com 10 mL de água deionizada estéril, o precipitado foi resuspenso em 1 mL de LiCl 5M e incubado 1h sob agitação a



180 rpm a 25 °C. As células foram lavadas com 1 mL de água deionizada estéril e o precipitado foi resuspenso em 1 mL de tampão protoplastificante (sacarose 25 mM; Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 10 mM; 10 mg de lisozima/mL; 100 µg de RNaseA/mL). Após incubação por 1h a 37 °C e centrifugação por a 13.000 rpm em microcentrífuga por 5 min., o precipitado foi resuspenso em tampão protoplastificante sem sacarose e lisozima; 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) foram adicionados para permitir a lise celular. A mistura foi extraída duas vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com isopropanol e dissolvido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM) (MOREIRA *et al.*, 2005).

#### **4.2.2.2 Amplificação pela PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S do rDNA**

A amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S do rDNA foi realizada usando os iniciadores: 16-1A (5´-GAATCGCTAGTAATCG-3´) correspondente à região entre os nucleotídeos 1361 a 1380 do 16S rDNA de acordo com a numeração do *Lactobacillus casei* e o iniciador 23-1B (5´-GGGTTCCCCCATTCGGA-3´) correspondente à região entre os nucleotídeos 123 a 113 do 23S rDNA de *L. casei* (Moreira *et al.*, 2005). A mistura de reação de PCR (50 µL) foi feita com 10 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, tampão de reação contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Promega) e (50 a 500) ng de DNA molde. As reações foram feitas utilizando o termociclador *PCR Express* (Thermo Hybaid) sob as seguintes condições: 94°C por 2 min; 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 1 min, 72°C por 30 s; 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5X, visualizados em transiluminador com UV após coloração com brometo de etídio e fotografados pelo sistema de foto documentação (Moreira *et al.*, 2005).

#### **4.2.2.3 Digestão com enzimas de restrição**

As regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S foram digeridas usando um conjunto de 12 enzimas. As enzimas utilizadas foram: *Sph* I, *Nco* I, *Nhe* I, *Ssp* I, *Sfu* I, *Eco* RV, *Dra* I, *Vsp* I, *Hinc* II, *Eco* RI, *Avr* II e *Hind* III (Promega). A mistura de reação de digestão (10µL) foi feita com 3,5 µL de água deionizada estéril, 1 µL do tampão de reação 10X (Tris-HCl 60 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 60 mM e DTT 10 mM a 37°C), 1 µL de albumina bovina sérica (BSA) 0,1mg/mL, 5 U da enzima de restrição, 4 µL (~1 µg dos produtos de PCR). As reações de digestão foram feitas utilizando o termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) sob a seguinte condição: 37°C por 3 h. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5X, visualizados em transiluminador com UV após coloração com brometo de etídio e fotografados pelo sistema de foto documentação (Moreira et al., 2005).

#### **4.3.1 Extração de DNA total das amostras de pingo**

O DNA total foi extraído diretamente das amostras de "pingo" homogeneizando 1 mL de cada amostra em 9 mL de solução salina [NaCl 0,9% (p/v)], a seguir foi transferido 1,5 mL do volume para um tubo de microcentrífuga. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 min., o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi resuspenso em 600 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; sacarose 25 mM; 10 mg de lisozima/mL) e incubado a 37°C por 1 h. A seguir foi adicionado 0,6 µL de proteinase K (50µg/mL) e incubado a 56 °C por 1 h. Em seguida foi adicionado 60 µL de SDS 10% (p/v). A seguir o tubo de microcentrífuga foi colocado em nitrogênio líquido por 2 min e posteriormente em banho maria a 65 °C, sendo esse procedimento repetido três vezes. A mistura foi extraída duas vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após precipitação com isopropanol, o DNA foi dissolvido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 0,01mM) (Lacerda, 2006).

#### **4.3.2 Amplificação pela PCR da região 16S do DNA ribossomal**

O gene quase completo que codifica o 16S rRNA foi amplificado usando os iniciadores universais para o domínio *Bacteria*: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). A reação de PCR foi feita segundo Morlon-Guyot *et al.* (1998). A mistura de reação (50 µL) foi feita com 10 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, do tampão de reação 1X (Tris-SO<sub>4</sub> 600 mM pH 8,9; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 mM), 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,5 U Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polimerase : 0,5 U Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen) e (50 a 500ng) de DNA total molde. As reações foram feitas utilizando o termociclador *PCR Express* (Thermo Hybaid) sob as seguintes condições: 94°C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1min; 72°C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) conforme as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados a partir da leitura das absorbâncias a 260 nm. Os produtos de PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 0,5X, visualizados em transiluminador com UV após coloração com brometo de etídio e fotografados pelo sistema de foto documentação.

#### 4.3.3 Clonagem dos produtos de PCR 16S rDNA

Os produtos de PCR purificados foram ligados em vetor pGEM<sup>®</sup>T (Promega) segundo instruções do fabricante. As reações de ligação foram homogeneizadas e incubadas a 4 °C *overnight* para obtenção do número máximo de transformantes. A transformação foi feita com células *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) quimicamente competente, adicionando-se 50 µL de células *E. coli* XL1-Blue a 2µL de cada reação de ligação em tubo de microcentrífuga 0,6 mL estéril. Em seguida os tubos foram homogeneizados e colocados no gelo por 20 min. Após esse período as células sofreram choque térmico por 45 a 50 s em banho maria a 42 °C. Os tubos foram retornados para o gelo e deixados por 2 min. Os 52 µL (células e plasmídeos recombinantes) foram adicionados a 950 µL de caldo LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5g/L, pH 7,0) e incubados a 37 °C sob agitação (150 rpm) por 1h, para reativar as células. Após esse período o volume foi centrifugado a 13.400 rpm

por 2min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de caldo LB. A partir dessa suspensão alíquotas de 100 µL foram semeadas em placa de ágar LB, acrescido de ampicilina 100µg/mL, isopropil-tio-galactosídeo (IPTG) 0,5 mM e X-gal 80 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por um período máximo de 16 a 18 h para evitar o aparecimento de colônias satélites.

#### **4.3.4 Triagem dos clones positivos**

A triagem dos clones positivos foi realizada por meio de duas estratégias. Na primeira estratégia os clones brancos foram selecionados aleatoriamente das placas LB/X-gal/IPTG/ ampicilina <sup>100</sup> com auxílio de ponteiros estéreis. Esses clones foram transferidos para a microplaca de 96 poços fundos com 1,2 mL de meio 2 XYT (peptona 16g/L, NaCl 5g/L, extrato de levedura 10g/L) contendo ampicilina 100 µg/mL. Essas placas foram seladas com adesivo, furadas com agulha estéril para aeração e incubadas a 37 °C por 20 h. As placas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 6 min., e sobre o precipitado foi adicionado 240 µL do tampão de lise GET (glicose 20%, EDTA 0,5 M pH 8,0 e Tris-HCl 1M pH 7,4). O volume foi homogeneizado com auxílio do vortex e centrifugado a 4.000 rpm por 9 min. Sobre o sedimento foi acrescentado 80 µL da solução GET/RNase A(19,4 GET, 600µ L RNase A 10mg/mL), sendo o conteúdo homogeneizado e centrifugado a 4.000 rpm por 2 min. A seguir, foi transferido 80 µL da suspensão de células para outra microplaca de polipropileno de fundo redondo ( tipo ELISA). Sobre esse volume foi acrescentado o volume de 80L de NaOH 0,2N/ SDS 1% e 1 mL de NaOH 4M e 2 mL de SDS 10%, sendo a placa selada, homogeneizada 30 vezes por inversão e deixada a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, o volume de 80 µL de KOAc 3M (60 mL de 5M KOAc, 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água deionizada estéril) foi acrescido, homogeneizado e a placa invertida 30 vezes. Após esses procedimentos, a placa foi colocada em gelo por 10 min. e centrifugada a 4.000 rpm por 10 min. Uma placa Millipore (MAGV N22) foi fixada no topo de outra placa com fundo “V” de 250 µL e assim foi transferido todo o volume contido na placa de fundo redondo para a placa Millipore (MAGV N22), sem os debris celulares. As placas foram centrifugadas

sem a tampa a 4.000 rpm por 3 min para todo o volume ser filtrado, sendo transferido por centrifugação para a outra placa de fundo "V". Para a precipitação do DNA plasmidial, sobre o volume filtrado foram adicionados 100µL de isopropanol e centrifugado a 4.000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e lavado com álcool 70% gelado. Após secagem das placas, 60L de água deionizada estéril foi acrescentado, as placas foram seladas com adesivo e foram incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Após a extração do DNA plasmidial as construções foram digeridas com a enzima de restrição *Eco* RI para verificar a presença de inserto. A mistura de reação de digestão (10µL) foi feita com 3,5 µL de água deionizada estéril, 1 µL do tampão de reação 10X (Tris-HCl 60 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 60 mM e DTT 10 mM a 37°C), 1 µL de albumina bovina sérica 0,1mg/mL, 5 U da enzima de restrição, 4 µL (~1 µg dos produtos de PCR). As reações de digestão foram feitas utilizando o termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) por 3 h a 37 °C. Os produtos das reações de digestão com enzimas de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) em tampão TBE 0,5X, visualizados em transiluminador com UV após coloração com brometo de etídio e fotografados pelo sistema de foto documentação.

A segunda estratégia usada para triagem dos clones positivos foi realizada pela seleção aleatória de clones brancos a partir das placas LB/X-Gal/IPTG/ ampicilina<sup>100</sup> com auxílio de ponteiras estéreis; os clones foram repicados para *master plates* e inoculados em tubos de microcentrífuga de 0,2 mL contendo 20 µL do tampão de lise celular [Tris-HCl 10 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM e Tween 20 0,1% (p/v)] e homogeneizados. Os tubos foram incubados a 95 °C por 10 min e a 4 °C por 20 min. A seguir os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. Na reação de PCR de colônia foram utilizados 4 µL do sobrenadante, os iniciadores usados foram M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Invitrogen). A mistura de reação (20µL) foi feita com 10 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2 µL do tampão de reação contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Promega). As reações foram feitas utilizando o termociclador *PCR Express* (Thermo Hybaid) sob as seguintes condições: 94°C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão

TBE 0,5X, visualizados em transiluminador com UV após coloração com brometo de etídio e fotografados pelo sistema de foto documentação. Os clones positivos foram crescidos em 10 mL de caldo LB *overnight* e a seguir foi feita a extração do DNA plasmidial dos mesmos com o kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) segundo instruções do fabricante.

#### **4.4 Análise de seqüências e inferência filogenética**

As reações de seqüenciamento foram feitas com o kit de seqüenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle do sistema de análise de seqüência de DNA MegaBACE (Amersham Biosciences) em conjunto com o sistema de seqüenciamento automático MegaBACE 1000, segundo instruções do fabricante. O iniciador usado na reação de seqüenciamento foi o 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), somente uma fita de DNA dos insertos foi seqüenciada. O programa utilizado para reação de seqüenciamento: 95°C, 20 s, 55 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A precipitação e ressuspensão das amostras para injeção, foram realizadas segundo instruções do fabricante. As seqüências parciais do 16S rDNA obtidas em formato ESD foram compactadas em formato ZIP e analisadas pelo programa PHRED (Ewing & Green, 1998). As seqüências com valor de qualidade maior que 20 e com tamanho superior a 100 pb foram selecionadas para busca por regiões de similaridade local entre as seqüências de 16S rDNA obtidas das amostras de “pingo” e as seqüências de 16S rDNA depositadas no GenBank. Para tal, foi utilizado o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (blastn) versão 2.2.15 do BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) desenvolvido pelo NCBI (Altschul *et al.*, 1990). As seqüências parciais do 16S rDNA obtidas em formato ESD foram salvas no formato FASTA com o auxílio do programa Chromas Pro versão 1.34. A seguir, as seqüências salvas em formato FASTA foram editadas e alinhadas com seqüências de linhagens tipo de referência para comparação de identidade entre as seqüências por meio da utilização do programa DNAMAN versão 4.1. As melhores seqüências (maior tamanho e mais alta identidade em relação às linhagens tipo de referência) das espécies identificadas foram usadas para construção da árvore filogenética pelo método *Neighbour-Joining* (Saitou & Nei,

1987) por meio do programa MEGA versão 3.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 foi usada como grupo externo. A topologia da árvore foi avaliada por análise de *bootstrap* dos dados de seqüências baseada em 10.000 réplicas aleatórias.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Populações de bactérias lácticas (BAL) isoladas de amostras de pingo da Serra da Canastra e da Serra do Salitre

Um total de 17 isolados de bactérias lácticas (BAL) foi obtido das três amostras de pingo coletadas na região da Serra da Canastra. Na Serra do Salitre, 12 isolados de bactérias foram obtidos das três amostras de pingo coletadas. Para o agrupamento das bactérias foram realizados testes morfológicos e fisiológicos e posteriormente um isolado de cada grupo, por região amostrada, foi identificado por ARDRA e/ou seqüenciamento da região 16S do rDNA. Isto foi feito, pois os métodos taxonômicos utilizados, baseados na morfologia e provas fisiológicas, foram suficientes apenas para a identificação a nível de gênero das bactérias lácticas. As diferentes espécies de BAL apresentam nas regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S, sítios de restrição para diferentes enzimas, o que possibilitou a distinção das espécies com a técnica da ARDRA. De acordo com Moreira et al. (2005), várias espécies de *Lactobacillus*, além de outras espécies de bactérias lácticas pertencentes a outros gêneros, podem ser identificadas pela ARDRA.

Na tabela 1 são mostradas as populações de bactérias isoladas das amostras de pingo da Serra da Canastra. Na tabela 2 são mostradas as populações de bactérias isoladas das amostras de pingo da Serra do Salitre. Na tabela 3 e figuras 2, 3 e 4 são mostrados os perfis de restrição das populações de bactérias isoladas. Três perfis diferentes de digestão das regiões espaçadoras intergênicas foram obtidos. *Lactococcus lactis* apresentou apenas uma banda da região espaçadora intergênica 16S-23S, a qual foi digerida apenas pela enzima *Dra* I. Estas culturas foram confirmadas como sendo *Lc. lactis* após seqüenciamento parcial da região 16S do rDNA de dois isolados diferentes. Para esses dois isolados, foram obtidas seqüências de 700 pb e alto valor de identidade em relação às seqüências de *Lc. lactis* depositadas no GenBank. Os isolados de *Bacillus cereus* apresentaram quatro bandas amplificadas pela PCR, as quais foram digeridas pelas enzimas *Dra* I, *Hind* III e *Nhe* I. A identificação destas culturas como *B. cereus* foi confirmado pelo seqüenciamento parcial da região 16S do rDNA de dois isolados diferentes



**Tabela 1:** Média das populações de bactérias (ufc/mL) isoladas das três amostras de “pingo” da Serra da Canastra.

<b>Espécie</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Contagens populacionais (ufc/mL)</b>
<b>Propriedade Rural A</b>		
<i>Lactococcus lactis</i>	2	$3,8 \times 10^6$
<i>Bacillus cereus</i>	2	$3,7 \times 10^6$
<i>Bacillus cereus-similar*</i>	3	$2,5 \times 10^7$
<b>Propriedade Rural B</b>		
<i>Lc. lactis</i>	2	$4,5 \times 10^7$
<i>B. cereus-similar*</i>	3	$4,8 \times 10^7$
<b>Propriedade Rural C</b>		
<i>B. cereus-similar*</i>	4	$9,0 \times 10^7$
<i>B. cereus</i>	1	$5,5 \times 10^7$

\* = espécie filogeneticamente próxima da espécie indicada.

**Tabela 2:** Média das populações de bactérias (ufc/mL), pela ARDRA, isoladas das três amostras de pingo da Serra do Salitre.

<b>Espécie</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Contagens populacionais (ufc/mL)</b>
<b>Propriedade Rural D</b>		
<i>Lactococcus lactis</i>	3	$4,5 \times 10^7$
<i>Bacillus cereus</i> -similar*	1	$1,5 \times 10^6$
<b>Propriedade Rural E</b>		
<i>Lactococcus lactis</i>	3	$1,1 \times 10^7$
<i>Bacillus cereus</i> -similar*	1	$2,0 \times 10^7$
<b>Propriedade Rural F</b>		
<i>Lactococcus lactis</i>	3	$1,1 \times 10^6$
<i>Bacillus cereus</i> -similar*	1	$1,0 \times 10^8$

\* = espécie filogeneticamente próxima da espécie indicada.

**Tabela 3:** Identificação das espécies de bactérias pela análise do perfil de restrição das regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S do DNA ribossomal (ARDRA).

Espécie	Número de isolados	Enzimas <sup>a</sup>										
		<i>DraI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>HincII</i>	<i>HindIII</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SfuI</i>	<i>SphI</i>	<i>SspI</i>	<i>VspI</i>
<b>Propriedade rural A</b>												
<i>Lactococcus lactis</i>	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus-similar*</i>	3	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Propriedade rural B</b>												
<i>Lc. lactis</i>	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus-similar*</i>	3	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Propriedade rural C</b>												
<i>B. cereus-similar*</i>	4	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>B. cereus</i>	1	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

<sup>a</sup> = + e – significam, respectivamente, positivo e negativo para clivagem do produto de PCR pela enzima de restrição.

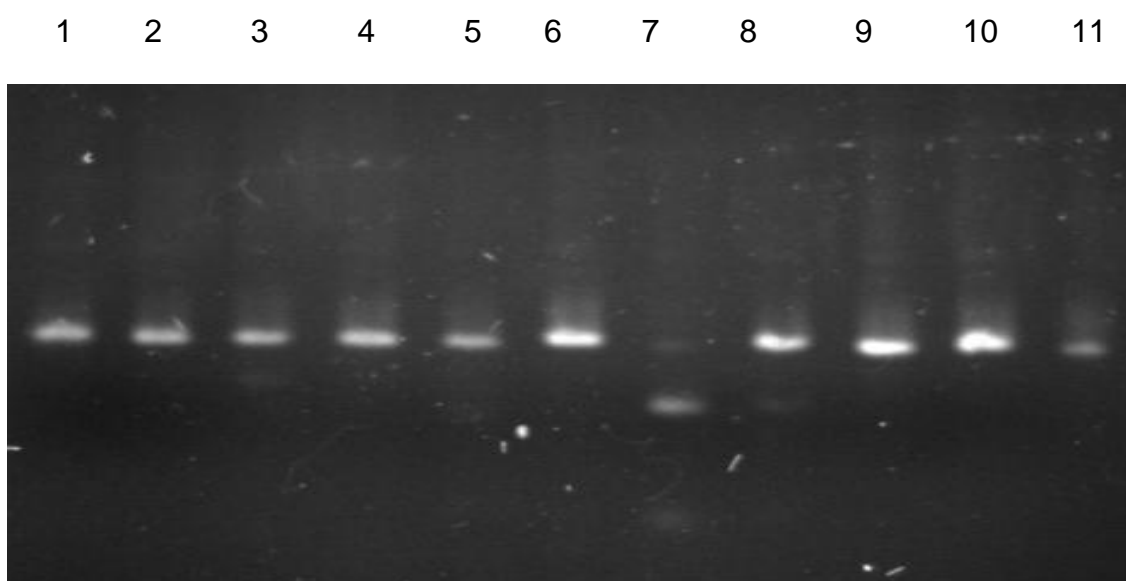
\*= espécie filogeneticamente próxima da espécie indicada.

**Tabela 3:** Identificação das espécies de bactérias pela análise do perfil de digestão das regiões espaçadora intergênicas 16S-23S do DNA ribossomal com enzimas de restrição.

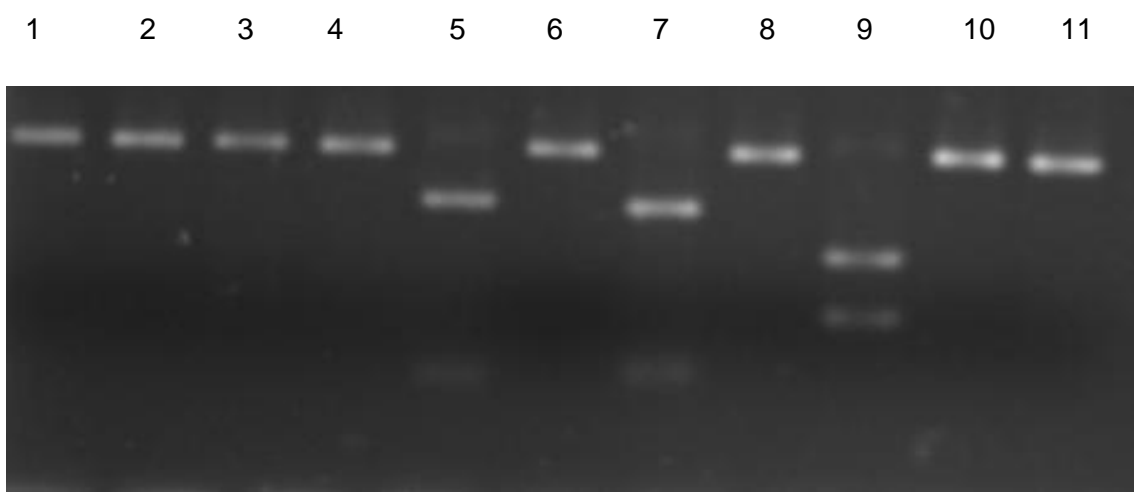
Espécie	Número de isolados	Enzimas <sup>a</sup>										
		<i>DraI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>HincII</i>	<i>HindIII</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SfuI</i>	<i>SphI</i>	<i>SspI</i>	<i>VspI</i>
<b>Propriedade rural D</b>												
<i>Lactococcus lactis</i>	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus-similar</i> *	1	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Propriedade rural E</b>												
<i>Lactococcus lactis</i>	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus-similar</i> *	1	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>Propriedade rural F</b>												
<i>Lactococcus lactis</i>	3	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus-similar</i> *	1	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-

<sup>a</sup> = + e – significam respectivamente positivo e negativo para clivagem do produto de PCR pela enzima de restrição.

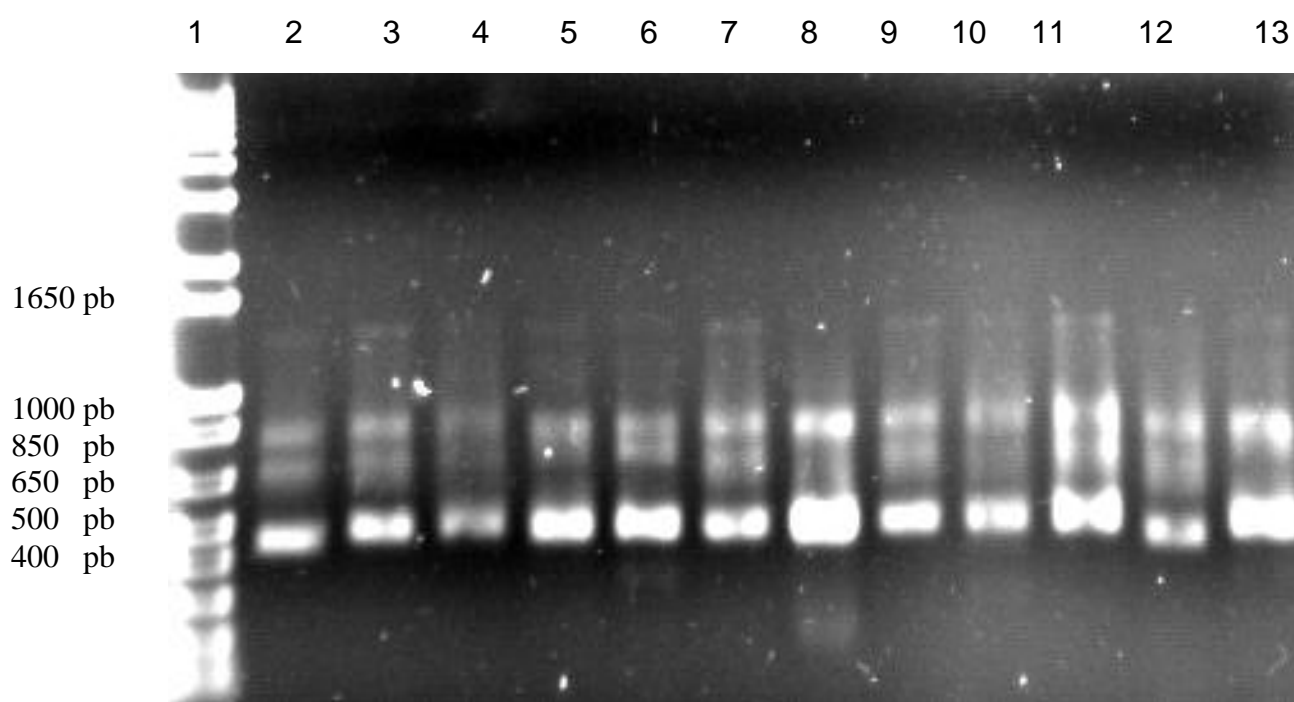
\* = espécie filogeneticamente próxima da espécie indicada.



**Figura 2** Perfil de digestão com enzimas de restrição do espaçador intergênico 16S-23S do rDNA de *Lactococcus lactis*, visualizado em gel de agarose 1% (p/V). Canaletas: 1 *Sph* I, 2 *Nco* I, 3 *Nhe* I, 4 *Ssp* I, 5 *Sfu* I, 6 *Eco* RV, 7 *Dra* I, 8 *Vsp* I, 9 *Hinc* II, 10 *Eco* RI, 11 *Hind* III.



**Figura 3** Perfil de digestão com enzimas de restrição do espaçador intergênico 16S-23S do rDNA de *Bacillus cereus*-similar, visualizado em gel de agarose 1% (p/v). Canaletas: 1 *Sph* I, 2 *Nco* I, 3 *Nhe* I, 4 *Ssp* I, 5 *Sfu* I, 6 *Eco* RV, 7 *Dra* I, 8 *Vsp* I, 9 *Hinc* II, 10 *Eco* RI, 11 *Hind* III.



**Figura 4:** Perfil de digestão com enzimas de restrição dos espaçadores intergênicos 16S-23S do rDNA de *Bacillus cereus*, visualizado em gel de agarose 1% (p/v) . Canaletas; 1 padrão 1 Kb, 2 *Sph* I,3 *Nco* I,4 *Nhe* I,5 *Ssp* I,6 *Sfu* I,7 *Eco* RV,8 *Dra* I,9 *Vsp* I,10 *Hinc* II,11 *Eco* RI,12 *Hind* III, 13 *Avr* II.

com o mesmo perfil de restrição. A espécie *Bacillus cereus* - similar apresentou apenas uma banda amplificada pela PCR a qual foi digerida com as enzimas *Sfu I*, *Dra I* e *Hinc II*. A análise da seqüência parcial da região 16S rDNA de um isolado com esse perfil revelou a relação próxima entre esta bactéria e *B. cereus*. Análises posteriores serão necessárias para definir se esses isolados representam uma espécie nova de bactéria, filogeneticamente próxima de *B. cereus*.

Na Serra da Canastra, foram isolados *Lc. lactis*, *B. cereus* e *B. cereus*-similar (tabela 1). Borelli (2006) isolou bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* e *Enterococcus*, a partir de amostras de leite, de pingo, de massa coagulada e de queijos com 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação coletadas na Serra da Canastra. A média das populações de bactérias lácticas (ufc/mL) descritas em amostras de pingo pela autora estão dentro da mesma faixa encontrada no presente trabalho ( $10^5$  a  $10^8$  ufc/mL). No entanto, as espécies isoladas das amostras de pingo de propriedades rurais amostradas pela autora foram diferentes das isoladas no presente trabalho. As espécies de bactérias lácticas isoladas pela autora, e também identificadas utilizando a técnica do ARDRA, foram *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *P. acidilactii*, *W. paramesenteroides* e *E. faecalis*.

Nas propriedades rurais da Serra do Salitre foram isolados *Lc. lactis* e *B. cereus*-similar. Lima (2005) também isolou *Lc. lactis* a partir de duas amostras de pingo coletadas na mesma região, além de *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. raffinosus*, *S. agalactiae*, *Pediococcus acidilactii* e *P. pentosaceus*. No entanto, a identificação das bactérias, feita pela autora, foi baseada somente em testes fisiológicos, enquanto que no presente trabalho foram utilizados métodos moleculares. Isto pode explicar as diferenças encontradas no isolamento das bactérias lácticas obtidas nos dois trabalhos.

Culturas iniciadoras usadas para produção de queijos macios e de massas semi-duras são formadas em grande parte por linhagens de *Lactococcus lactis* (de la Plaza et al., 2006). Comparando-se as linhagens industrializadas às linhagens selvagens de lactococos, estas produzem sabor e aroma distintos nos queijos, devido as suas atividades enzimáticas maiores



durante a conversão dos aminoácidos em compostos flavorizantes (Ayad et al., 1999; Morales et al. 2003 apud Plaza et al., 2006). *Lc. lactis* foi isolado de amostras de pingo de ambas regiões avaliadas, e possivelmente esta espécie tem um papel ecológico importante durante o processo de produção destes queijos artesanais.

*B. cereus* é descrita na literatura como ubíqua, tendo sido isolada de vários alimentos como: arroz, carnes, ovos e produtos lácteos (Drobniewski, 1993). Segundo Davies & Wilkinson (1973), essa espécie tem alta incidência em produtos lácteos. Amhed et al. (1983) encontraram 9% das amostras de leite cru, 35% das amostras de leite pasteurizado, 14% das amostras de queijo e 48% das amostras de sorvete contaminadas com *B. cereus*. Segundo Johnson (1984), surtos de intoxicação alimentar causados por *B. cereus* são raros. Não obstante, segundo Davies & Wilkinson (1973), o crescimento de *B. cereus* deteriora a qualidade dos produtos lácteos. Embora *B. cereus* tenha sido isolado freqüentemente de produtos lácteos, seu papel como patógeno alimentar nesses produtos não tem sido bem estudado (Wong et al., 1988). No entanto, o papel ecológico de *B. cereus* presente nos pingos das regiões estudadas, no presente trabalho, ainda precisa ser determinado.

## **5.2 Espécies de bactérias identificadas utilizando biblioteca de clones da região 16S do rDNA e seqüenciamento parcial da região 16S do rDNA**

A utilização de técnicas independentes de cultivo para identificação de bactérias em ecossistemas complexos tem revelado que a maioria das bactérias identificadas nesses ambientes não é cultivável, ou seja, não se conhecem as condições adequadas de cultivo (p.ex. nutrientes, temperatura, pH, e salinidade). A utilização de bibliotecas de clones para estudar a diversidade bacteriana em diferentes áreas da ecologia microbiana tem permitido a definição mais precisa das comunidades microbianas de ecossistemas complexos (Wilson & Blitchington, 1996; Snair et al. 1997; Pryde et al., 1999). Um total de 75 clones foi seqüenciado a partir de duas amostras de pingo obtidas de cada região estudada, porém apenas as seqüências com valor de qualidade acima de 20 no programa PHRED e com tamanho acima de 100 pares de base foram utilizadas para identificação e análise de similaridade.

Isto correspondeu a 56 clones da Serra da Canastra e 55 clones da Serra do Salitre provenientes de amostras de pingo. As seqüências da região 16S do rDNA que tiveram acima de 98% de identidade revelada pelo alinhamento com linhagens tipo de referência por meio do programa DNAMAN, foram consideradas como pertencentes a espécie correspondente. As seqüências com valores menores do que esta porcentagem foram consideradas como similares a espécie encontrada. Os clones identificados nas duas amostras de pingo da Serra Canastra corresponderam às espécies *Lc. lactis*, *Streptococcus salivarius*, *Macrococcus caseolyticus*, *Lb. casei*, *B. cereus* e *Leuconostoc mesenteroides* (tabela 4). Os clones identificados nas duas amostras de pingo da Serra do Salitre corresponderam principalmente às espécies: *Lc. lactis*, *Lc. garviae*, *Le. mesenteroides* e *Vagococcus carniphilus* (tabela 5).

Um dos clones seqüenciados da Serra da Canastra foi semelhante à seqüência da bactéria não cultivável depositada no GenBank com o código de acesso EF051484, a qual foi obtida de amostras de fermentação de lixo doméstico (Zhang et al., 2006). Dos clones analisados da Serra do Salitre, seis clones foram semelhantes a bactérias não cultiváveis isoladas de diferentes ambientes (tabela 5). O clone com código de acesso AY668120 foi obtido a partir do intestino de camundongos C57BL/6, a partir dos cecos de indivíduos adultos (Backhed et al., 2004). O clone de bactéria do filo Firmicutes não cultivável com código de acesso EF071401 foi obtido a partir de uma biblioteca de clones 16S rDNA feita a partir de mucosa intestinal humana com doença inflamatória (Florin et al., 2006). O clone de bactéria não cultivável com código de acesso AY911184 foi obtido de comunidades bacterianas marinhas do Japão (Fujimoto et al., 2005). O clone de bactéria não cultivável da família Enterobacteriaceae com código de acesso AY960268 foi obtido de comunidades microbianas que colonizam as paredes da caverna Altamira na Espanha (González et al., 2005). Os clones de bactérias não cultiváveis com códigos de acesso DQ343062 e DQ342413 foram obtidos a partir do intestino de borboleta (Robinson et al., 2006). Estas bactérias não cultiváveis, obtidas pelo seqüenciamento dos clones de amostras de ambas as regiões, podem também ser constituintes do pingo, ou simplesmente contaminantes do processo fermentativo, pois foram encontradas em baixa freqüência. Somente a partir do desenvolvimento de meios de cultura para o isolamento destas

**Tabela 4:** Identificação dos clones das bactérias presentes nas amostras de pingo das propriedades rurais A e B da Serra da Canastra.

Clones	Tamanho (pb)	Espécie de referência (nº de acesso GenBank)	Identidade
SC 2	617	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	98,86%
SC 3	219	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	98,93%
SC 4	757	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	97,96%
SC 6	514	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,61%
SC 8	578	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,81%
SC 10	796	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	97,63%
SC 11	612	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	99,49%
SC 12	255	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	96,04%
SC 14	642	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,87%
SC 15	631	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	99,15%
SC 17	558	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,85%
SC 18	373	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,84%
SC 19	785	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	97,98%
SC 22	894	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	96,88%
SC 23	621	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,66%
SC 24	668	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,75%
SC 25	650	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,85%
SC 26	221	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	96,74%
SC 27	459	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	95,87%
SC 28	978	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	97,20%
SC 29	823	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	97,37%
SC 30	755	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	97,73%
SC 33	344	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	96,28%
SC 34	579	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	99,24%
SC 35	763	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,49%
SC 36	671	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	99,36%
SC 37	629	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,57%
SC 38	531	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	99,80%
SC 39	545	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	99,24%
SC 40	500	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	99,78%
SC 41	357	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	98,41%
SC 42	659	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 <b>AY188352</b>	96,96%
SC 43	700	<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	99,55%

**Tabela 4:** Identificação dos clones das bactérias presentes nas amostras de pingo das propriedades rurais A e B da Serra da Canastra (Continuação).

Clones	Tamanho (pb)	Espécie de referência (nº de acesso GenBank)	Identidade
SC44	862	<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	99,47%
SC 45	200	<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	96,97%
SC 46	638	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 <b>AF469172</b>	98,37%
SC 47	803	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	97,53%
SC 48	332	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	96,51%
SC 49	704	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <b>AE016877</b>	93,95%
SC 50	396	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	97,87%
SC 51	712	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <b>AE016877</b>	92,96%
SC 52	799	<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	98,89%
SC 53	811	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 <b>AF469172</b>	96,53%
SC 54	552	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	99,44%
SC 55	196	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 <b>AF469172</b>	91,25%
SC 56	896	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	99,16%
SC 57	470	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343 <b>M23035</b>	98,46%
SC 58	755	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 <b>AF469172</b>	92,32%
SC 60	771	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	97,68%
SC 61	126	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	93,85%
SC 62	270	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100803</b>	98,73%
SC 63	322	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	99,33%
SC 64	640	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	98,20%
SC 65	665	<i>Macrocococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	93,60%
SC 66	717	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 <b>AF469172</b>	95,05%
SC 67	642	<i>Macrococcus caseolyticus</i> ATCC 13548T <b>Y15711</b>	97,51%
SC 68	699	Bactéria não cultivável <b>EF051484</b>	98,17%

**Tabela 5:** Identificação dos clones das bactérias presentes nas amostras de pingo das propriedades rurais D e E da Serra do Salitre.

Clones	Tamanho(pb)	Espécie de referência (nº de acesso GenBank)	Identidade
SS2	777	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	95,24%
SS3	669	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,68%
SS4	732	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,60%
SS5	782	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,31%
SS7	310	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,09%
SS9	586	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,64%
SS10	615	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,15%
SS11	778	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,78%
SS12	726	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,99%
SS16	801	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,87%
SS19	688	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,25%
SS20	631	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,83%
SS21	775	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	96,86%
SS22	684	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,98%
SS23	764	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,39%
SS24	406	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,46%
SS25	592	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,45%
SS26	956	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,43%
SS28	484	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,10%
SS29	525	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,40%
SS30	547	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,81%
SS31	618	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,32%
SS32	790	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,97%
SS33	304	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,54%
SS34	518	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,99%
SS35	519	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,59%
SS36	205	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,88%
SS37	275	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,85%
SS38	529	Clone bactéria não cultivável <b>AY668120</b>	97,00%
SS40	691	<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>cremoris</i> SK11 <b>CP000425</b>	98,95%
SS41	620	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,16%
SS43	329	Clone bactéria Firmicutes não cultivável <b>EF071401</b>	95,00%
SS45	744	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	96,89%
SS46	754	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,34%
SS47	658	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	95,65%
SS48	581	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,45%
SS49	627	Clone bactéria não cultivável <b>AY911184</b>	97,00%
SS50	291	<i>Lactococcus garviae</i> <b>AF283499</b>	99,25%
SS51	379	<i>Lactococcus garviae</i> <b>AF283499</b>	98,92%
SS52	377	Clone bactéria Enterobacteriaceae não cultivável <b>AY960268</b>	99,00%
SS53	650	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	97,14%
SS54	668	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	94,87%
SS55	406	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	93,33%
SS56	795	<i>Lactococcus garviae</i> <b>AF283499</b>	98,17%
SS59	851	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	98,74%
SS61	336	<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>cremoris</i> SK11 <b>CP000425</b>	98,53%
SS63	723	<i>Lactococcus garviae</i> <b>AF283499</b>	96,93%
SS65	673	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343 <b>M230335</b>	96,16%
SS68	733	<i>Vagococcus carniphilus</i> <b>AY179329</b>	92,75%

**Tabela 5:** Identificação dos clones das bactérias presentes nas amostras de pingo das propriedades rurais D e E da Serra do Salitre. (Continuação)

Clones	Tamanho(pb)	Espécie de referência (nº de acesso GenBank)	Identidade
SS69	657	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,84%
SS71	571	<i>Vagococcus carniphilus</i> <b>AY179329</b>	98,95%
SS73	867	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	99,20%
SS74	403	Clone bactéria não cultivável <b>DQ343062</b>	98,00%
SS75	560	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 <b>AB100883</b>	92,43%
SS76	740	Clone bactéria não cultivável <b>DQ342413</b>	93,00%

bactérias, é que o papel delas no processo de fabricação destes queijos artesanais poderá ser determinado.

As espécies predominantes nas duas amostras de pingo da Serra da Canastra identificadas por métodos independentes de cultivo foram *St. salivarius* e *Lc. lactis*, as quais representam, respectivamente, 41,07% e 23,21% dos clones analisados. Leite et al. (1995) em estudos sobre culturas lácticas provenientes do pingo resultante da fabricação de queijo Minas curado do Serro (Minas Gerais) isolaram linhagens de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Streptococcus*. *Lactobacillus casei* também foi identificada por Borelli (2006) em uma das amostras de pingo da Serra da Canastra na ordem de  $1,4 \times 10^8$  ufc/ml. A análise dos resultados obtidos para a Serra da Canastra sugere que *M. caseolyticus*, *St. salivarius* e *Lc. lactis* sejam as principais espécies presentes no pingo desta região. Na Serra do Salitre, *Lc. lactis* parece ser a espécie predominante.

### **5.3 Comparação da diversidade de bactérias identificadas por meio de métodos dependentes e independentes de cultivo**

A comparação da diversidade de espécies encontrada na amostra de pingo da propriedade rural A da Serra da Canastra revela uma diferença significativa na frequência de espécies identificadas por métodos dependentes e independentes de cultivo (tabela 6). *B. cereus*—similar representou 42,86% dos isolados por cultivo, enquanto que pelo método independente de cultivo *St. salivarius* representou 71,87% dos clones analisados. *Lc. lactis* teve aproximadamente a mesma frequência pelos dois métodos (aproximadamente 28% dos clones). Além disso, *B. cereus* não foi encontrado utilizando o método independente de cultivo. Isto pode ser explicado por meio de duas hipóteses: a diferença na eficiência da extração de DNA para diferentes espécies bacterianas na mesma amostra e a amplificação preferencial pela PCR de moléculas moldes em maior quantidade na amostra de DNA total (Miambi et al., 2003).

A comparação da diversidade de espécies encontrada na amostra de pingo da propriedade rural B (tabela 6) da Serra da Canastra também revelou a

**Tabela 6** Comparação da frequência de espécies bacterianas das amostras de pingos das propriedades rurais A e B identificadas por métodos dependente e independente de cultivo.

<b>Espécies (nº GenBank)</b>	<b>Frequência de espécies/ método dependente de cultivo (n<sup>a</sup>)</b>	<b>Frequência de espécies/ método independente de cultivo (n<sup>b</sup>)</b>
<b>Propriedade Rural A</b>	<b>7</b>	<b>32</b>
<i>L. lactis</i>	28,57%	28,13%
<i>B. cereus</i>	28,57%	NE <sup>c</sup>
<i>B. cereus-similar</i>	42,86%	NE <sup>c</sup>
<i>S. salivarius</i>	NE <sup>c</sup>	71,87%
<b>Propriedade Rural B</b>	<b>5</b>	<b>24</b>
<i>L. lactis</i>	40,0%	16,66%
<i>B. cereus-similar</i>	60,0%	NE <sup>c</sup>
<i>B. cereus</i>	NE <sup>c</sup>	8,33%
<i>M. caseolyticus</i>	NE <sup>c</sup>	54,16%
<i>L. casei</i>	NE <sup>c</sup>	20,83%
<i>L. mesenteroides</i>	NE <sup>c</sup>	4,16%
Bactéria não cultivável (EF051484)	NE <sup>c</sup>	4,16%

<sup>a</sup> = número de isolados, <sup>b</sup> = número de clones analisados, <sup>c</sup> = espécie não encontrada.



predominância de *B. cereus*—similar com 60% dos isolados, utilizando o método de cultivo. Pelo método independente de cultivo, *M. caseolyticus* predominou com 54,16% dos clones analisados. As espécies *Lb. casei* e *Lc. lactis* também apresentaram freqüências elevadas com 20,83% e 16,66% dos clones analisados, respectivamente. Diferenças significativas entre a freqüência de bactérias lácticas identificadas por métodos dependentes e independentes de cultivo foram encontradas por Ampe et al. (1999) em um estudo polifásico da distribuição de microrganismos em Pozol mexicano, um farinha de milho fermentada. Naquele estudo, um percentual de 89 a 97% de bactérias lácticas foi obtido por meio de sondas para 16S rRNA, demonstrando a prevalência desse grupo de microrganismos em todas amostras avaliadas. No entanto, a enumeração de bactérias lácticas em meio MRS-glicose revelou um percentual muito menor de bactérias lácticas quando comparado com o método independente de cultivo utilizado.

A comparação da diversidade de espécies encontrada na amostra de pingo da propriedade rural D da Serra do Salitre mostrou a predominância de *Lc. lactis* em relação às outras espécies, tanto por método dependente quanto independente de cultivo (tabela 7). A amostra de pingo da propriedade rural E da mesma região apresentou também o predomínio de *L. lactis* tanto por um método quanto pelo outro, porém em menor proporção (tabela 7). Nessa amostra, foram identificadas outras espécies como *Lc. garviae*, representando 16% dos clones, *Le. mesenteroides* com freqüência de 4% dos clones e *V. carniphilus* correspondendo a 8% dos clones analisados. Em um estudo realizado por Miambi et al. (2003) utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo para identificação das bactérias presentes em polvilho azedo, *Lb. manihotivorans*, *Lb. crispatus* e *Lb. fermentum*, identificadas por DGGE, não foram recuperadas por técnicas de cultivo. No estudo realizado por Brightwell et al. (2006), para identificação da comunidade bacteriana associada a uma sala de desossagem de carne por métodos dependentes e independentes de cultivo mostrou a prevalência de *Sphingomonas* sp. na biblioteca de clones não cultiváveis. Espécies de *Serratia*, *Alcaligenes* e *Microbacterium* foram encontradas apenas utilizando o cultivo. Apenas pseudomonadídeos foram detectados por ambos os métodos pelos autores.

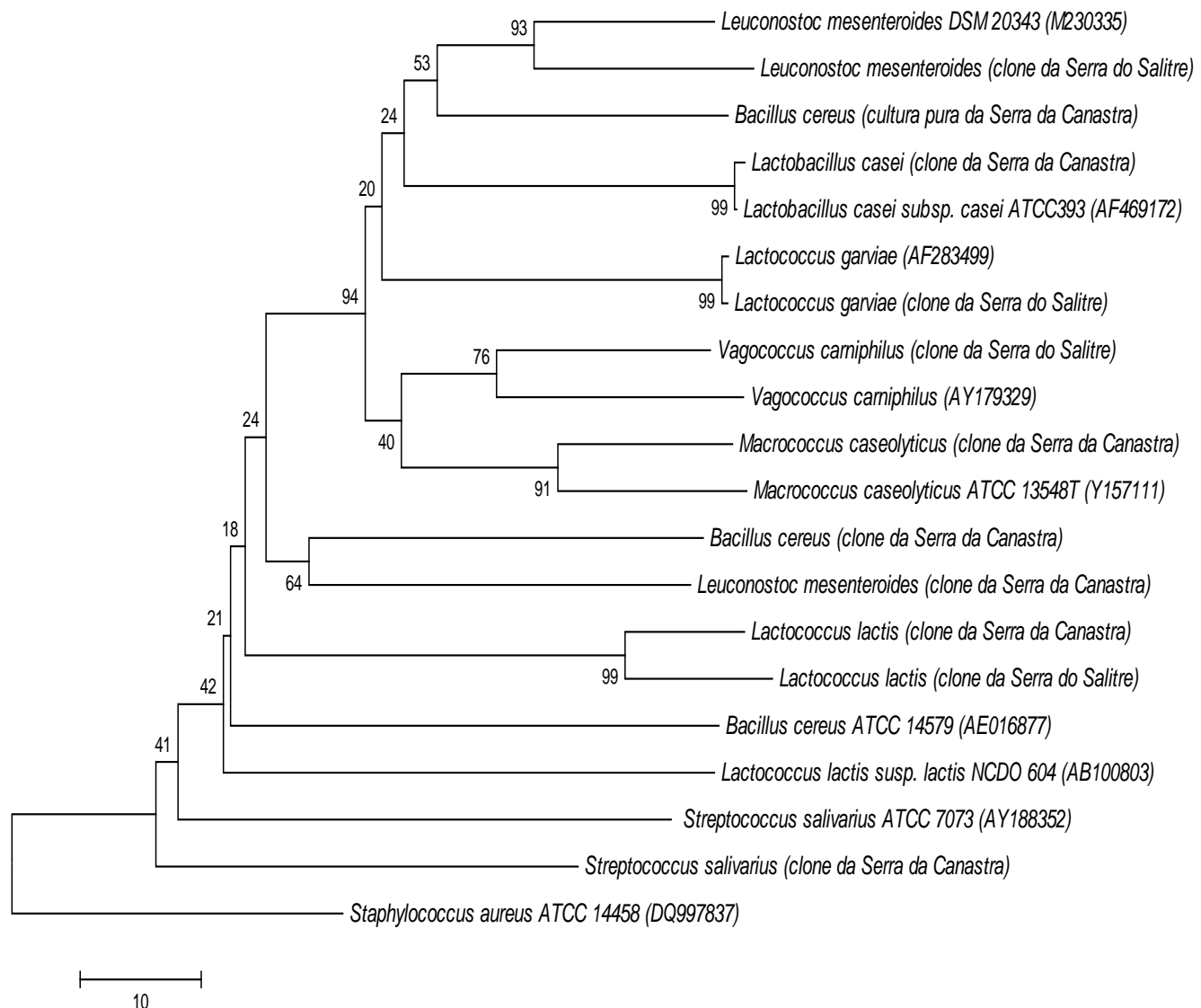
**Tabela 7** Comparação da frequência de espécies bacterianas das amostras de pingos das propriedades rurais D e E identificadas por métodos dependente e independente de cultivo.

<b>Espécies (nº Genbank)</b>	<b>Frequência de espécies/ método dependente de cultivo (n<sup>a</sup>)</b>	<b>Frequência de espécies/ método independente de cultivo (n<sup>b</sup>)</b>
<b>Propriedade Rural D</b>	4	30
<i>Lactococcus lactis</i>	75,00%	96,66%
<i>Bacillus cereus-similar</i>	25,00%	NE <sup>c</sup>
Clone bactéria não cultivável (AY668120)	NE <sup>c</sup>	3,33%
<b>Propriedade Rural E</b>	4	25
<i>Lactococcus lactis</i>	75,00%	52,00%
<i>Bacillus cereus-similar</i>	25,00%	NE <sup>c</sup>
Clone bactéria Firmicutes não cultivável (EF071401)	NE <sup>c</sup>	4,00%
Clone bactéria não cultivável (AY911184)	NE <sup>c</sup>	4,00%
<i>Lactococcus garviae</i>	NE <sup>c</sup>	16,00%
Clone bactéria Enterobacteriaceae não cultivável (AY960268)	NE <sup>c</sup>	4,00%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NE <sup>c</sup>	4,00%
<i>Vagococcus carniphilus</i>	NE <sup>c</sup>	8,00%
Clone bactéria não cultivável (DQ343062)	NE <sup>c</sup>	4,00%
Clone bactéria não cultivável (DQ342413)	NE <sup>c</sup>	4,00%

<sup>a</sup> = número de isolados, <sup>b</sup> = número de clones analisado, <sup>c</sup> = espécie não encontrada

A comparação da diversidade entre as duas regiões produtoras de queijos Minas artesanais revela dados importantes sobre a composição dos pingos das mesmas. Não foram encontradas *M. caseolyticus*, *St. salivarius* e *Lb. casei* em amostras de pingo da Serra do Salitre. *Vagococcus carniphilus* e *Lc. garviae* não foram encontradas nas amostras de pingo da Serra da Canastra. Essa diferença da composição de espécies bacterianas dos pingos de uma região para outra pode ser de grande importância para definição de culturas iniciadoras para cada variedade de queijo Minas artesanal, baseadas na definição de espécies indígenas características de cada região. Essa definição pode estar diretamente relacionada com a identidade dos queijos, que é um fator primordial para o registro e comercialização dos mesmos. A definição de linhagens iniciadoras típicas para cada região pode também ajudar no processo de caracterização da “denominação de origem” desses queijos artesanais.

A análise filogenética das bactérias identificadas, construída a partir das seqüências parciais da região 16S do rDNA, mostra que os clones identificados como *Lc. lactis* de ambas regiões estavam dentro de um mesmo grupo (figura 5). No entanto, a espécie de referência *Lactococcus lactis* susp. *lactis* NCDO 604 (AB100803) ficou em um grupo separado, podendo ser filogeneticamente separada dos outros clones identificados como *Lc. lactis*. Este resultado mostra que provavelmente muitas das seqüências depositadas no GenBank e identificadas como *Lc. lactis*, na verdade sejam outras espécies de bactérias lácticas. Alguns isolados da mesma espécie ficaram localizados em posições separadas, isto pode também sugerir que na realidade pertençam a outras espécies de bactérias lácticas, possivelmente ainda não descritas. Isto pode ser observado de forma mais clara para um clone de *Le. mesenteroides* da Serra da Canastra, o qual foi agrupado com um clone de *B. cereus* da mesma região, assim como uma cultura pura de *B. cereus* da Serra da Canastra que foi agrupada com um grupo formado pelas seqüências de referência *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343 (M230335) e com aquela obtida de um clone de *Le. mesenteroides* da Serra do Salitre. Este fato também pode ser explicado devido a região usada para construção da árvore ser provavelmente bastante conservada entre as estas espécies, justificando assim seu agrupamento.



**Figura 5** Árvore filogenética mostrando as posições relativas das espécies inferidas pelo método *neighbor-joining* por meio das seqüências parciais da região 16S do rDNA. Os valores de *bootstrap* para um total de 10.000 réplicas são mostrados nos nós da árvore. Linhagens tipo de referência usadas para comparação são dadas, assim como os números de acesso para as seqüências da região 16S do rDNA das mesmas (entre parênteses). *Staphylococcus aureus* foi usado como grupo externo. A barra indica 10% de divergência de seqüência.

## 6. Conclusões

- A utilização de um estudo polifásico, com o auxílio de técnicas dependentes de cultivo e independentes de cultivo foi fundamental para identificar a comunidade bacteriana presente nas amostras de pingo da Serra da Canastra e da Serra do Salitre.
- Quanto ao uso de técnica dependente de cultivo, o uso dos testes fisiológicos para agrupar os isolados a nível de gênero, seguidos de identificação pela ARDRA e/ou seqüenciamento a nível de espécie, possibilitou a identificação das espécies bacterianas isoladas a partir das amostras de pingo de ambas as regiões;
- O uso das bibliotecas de clones e seqüenciamento parcial da região 16S do rDNA foi importante para identificação das espécies bacterianas, que não foram obtidas pelo cultivo, a partir das amostras de pingo de ambas as regiões;
- A comparação da diversidade de espécies encontradas nas duas regiões, pelos métodos dependentes e independentes de cultivo, mostrou que as comunidades bacterianas existentes nas amostras de pingo de ambas as regiões apresentam diferenças em relação à composição e riqueza de espécies. Estes resultados são de extrema importância para programas de seleção de linhagens bacterianas iniciadoras do processo de produção de queijos artesanais. *Lactococcus lactis* foi a espécie encontrada com maior frequência, portanto sendo considerada uma espécie em potencial para ser utilizada como iniciadora nas regiões estudadas.

## 7. Referências Bibliográficas

Addis, E.; Fleet, G. H.; Cox, J.M.; Kolak, D; Leung, T. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 69, p.25-36, 2001.

Ahmed,A. A.; Moustafa, M. K.; Marth E. H. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *Journal of Food Protection*, v. 46, p.126-128, 1983.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Meyers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.

Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C.; Guyot, J. P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a maize-fermented dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 5464-5473, 1999.

Axelsson, L. *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, New York,1998, 1-72p.

Ayad, E. H. E.; Nashat, S.; El-Sadek, N.; Metwaly, H.; El-Soda, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food microbiology*, v. 21, p.715-725, 2004.

Ayad, E.H.E.; Verheul, A.; de Jong, C.; Wouters, J.T.M.; Smit, G. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*, v.9, p. 725-735, 1999.

Backhed,F.; Ding,H.; Wang,T.; Hooper,L.V.; Koh,G.Y.; Nagy,A.; Semenkovich,C.F.; Gordon,J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 15718-15723, 2004.

Beresford, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N. L.; Cogan, T.M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v.11, p.259-274, 2001.

Borelli, B. M. Caracterização dos indicadores higiênico-sanitários de qualidade e das populações de bactérias lácticas, leveduras e *Staphylococcus* spp. durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG. 2006. 120 p. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte.

Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA. Brasília,1998a, 116p.

Brasil. Portaria 146 de 07 de março de 1996, Ministério da Agricultura. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, 1996.

Brightwell, G.; Boerema, J.; Mills, J.; Mowat, E.; Pulford, D. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox<sup>TM</sup> belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v. 109, p. 47-53, 2006.

Cocconcelli, P. S.; Parisi, M. G.; Senini, L.; Bottazzi, V. Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology*, v. 25, p. 8-12, 1997.

Cogan, T.M.; Barbosa, M.; Beuvier, E.; Bianchi-Salvadori, B.; Cocconcelli, P. S.; Fernandes, I.; Gómez, J.; Gómez, R.; Kalantzopoulos, G.; Ledda, A.; Medina,

M.; C. Rea, M.; Rodriguez, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, v. 64, p. 409-421, 1999.

Coppola, S.; Blaiotta, G.; Ercolini, D.; Moschetti, G. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, p. 414-420, 2001.

Dahl, S.; Tavará, F. K.; Malcata, F. X. Relationships between flavor and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 255-262, 2000.

Davies, F. L.; Wilkinson, G. *Bacillus cereus* in milk and dairy products In B. C. Hobbs and J. H. B. Christian (ed.). *The microbiological safety of food*. Academic Press, Inc., New York, p. 57-68, 1973.

De Angelis, M.; Corsetti, A.; Tosti, N.; Rossi, J.; Corbo, M. R.; Gobbetti, M. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian Ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2011-2020, 2001.

Drobniowski, F. A. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 324-338, 1993.

Escalante, A.; Wachter C.; Farrés, A. Lactic acid bacteria diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 21-31, 2001.

Ewing, B.; Hillier, LaDeana; Wendl, M. C.; Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment *Genome Research*, v.8, 175-185, 1998.

Feurer, C.; Irlinger, F.; Spinnler, H.E.; Glaser, P.; Vallaeys, T. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized



industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, p. 546-556, 2004.

Freitas, A. C.; Pais C.; Malcat, F. X.; Hogg, T. A microbiological characterization of pcante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*, v. 59, p. 155-160, 1995.

Furtado, M. M. *A arte e a ciência do queijo*. São Paulo: Globo, 1991, p.17-19.

Furtado, M. M. Tradição na história do povo mineiro. *Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.35, p.33-36, 1980.

Giraffa, G.; Paris, A.; Valcavi, M.; Gatti, M.; Neviani, E Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 937-943, 2001.

Giraud, E.; Gosselin, L.; Marin, B.; Parada, J. L.; Raimbault, M. Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, p. 276-282, 1993.

Guarneri, T.; Rossetti, L.; Giraffa, G. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 377-381, 2001.

Holzapfel, W. Use of starter cultures in a fermentation household scale. *Food control*, v. 8, p.241-258, 1997.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Decreto nº 42.645, 5 de junho de 2002. Sobre o Processo de Produção de Queijo Minas Artesanal. 2002.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Programa Selo Azul de Qualidade – Projeto Pró-Queijo Canastra. Belo Horizonte, IMA, 1999, 129p.

INDI (Instituto de Desenvolvimento Industrial de Minas Geras). A Indústria de Laticínios Brasileira e Mineira em Números. 2002.

Kehagias, C.; Koulouris, S.; Samona, A.; Malliou, S.; Koumoutsos, G. Effects of various starters on the quality of cheese in brine. *Food Microbiology*, v. 12, p. 413-419, 1995.

Kim, M.; Chun, J. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Microbiology*, v. 103, p. 91-96, 2005.

Kimaryo, V. M.; Massawe, G. A.; Olasupo, N. A.; Holzapfel, W. H. The use of starter culture in the fermentation of cassava for the production of "Kivunde", a traditional Tanzanian food product. *International Journal of Food Microbiology*, v. 56, p. 179-190, 2000.

Korhonen, H.; Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides-opportunities for desining future foods. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1297-1308, 2003.

Lacerda, I.C.A.; Caracterização fisiológica e molecular das bactérias lácticas e leveduras na produção de polvilho azedo e utilização de culturas iniciadoras para processo fermentativo. 2006. 132 p. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte.

Leite, M. O.; Pinheiro, A. J. R.; Chaves, A. H.; Teixeira, M. A.; Mosquim, M. C. A. V. Isolamento e identificação de bactérias lácticas de soro de queijo da região do Serro, Minas Gerais. In; Congresso Nacional de Laticínios, XIII, 1995, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora: Centro de Pesquisa e Ensino Instituto Cândido Tostes, p. 121-125, 1995.

Leroy, F.; Devuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science Technology*, v. 15, p.67-78, 2004.

Lima, C. D. L. C. Avaliação microbiológica e físico-química do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre-MG. 2005. 138p. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte.

Makarova et al. Comparative genomics of lactic acid bacteria *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 15611-15616, 2006.

Mannu, L.; Paba, A.; Pes, M.; Floris, R.; Scintu, M. F.; Morelli, L. Strain typing among enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo cheese. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 25-30, 1999.

Meisel, H.; Bockelman, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 76, p. 207-215, 1999.

Miambi, E.; Guyot, J.-P.; Ampe, F. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, p. 111– 120, 2003.

Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P. and Núñez, M. (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 201-209, 2003.

Morea, M.; Baruzzi, F.; Cocconcelli, P. S. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, p. 574-582, 1999.

Moreira, J. L. S.; Mota, R. M.; Horta, M. F.; Teixeira, S. M. R.; Neumann, E.; Nicoli, J. R.; Nunes, A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, v. 5, p. 5-15, 2005.

Morlon-Guyot, J.; Guyot, J. P.; Pote, B.; Jacob-Dehaut, I.; Raimbault, M. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava flour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p. 1001-1009, 1998.

Müller, T. Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Microbiology*, v. 145, p. 363-366, 1990.

Nancy, J. G.; Savard, T.; Obermeier, P.; Caldwell, G.; Champagne, C. P. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetables mixtures *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 261-275, 2001.

Norris, J. R.; Berkeley, R. C. W., Logan, N. A.; O'Donnel, A. G. The genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: Starr, M. P.; Stolp, H.; Truper, H. G.; Balows, A.; Schelegel, H. G. (Eds), *The Prokaryotes: A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, v.2, Springer, New York, p. 1711-1742, 1981.

Nouaille S.; Ribeiro L. A.; Miyoshi A., Pontes, D.; Oliveira, S. C.; Le Loir, Y.; Langella, P.; Azevedo V. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genetics Molecular Research*, v. 2, p. 102-111, 2003.

Oliveira, F. A. Perfil do queijo Minas curado destinado à fabricação de pão de queijo. 1999, 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), UFMG, Belo Horizonte.

Olsson, C.; Arhne, S.; Pettersson, B.; Molin, G. The bacterial flora of fresh and chilled stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 83, p. 245-252, 2003.

Parente, E.; Rota, M. A.; Ricciardi, A.; Clementi, F. Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of pasta filata cheese in Basilicata (southern Italy). *International Dairy Journal*, v. 7, p. 775-783, 1997.

Pereira, A. J. G.; Nascimento, G. T.; Silvestre, J. R. A; Souza Filho, J.; Miguel, J R. C.; Silva, L. J.; Albuquerque, L. C.; Barroso, M. C.; Vargas O. L. Desenvolvimento de processos, identidade de origem e qualidade para os queijos Minas do Serro e Minas da Serra da Canastra. (Projeto de pesquisa).1993.

Plaza, M. de la; Rodríguez, A.; Fernández de Palencia, P.; Martínez-Cuesta, M. C.; Peláez, C.; Requena, T. Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 637-644, 2006.

Reis, A. R. Caracterização físico-química e identificação dos elementos metálicos dos queijos Minas do Serro e Minas da Serra da Canastra.1998.78f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), UFMG, Belo Horizonte.

Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.

Sanni, A. I. The need for process optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 18, p.85-95, 1993.

Savijoki, K.; Ingmer, H.; Varmanen, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Mini-Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.71, p.394-406, 2006.

Saxelin, M.; Tynkkynen S.; Mattila-Sandholm T., de Vos W. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 204-211, 2005.

Siqueira, J. F. M.; Coelho, D. T.; Chaves, J. B. P.; Furtado, M. M. Efeito da variação do teor de gordura do leite no rendimento do queijo Minas padronizado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 41, p.21-26,1986.

Siqueira, R. S. *Manual de microbiologia de alimentos*. EMBRAPA, 1995.

Stiles, M. E.; Holzapfel, W. H. Review article. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, v. 36, p. 1-29, 1997.

Vargas, O.L.; Porto, M. A. C.; Brito, A. L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: municípios do Serro e de São Roque de Minas. *Revista Instituto laticínios Cândido Tostes*, v. 53, n 301-302-303, p.19-49, 1998.

Vargas, O.L.; Porto, M. A.C.; Brito, A.L. Características de origens para os queijos naturais de Minas Gerais: Municípios do Serro e de São Roque de Minas. Juiz de Fora: EPAMIG, 1997. 38p (Relatório oficial).

Ward, L. J. H. & Timmins M. J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p.90-92, 1999.

Wilson, K. H. & Blidchington, R. B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 2273-2278, 1996.

Wong, Hin-Chung; Chang, Man-Huei; Fan, Jin-Yuan Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, p. 699-702, 1988.

