

## AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DA MICROBIOTA BACTERIANA DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL DE SEARA – SC

Vanessa Cortina Zanetti\*<sup>1</sup>; Giovanna Bruna Koide<sup>1</sup>; Emanuelli Marchesan Maranhão<sup>2</sup>; Sheila Mello da Silveira<sup>3</sup>, Silvani Verruck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis – SC. \*E-mail: vanessa.zanetti@posgrad.ufsc.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis – SC.

<sup>3</sup>Instituto Federal Catarinense, Departamento de Engenharia de Alimentos, Concórdia – SC.

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a caracterização microbiológica de queijos coloniais artesanais do meio oeste catarinense, por meio de metataxonômica. Foram analisadas quatro amostras de queijo Colonial artesanal, de um único produtor, em diferentes tempos de maturação (CFd1, 7, 14, 21). A identificação bacteriana foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16s rRNA. No primeiro dia de maturação, a prevalência microbiana foi do gênero *Lactococcus* spp. (61,48%), *Citrobacter freundii* (21,21%), *Citrobacter murlinae* (8,69%) e *Citrobacter* sp. (2,99%). Em 7 dias de maturação, encontrou-se prevalência das bactérias do gênero *Corynebacterium* sp. além da presença de *Staphylococcus saprophyticus* e *Weissella paramesenteroides*. A amostra de 14 dias de maturação apresentou 75,91% de *Lactococcus* sp., 6,24% de *Enterobacteriaceae*, 3,96% de *C. freundii*, 2,43% de *Raoultella ornithinolytica* e 1,53% de *C. murlinae*. Na amostra com 21 dias de maturação foi encontrada maior diversidade de espécies bacterianas, sendo majoritariamente bactérias ácido lácticas. Através da análise genotípica foi possível verificar quais as espécies encontradas em queijo colonial artesanal e sua dinâmica ao longo da maturação.

**Palavras-chave:** Queijos Coloniais Artesanais. Análise Genotípica. Espécies Microbianas.

### INTRODUÇÃO

Queijos são produtos amplamente comercializados e consumidos no Brasil, sendo muitos deles produzidos de forma artesanal. Esses queijos possuem uma grande importância para a economia do país, além de serem importantes para a renda de famílias que depende da comercialização e consumo desses tipos de queijos (1). Na região sul, os queijos artesanais mais comuns são o queijo Colonial e o queijo Serrano, os quais são produzidos com leite cru, sendo que cada um possui seu método de produção específico (2, 3). Esse tipo de produto possui uma microbiota específica, típica da região em que são produzidos, constituída por cepas dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, principalmente. Essas cepas são muito importantes para o produto, pois garantem a segurança e características sensoriais específicas nos queijos (3).

Pelo fato deste produto ser produzido sem tratamento térmico, o mesmo apresenta uma ampla variedade de microrganismos, havendo a necessidade de um rigoroso controle de

qualidade, relacionado a sanidade animal, as boas práticas de fabricação e controle de produção (4). A análise metataxonômica é utilizada para identificar a microbiota presente na amostra a partir do sequenciamento de genes marcadores, sendo 16s o gene marcador de bactérias. O gene 16s rDNA está presente em todos os procarionotos, e é capaz de fornecer informações a respeito da determinação de relações filogenéticas (5), permitindo a compreensão detalhada da ecologia microbiana presente nestes produtos. Portanto, para proteger o aspecto tradicional desses produtos, é essencial entender a ecologia microbiana durante a maturação, estudando as mudanças dinâmicas que podem ocorrer.

## OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização bacteriológica de queijos artesanais do meio oeste catarinense, por meio de análise metataxonômica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas quatro amostras de queijo Colonial artesanal, de um único produtor, em diferentes tempos de maturação (CFd1, 7, 14, 21). A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA usando os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG), e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end no equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com bancos de dados proprietários e públicos e *Greengenes*. As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário de bioinformática (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A partir da análise metataxonômica realizada nas amostras de queijo, foram encontradas 56.997 sequências de DNA de bactérias nas quatro amostras, sendo que essas sequências pertencem a 4 filos distintos, Actinobacteria (18,62%), Bacteroidetes (0,01%), Firmicutes (61,01%) e Proteobacterias (20,36%).

No primeiro dia de maturação (CFd1) o gênero mais encontrado foi o gênero *Lactococcus* spp. (61,48%). Esse gênero de bactérias ácido lácticas (BAL) é geralmente utilizado em conjunto com outras BAL, como iniciadores na produção de derivados lácteos, como iogurtes, creme de leite, manteiga, queijos, e outros lácteos fermentados (6). No entanto, pode haver cepas indesejáveis, havendo espécies que levam a acidez indesejada, sabor desagradável e coagulação do leite (7). O segundo gênero mais encontrado na amostra CFd1 foi *Citrobacter* spp., sendo representado pelas espécies *C. freundii* (21,21%), *C. murlinae* (8,69%) e *Citrobacter* spp. (2,99%). *C. freundii* faz parte da microbiota intestinal, e no ambiente, podendo se tornar patogênica, causando infecções oportunistas como meningite e infecções urinárias (8). Ainda na amostra CFd1, o terceiro gênero mais encontrado foi *Pantoea*, com a espécie *P. agglomerans* (1,87%) sendo a mais representativa. Essa é uma bactéria Gram-negativa encontrada em plantas e fezes de humanos e animais, não sendo um agente infeccioso obrigatório (9).

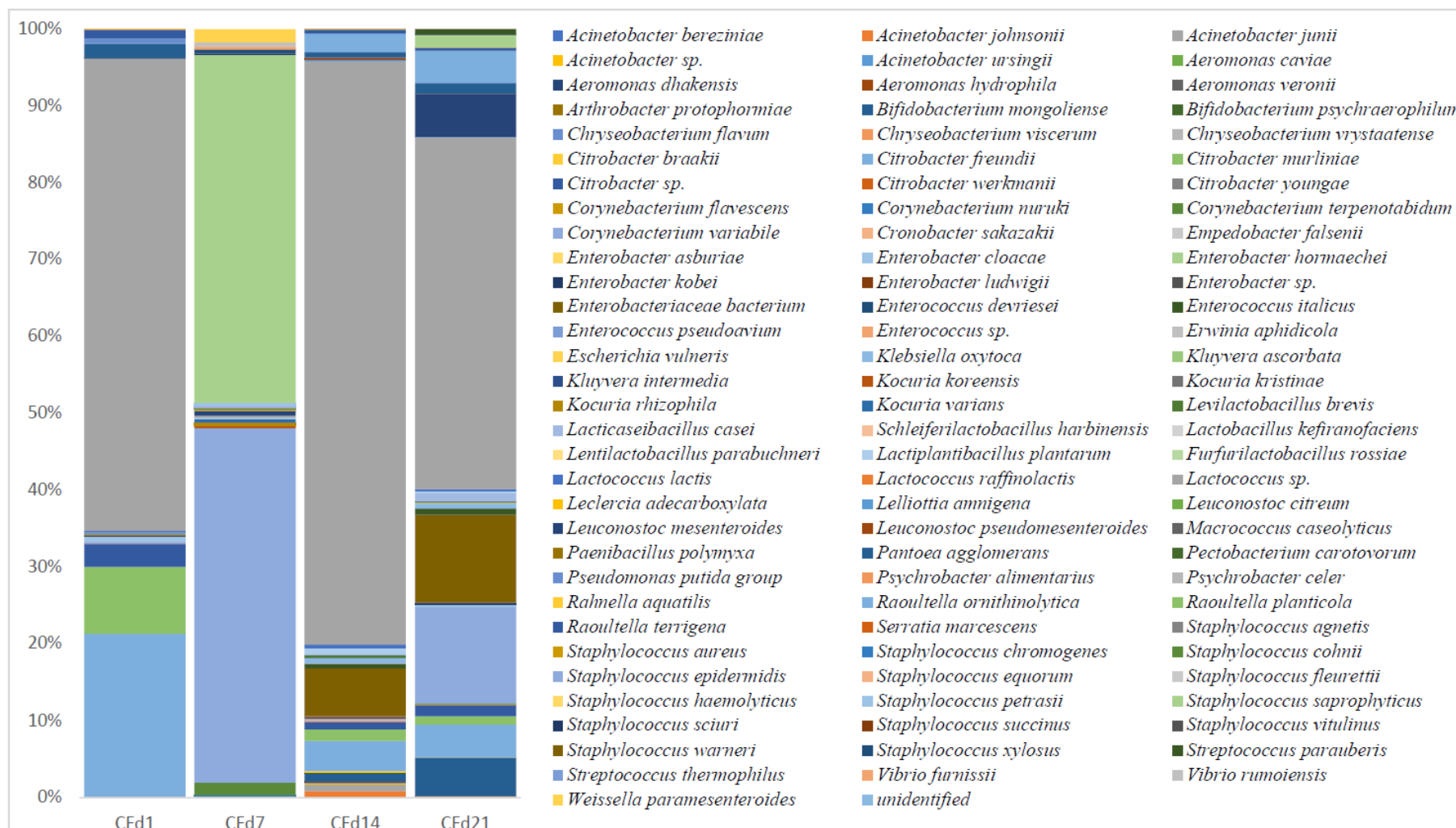
A amostra com 7 dias de maturação (CFd7) demonstrou discrepância entre as bactérias encontradas nas demais amostras, apresentando majoritariamente as bactérias

*Corynebacterium variabile* (46,06%), *S. saprophyticus* (43,32%), *W. paramesenteroides* (1,73%) e *Corynebacterium terpenotabidum* (1,67%). *C. variabile* é uma bactéria que faz parte da microbiota da superfície de queijos, contribuindo para o desenvolvimento de sabor e textura durante a maturação do queijo. São encontradas no ambiente e produtos lácteos (10). Essa espécie é importante para o processo de maturação dos queijos, pois produz lipases e hidrolases, e é formadora de compostos voláteis que influenciam no sabor dos queijos (11). O gênero *Corynebacterium* vem sendo encontrado em prateleiras que são utilizadas para maturação dos queijos, ou seja, prateleiras podem ser fonte de transferência destas espécies para o queijo, transferindo os microrganismos da superfície da prateleira para a superfície do queijo (2). Por outro lado, a espécie *S. saprophyticus* está relacionada a mastite em bovinos, essa que afeta a indústria de laticínios, causando problemas na produção de leite (12). Entretanto, apesar de possuir potencial patogênico, no qual é capaz de produzir biofilmes, essa espécie não produz toxinas. Além do mais, não são comuns relatos de infecções associados a *S. saprophyticus* através do consumo de alimentos (13). Enquanto isso, a espécie *W. paramesenteroides* pertence ao grupo de bactérias ácido lácticas heterofermentativas (14), sendo encontrada em alimentos produzidos a partir de leite cru. Essa bactéria possui potencial probiótico, sendo importante no controle de patógenos em alimentos através da produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio. No entanto, como é considerada nova, não é utilizada como iniciador ou cultura adjunta na indústria alimentícia (15).

Analisando a amostra no 14º dia de maturação (CFd14), em comparação com as outras três amostras, essa foi onde mais encontrou *Lactococcus* spp. com abundância relativa de 75,91%. O aumento da população de BAL ao longo do tempo de maturação tem relação com o metabolismo bacteriano e o desenvolvimento de características sensoriais características para este tipo de produto. Adicionalmente, os produtores destas amostras de queijo relataram que a maioria dos consumidores prefere ele com este tempo de maturação. Por outro lado, *Enterobacteriaceae* foram o segundo grupo mais frequente (6,24%), seguido de *C. freundii* (3,96%), *R. ornithinolytica* (2,43%) e *C. murliniae* (1,53%).

Ao final do tempo de maturação de 21 dias estudado no presente estudo (CFd21), foi encontrada maior variedade de espécies sendo estas representadas majoritariamente por *Lactococcus* sp. (45,76%), *C. variabile* (12,45%), *Enterobacteriaceae* (11,42%), *Leuconostoc mesenteroides* (5,59%), *Bifidobacterium mongoliense* (4,96%), *C. freundii* (4,24%), *R. ornithinolytica* (4,17%), *S. saprophyticus* (1,65%), *P. agglomerans* (1,43%), *Citrobacter* sp. (1,41%), *C. murliniae* (1,10%) e *Lacticaseibacillus casei* (1,06%). Sendo assim, no dia 21 de maturação foram encontradas mais bactérias ácido lácticas, como *L. mesenteroides* e *L. casei*, estes que são frequentemente encontrados em produtos lácteos, promovendo a formação de componentes de aroma e sabor, além de serem possíveis agentes de conservação em queijos (16).

Figura 01: Espécies de bactérias encontradas nas amostras CFd1, CFd7, CFd14 e CFd21 através de análise metataxonômica.



## CONCLUSÃO

Devido à elevada variedade microbiana presente em queijos produzidos a partir de leite cru, é importante a realização de caracterizações microbiológicas para compreender a dinâmica da ecologia microbiana durante a maturação. Através da análise metataxonômica foi possível verificar quais as espécies encontradas em cada uma das amostras ao longo de diferentes dias de maturação. *Lactococcus sp.*, *C. variabile*, *S. saprophyticus* e *C. freundii* foram as espécies mais encontradas considerando todas as amostras. Por fim, vale destacar que as bactérias ácido lácticas foram as mais abundantes nas amostras, principalmente nos dias 1, 14 e 21 de maturação.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. SILVA, J. G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. Isolados de queijo minas artesanal.** 2016. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 2016.
2. KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 80, p. 40-49, jun. 2019.
3. KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 21 ago. 2019.
4. SANTA CATARINA. Portaria SAR n.º 33, 07 de novembro de 2018. Norma interna regulamentadora do queijo fresco (Colonial). **Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**, 09 de novembro de 2018.
5. CUNHA, P. Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos. Neoprospecta, 2016. Disponível em: <https://marketing.neoprospecta.com/e-book-tipagem-microbiologica>. Acesso em: 27 de out. 2022.
6. WARD, L.J.H. et al. LACTOCOCCUS spp. | Lactococcus lactis. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, [S.L.], p. 1511-1516, 2002.
7. OLAJIDE, A. M.; LAPOINTE, G. Microorganisms Associated with Raw Milk. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, [S.L.], p. 319-328, 2022.
8. NASCIMENTO, V. F. S.; ARAÚJO, M. F. F. Ocorrência de bactérias patogênicas oportunistas em um reservatório do semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 7, p. 91-104, jul. 2013.
9. DUTKIEWICZ, J. et al. Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. **Annals of Agricultural And Environmental Medicine**, Lublin, v. 23, n. 2, p. 197-205, abr. 2016.
10. SCHRÖDER, J. et al. Complete genome sequence of Corynebacterium variabile DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-23, 3 Nov. 2011.
11. YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 185-201, 2001.
12. GUIMARÃES, F. F. et al. Comparison phenotypic and genotypic identification of Staphylococcus species isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1160-1164, dez. 2016.
13. LAWAL, O. U. et al. Foodborne Origin and Local and Global Spread of Staphylococcus saprophyticus Causing Human Urinary Tract Infections. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 880-893, mar. 2021.
14. ALVIM, L. B. **Segurança e Efeito Probiótico de Weissella paramesenteroides WpK4 Isolada de Suíno na Infecção Experimental com Salmonella Typhimurium em camundongos.** 2015. 97 f. Tese (Doutorado) - Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
15. TEIXEIRA, Camila Gonçalves et al. O gênero Weissella na indústria de alimentos: uma revisão. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1-15, 28 abr. 2021.
16. LEITE, Alessandra Cristina Sales et al. Development of stuffed coalho cheese in the traditional, lactose-free and probiotic-added formulations. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 1-12, mar. 2021.