

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

THAIZA TEIXEIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS
LÁTICAS E ESTAFILOCOCOS EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

THAIZA TEIXEIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS
E ESTAFILOCOCOS EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Luís Augusto Nero

Coorientador: Antônio Fernandes de Carvalho

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A447a Almeida, Thaiza Teixeira de, 1995-
2020 Avaliação de protocolos para enumeração de bactérias
láticas e estafilococos em queijo Minas artesanal do Serro /
Thaiza Teixeira de Almeida. – Viçosa, MG, 2020.
67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 58-67.

1. Bactéria do ácido láctico. 2. Enumeração. 3. Queijo.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 637.3

THAIZA TEIXEIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS
E ESTAFILOCOCOS EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Thaiza Teixeira de Almeida
Autora



Luís Augusto Nero
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele não chegaria a lugar algum.

Agradeço aos meus pais, Neuza e Luiz, aos meus irmãos Thiago e Thomaz e aos meus sobrinhos Arthur e Gabriel, pelo apoio, carinho e por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço ao meu namorado Luiz Gustavo, por ser meu amigo, companheiro e alicerce e nunca me deixar desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de fazer o curso.

Agradeço as minhas companheiras de equipe Mili e Letícia, e a todos os estagiários que contribuíram com esse trabalho, principalmente ao Reges.

Às minhas amigas da VET, meu muito obrigado! Vocês fizeram dos meus dias na UFV e em Viçosa muito mais felizes.

Agradeço ao professor Ricardo Seiti Yamatogi por toda ajuda na parte de biologia molecular e ao Prof. Dr. Antonio Fernandes de Carvalho pelo apoio e fornecimento dos queijos.

Um muito obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Luís Augusto Nero, que transmitiu seus conhecimentos, me auxiliou em tudo que eu precisava, sempre disposto a ajudar e sanar dúvidas.

Agradeço também aos técnicos do DVT, principalmente ao Dagô, seu Luiz e Alex.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Finalmente, agradeço a CNPq, FAPEMIG e 3M pelo suporte financeiro.

RESUMO

ALMEIDA, Thaiza Teixeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Avaliação de protocolos enumeração de bactérias lácticas e estafilococos em queijo Minas artesanal do Serro.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Antonio Fernandes de Carvalho.

Queijo Minas artesanal (QMA) do Serro podem ser produzidos com “*pingo*” ou “*rala*”, apresentando uma microbiota complexa composta de bactérias lácticas (BAL) e outros micro-organismos. Para a enumeração de BAL são necessários meios de cultura ricos em nutrientes e com agentes seletivos. Entretanto, as metodologias convencionais possuem limitações quanto a seletividade e praticidade. Assim, as placas 3M™ Petrifilm™ Lactic Acid Bacteria (LAB) foram desenvolvidas como um método alternativo para enumeração do BAL. Esse estudo teve como objetivo avaliar a performance das placas Petrifilm™ LAB para enumeração de BAL em QMA do Serro. Na primeira etapa, 6 amostras de QMA do Serro (3 “*pingo*”, 3 “*rala*”) foram plaqueadas em PCA e incubadas a 37 °C por 48h. As amostras apresentaram uma contagem média de 7,4 log UFC/g, e não foi constatada diferença significativa entre os tipos de queijo ($p > 0,05$). Posteriormente, 140 colônias foram selecionadas aleatoriamente das placas de PCA, identificadas bioquimicamente e por análises moleculares (16S rRNA): 71% dos isolados obtidos foram identificados como BAL, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium* e *Aerococcus* também foram identificados. Para a análise do comportamento da microbiota em meios de cultura seletivos, os 140 isolados foram diluídos e submetidos a sete protocolos distintos para enumeração de BAL e *Staphylococcus*: 1) MRS pH 5,7 30 °C/ 72 h e 2) protocolo 1 em anaerobiose; 3) MRS pH 5,7 37 °C/ 48 h; 4) M17 37 °C/ 48 h; 5) Petrifilm™ LAB 37 °C/ 48 h; 6) Petrifilm™ STX 37 °C/ 24 h e, 7) Baird-Parker 37 °C/ 48 h. Para BAL, a maioria dos isolados desse grupo apresentou morfologias típicas no Petrifilm™ LAB (92%) e M17 (93%). A presença de colônias de *Staphylococcus*, *Acinetobacter* e *Exiguobacterium* com morfologias típicas foram observadas no Petrifilm™ LAB. As contagens obtidas em Petrifilm™ LAB e M17 foram estatisticamente superiores às demais ($p < 0,05$). Poucos isolados de *Staphylococcus* formaram colônias típicas nos protocolos Petrifilm STX (29,4%) e Baird-Parker (21,7%), entretanto, *Lb. plantarum*, *L. lactis* e *Acinetobacter* apresentaram morfologias típicas no Petrifilm™ STX. Não houve diferença significativa entre os protocolos analisados para enumeração de

Staphylococcus. Na segunda etapa, 55 amostras de QMA do Serro foram selecionadas (7 “*pingo*”; 48 “*rala*”) e submetidas a enumeração de BAL pelos protocolos 1, 2, 3, 4 e 5, sendo que o último foi analisado nos tempos 24, 48 e 72 h. Análise de variância dos resultados obtidos indicou ausência de diferenças significativas independente dos protocolos, tempos de incubação e tipos de queijo. Entretanto, foi observado um baixo índice de correlação entre os protocolos convencionais e Petrifilm™ LAB. Colônias foram selecionadas aleatoriamente de cada amostra de queijo e de cada protocolo para coloração de Gram e teste de catalase, para caracterização de BAL. Petrifilm™ LAB foi o protocolo que mais selecionou BAL (82,9%), diferindo estatisticamente dos demais. Isolados obtidos dos protocolos MRS1 e Petrifilm foram submetidos a identificação molecular e verificou-se uma seletividade compatível com a composição esperada em queijos artesanais. Esses resultados confirmam a aplicabilidade do Petrifilm™ LAB para enumeração de BAL em QMA do Serro.

Palavras-chave: Bactérias Láticas. Enumeração. Petrifilm. Queijos Artesanais.

ABSTRACT

ALMEIDA, Thaiza Teixeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020.
Assessment of protocols for enumeration of lactic acid bacteria and staphylococci in Minas artisanal cheeses produced in Serro. Advisor: Luís Augusto Nero. Co-Advisor: Antonio Fernandes de Carvalho.

Minas artisanal cheese produced in Serro (SAC) can be produced with "*pingo*" or "*rala*", presenting a complex microbiota consisting of lactic acid bacteria (LAB) and other microorganisms. Enumeration of LAB requires nutrient rich culture media and selective agents. However, the conventional methodologies used to enumerate these microorganisms have limitations regarding selectivity and practicality. Thus, 3M™ Petrifilm™ Lact Bactia Bacteria (LAB) plates were developed as an alternative method of enumeration of LAB. This study aimed to evaluate the performance of the Petrifilm™ LAB plates for LAB enumeration in SAC. In the first stage, 6 SAC samples (3 "*pingo*"; 3 "*rala*") were plated in PCA and incubated at 37 °C for 48h. The samples presented mean count of 7.4 log CFU/g and no significant differences was found between the types of cheese ($p > 0.05$). Then, 140 colonies were randomly selected from PCA plaques, identified biochemically and by molecular analysis (16S rRNA): 71% of the isolates obtained were identified as BAL. *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium* and *Aerococcus* were also identified. For the analysis of the microbiota behavior in selective culture media, the 140 isolates were diluted and subjected to seven different protocols for LAB and *Staphylococcus* enumeration: 1) MRS pH 5.7 30 °C/ 72 h; 2) protocol 1 in anaerobiosis; 3) MRS pH 5.7 37 °C/ 48 h; 4) M17 37 °C/ 48 h; 5) Petrifilm™ LAB, 37 °C/ 48 h; 6) Petrifilm™ STX 37 °C/ 24 h and 7) Baird-Parker 37 °C/ 48 h. Regarding LAB, most of isolates presented the typical morphology in Petrifilm™ LAB (92%) and M17 (93%), but non-LAB isolates presented also typical morphology (*Staphylococcus*, *Acinetobacter* and *Exiguobacterium*) in Petrifilm™ LAB. With regard to LAB, counts obtained by Petrifilm LAB and M17 were significantly higher when compared to other protocols ($p < 0.05$). For *Staphylococcus*, only some isolates identified as *Staphylococcus* formed typical colonies in the Petrifilm™ STX (29.4%) and Baird-Parker (21.7%) and some isolates in *Lb. plantarum*, *L. lactis* and *Acinetobacter* presented typical morphology in Petrifilm™ STX. There was no significant difference between the protocols analyzed for *Staphylococcus*. In the second stage of the study, 55 SAC samples (7 "*pingo*"; 48 "*rala*") and submitted to BAL

enumeration by protocols 1, 2, 3, 4 and 5, the last one being analyzed at times 24, 48 and 72 h. Analysis of variance of counts obtained by the tested protocols indicated no significant differences, regardless of incubation times and cheese types. However, low correlation indexes were observed between conventional protocols and Petrifilm™ LAB ($r < 0.6$). Colonies were randomly selected ($n = 2,569$) from cheeses sample and protocols for Gram staining and catalase test, for LAB characterization ($n = 1,901$). Petrifilm™ LAB allowed higher confirmation of LAB colonies (82.9%) when compared to other protocols. Isolates obtained from MRS1 and Petrifilm™ LAB protocols were also subjected to molecular identification and verified a selectivity compatible with the expected composition of the artisanal cheese microbiota. These results confirm the applicability of Petrifilm™ LAB for LAB enumeration in SAC.

Keywords: Lactic Acid Bacteria. Enumeration. Petrifilm. Artisan Cheese.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. Histórico	12
1.2. Queijo Minas artesanal (QMA)	13
1.3. QMA do Serro	15
1.4. Microbiota de QMA	18
1.4.1. Micro-organismos patogênicos e deterioradores	18
1.4.2. Bactérias ácido lácticas (BAL)	19
1.4.2.1. Métodos de enumeração de BAL	20
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Etapa 1 – Análise da microbiota do QMA do Serro	26
3.1.1. Amostragem	26
3.1.2. Perfil da microbiota	26
3.1.3. Comportamento da microbiota de QMA do Serro em meios de cultura seletivos	28
3.2. Etapa 2 – Avaliação da performance de Petrifilm™ LAB para a enumeração de bactérias ácido lácticas em QMA do Serro produzidos com “ <i>rala</i> ” e “ <i>pingo</i> ”	30
3.2.1. Amostragem e diluições	30
3.2.2. Enumeração de BAL	30
3.2.3. Caracterização bioquímica	30
3.2.4. Análise de dados	31
3.2.5. Caracterização molecular da microbiota láctica dos queijos	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Etapa 1 – Análise da microbiota do QMA do Serro	33
4.1.1. Amostragem	33
4.1.2. Perfil da microbiota	34
4.1.3. Comportamento da microbiota em meios de cultura seletivos	37
4.1. Etapa 2 – Avaliação da performance de Petrifilm™ LAB para a enumeração de BAL em QMA do Serro produzidos com “ <i>rala</i> ” e “ <i>pingo</i> ”	48

5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Minas artesanal (QMA) do Serro é um importante produto, com destaque econômico, histórico, social e cultural. Os primeiros relatos da produção de QMA do Serro são de meados do século XVIII (MENESES, 2006). A sua produção é tipicamente realizada por agricultura familiar, sendo a principal fonte de renda de muitos trabalhadores rurais (DORES e FERREIRA, 2012).

O QMA do Serro é produzido com leite cru e com a utilização de “pingo” ou “rala”. O “pingo” é um soro fermento endógeno, obtido da dessoragem dos queijos produzidos no dia anterior. Já a “rala” é um QMA do Serro, ralado, produzido de 3 a 5 dias antes, que é adicionado ao leite em substituição ao “pingo” (DO VALE et al., 2018).

Devido a utilização de leite cru e as características de produção, esses queijos apresentam naturalmente uma microbiota complexa, possibilitando a veiculação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além da presença de vários gêneros de bactérias lácticas (BAL) (BRANT et al., 2007; PINTO et al., 2009).

BAL apresentam funções tecnológicas em queijos, sendo responsáveis pela acidificação do leite, redução do teor da lactose, além da produção de substâncias proteolíticas e lipolíticas que auxiliam na maturação, relacionando-se diretamente com as características sensoriais desses produtos (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014; MARTINS et al., 2015). BAL ainda possuem a habilidade de inibir outros micro-organismos, seja por competição por nutrientes ou pela capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas e ácidos orgânicos (MACORI e COTTER, 2018; MARTINS et al., 2015).

Para a identificação e enumeração de BAL são necessários meios de cultura rico em nutrientes, como aminoácidos, peptídeos e vitaminas, além de agentes seletivos, como ácidos, sais, antibióticos e condições diferenciadas de incubação (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). O protocolo mais utilizado para enumeração de BAL em alimentos é o descrito na ISO 15214, que utiliza como base o ágar de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (ISO 1998). Entretanto, essa metodologia apresenta algumas desvantagens como o meio de cultura não ser completamente seletivo, a demora na obtenção dos resultados e tempo de preparação dos meios de cultura, além do alto volume do material preparado que posteriormente deve ser descartado. Desse modo,

métodos alternativos vêm sendo desenvolvidos para agilizar a análise de BAL em alimentos, visando a redução das etapas de processamento e obtenção de resultados mais precisos e confiáveis.

O objetivo geral desse estudo foi a avaliação de uma metodologia alternativa, 3M™ Petrifilm™ Lactic Acid Bacteria Count Plate (Petrifilm™ LAB) (3M Food Safety St. Paul, MN, EUA), para enumeração de BAL em QMA do Serro, Minas Gerais, Brasil.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Histórico

Segundo o Regulamento técnico de identidade e qualidade de Produtos Lácteos, “*entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes*” (BRASIL, 1996).

O queijo é um dos alimentos processados mais antigos da história. As bactérias presentes no leite, principalmente BAL, utilizam a lactose como fonte de energia, resultando na produção de ácido láctico. Quando esse ácido é produzido em quantidade suficiente, as caseínas coagulam e formam um gel, que retém a gordura e a fase aquosa. Uma das teorias aceitas para o surgimento do queijo relaciona-se com a estocagem do leite em bolsas produzidas de estômago de animais, onde o leite armazenado entrava em contato, de forma acidental, com enzimas e bactérias ali presentes, ocorrendo a coagulação e liberação do soro (FOX e MCSWEENEY, 2004; PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009).

Os queijos contribuíram expressivamente para o progresso de civilizações, sendo consumido em períodos de ausência de outros alimentos. Com o passar dos séculos e com o avanço das sociedades, a produção de queijo foi se difundindo por toda a Europa. Na idade média, técnicas de produção de queijos foram desenvolvidas e aperfeiçoadas, principalmente nos mosteiros e propriedades feudais, resultando na melhoria dos produtos e na criação de alguns tipos conhecidos até hoje, como Parmesão, Gouda, Saint Paulin e Maroilles (FOX e MCSWEENEY, 2004; LEANDRO, 2013).

A disseminação do queijo para outras civilizações ocorreu com a colonização das Américas, Oceania e África, onde os colonos levaram consigo gado, cabras e ovelhas, assim como o conhecimento e habilidades de se produzir queijos. O queijo tornou-se um item de relevância econômica em alguns desses países, como na Austrália, Estados Unidos e Canadá. Esses queijos remetiam aos produzidos na

Europa, mas eram modificados para atender às condições e demandas locais (FOX e MCSWEENEY, 2004).

No Brasil, os primeiros rebanhos foram trazidos por Martin Afonso de Souza em 1534 para a região de São Vicente e, posteriormente, em 1550, para Salvador. Em meados do século XVIII, com a descoberta de ouro e pedras preciosas em Minas Gerais, um grande número de exploradores se deslocaram para a região, e junto com eles, o gado bovino era levado como animal de tração e também para alimentação (MERGAREJO NETTO, 2014). Embora esse gado não tivesse aptidão para produção leiteira, com a decadência da atividade mineradora no final do século, a lavoura e pecuária, incluindo a produção de queijo, passaram a ser uma alternativa de sustento dos moradores, sendo produzidos em escala doméstica e de forma bastante rudimentar (MERGAREJO NETTO, 2014). Esses queijos eram levados à capital do Império e abasteciam praticamente toda a província do Rio de Janeiro (LEANDRO, 2013). Embora os portugueses já apreciassem e dominassem as técnicas de produção de queijo, a fabricação desse produto em território brasileiro tornou-se destaque somente no início do século XIX, com a chegada da família real portuguesa, que revolucionou a alimentação da época (LEANDRO, 2013).

Com uma alta na produção do leite e o aprimoramento das técnicas de manejo, as primeiras fábricas de queijos brasileiras foram fundadas em Minas Gerais, no final do século XIX, onde imigrantes dinamarqueses se estabeleceram no Sul do estado e holandeses se estabeleceram em regiões próximas aos municípios de Santos Dumont e Barbacena (FURTADO, 1991).

1.2. Queijo Minas artesanal (QMA)

Minas Gerais destaca-se nacionalmente pela produção de queijos artesanais. A denominação de QMA é atribuída segundo o modo de produção, seguindo processos tradicionais que são repassados ao longo das gerações. Normalmente é utilizado leite cru, sem a utilização de culturas iniciadoras comerciais (COGAN et al., 1997). Também merecem destaque os queijos artesanais produzidos no Nordeste (queijo de coalho e queijo de manteiga); no Sul (queijo colonial ou serrano) e no Oeste, no estado de Mato Grosso do Sul, o queijo caipira (MENEZES, 2011).

De acordo com a Lei nº 14.185, regulamentada pelo Decreto 42.645 de 05 de junho de 2002, “é considerado queijo Minas artesanal o queijo que apresente

consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, elaborado a partir do leite integral de vaca, fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem". Ainda, deve ser destacado que *"o queijo Minas artesanal confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da área demarcada onde for produzido receberá certificação diferenciada"* (MINAS GERAIS, 2002).

Em todo o Estado de Minas Gerais existem aproximadamente 30 mil produtores de QMA (EMATER, 2018). Desses, nove mil são das sete principais regiões produtoras de QMA (Araxá, Canastra, Cerrado, Serro, Campo das Vertentes, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro, Figura 1). Os produtores dessas localidades são assistidos pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER/MG) e cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (EMATER, 2018).



Figura 1- Mapa das sete regiões produtoras de QMA no estado de Minas Gerais: Serro, Serra do Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá e Triângulo. Fonte: Fazendinha em casa, disponível em: <https://fazendinha.me/as-7-regioes-produtoras-de-queijo-minas-artesanal/>

As setes regiões produtoras de QMA englobam 75 municípios, contando com 270 queijarias regularizadas, produzindo aproximadamente 50 mil toneladas de queijo por ano, sendo a principal e talvez única fonte de renda de muitas famílias mineiras,

refletindo assim a importância desses produtos como fator econômico, histórico, social e cultural (DORES e FERREIRA, 2012; EMATER, 2018).

Salientando essa importância histórica e cultural, o Instituto Nacional de Patrimônio Histórico Artístico Nacional (IPHAN) reconheceu em julho de 2008 as regiões do Serro, Canastra e Serra do Salitre como patrimônio cultural imaterial do Brasil pelo “*modo artesanal de fazer queijo de Minas*” (IPHAN, 2008). As regiões do Serro e da Canastra são historicamente reconhecidas como produtoras de QMA e também ganharam o reconhecimento de Indicação Geográfica (IG), garantindo a procedência e qualidade de seus queijos (IG, 2015). De acordo com a Coordenação de Incentivo à Indicação Geográfica de Produtos Agropecuários da Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo (CIG/SDC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o registro de IG é um “*reconhecimento da notoriedade, reputação, valor intrínseco e identidade do produto, além de proteger seu nome geográfico e distingui-lo de similares disponíveis no mercado. São produtos que apresentam uma qualidade única em função de recursos naturais como solo, vegetação, clima e saber fazer*” (MAPA, 2017).

1.3. QMA do Serro

Registros históricos retratam a produção de QMA do Serro desde meados do século XVIII, o que demonstra sua tradição e cultura, destacando-se pela qualidade e volume produzido (MENESES, 2006). Os seguintes municípios fazem parte da região produtora do QMA do Serro: Serro, Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas e Coluna (Figura 2). Atualmente, 120 produtores de QMA do Serro são registrados no IMA (IMA, 2019).



Figura 2 - As regiões Queijeiras de Minas Gerais. Fonte: Chico Severino. Disponível em: <https://www.chicoseverino.com/single-post/2017/04/26/Blog-5-Elementos---As-Regi%C3%B5es-Queijeiras-de-Minas-Gerais>

A especificidade do QMA do Serro está relacionada a uma série de fatores físicos e naturais, como altitude, clima, umidade do ar, vegetação, solo, alimentação das vacas e relevo, que revelam uma condição específica de pastagem. Outro fator determinante é a presença da Serra do Espinhaço, que delimita a região produtora do QMA, representando um obstáculo para o contato com seu entorno (FURTADO, 1980). O desenvolvimento de micro-organismos autóctones, típicos desta região, também auxiliam na maturação dos queijos, deixando-os com uma característica peculiar (MERGAREJO NETTO, 2014).

O QMA do Serro é caracterizado pela utilização de leite cru e adição do fermento láctico natural “pingo” ou da “rala”. O “pingo” é o soro eliminado da produção dos queijos, que é coletado e adicionado ao leite para a produção de novos queijos (DO VALE et al., 2018; DORES e FERREIRA, 2012; FURTADO, 1980). Nos últimos anos, alguns produtores têm utilizado como fermento natural o próprio QMA do Serro, produzido de 3 a 5 dias antes, que é ralado e adicionado ao leite, para a produção de um novo queijo (DO VALE et al., 2018). Esses fermentos endógenos contêm diferentes micro-organismos que irão direcionar a fermentação além de produzirem compostos associados a produção de sabor e aroma típicos para cada queijo (DORES e FERREIRA, 2012).

O fermento endógeno “*pingo*” apresentam principalmente BAL “*starter*” (DORES e FERREIRA, 2012; SANT’ANNA et al., 2019). As culturas “*starter*” ou iniciadoras são as responsáveis pela degradação da lactose resultando em uma rápida produção de ácido láctico, estando ainda associadas as produção de enzimas que auxiliam no processo de maturação. Normalmente essa microbiota inicial é composta por *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Leuconostoc* (BERESFORD et al., 2001).

Já a “*rala*” apresenta uma maior proporção de “*starter lactic acid bacteria*” (NSLAB), bactérias lácticas não iniciadoras, que auxiliam na maturação produzindo enzimas como proteases, peptidases e lipases, sendo representadas por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus* e *Pediococcus* (BRUNO e CARVALHO, 2009; CROW et al., 2001).

A “*rala*” surgiu para resolver um problema tecnológico dos queijos. Após a substituição dos equipamentos de madeira por materiais de polipropileno, polietileno, ardósia e aço inoxidável, houve alterações nas características físico-químicas e sensoriais dos queijos produzidos (GALINARI et al., 2014). Para evitar esse problema, os produtores passaram a utilizar a “*rala*”, pois esse fermento endógeno auxilia num maior sinérese do queijo, aumentando a firmeza do produto, atendendo assim as condições impostas pela cooperativa local, que não aceita queijos com consistência “macia” (RAFAEL, 2017). A “*rala*” também é utilizada com o objetivo de reduzir a contaminação por micro-organismos deteriorantes, garantindo a obtenção de queijos com boa qualidade microbiológica (ANDRETTA et al., 2019). Embora a utilização da “*rala*” tenha auxiliado os produtores na comercialização dos queijos, não existe um regulamento técnico para a sua utilização, sendo que esse fermento não faz parte do “*saber fazer*” tradicional, e supostamente pode alterar as características sensoriais e físico-químicas do QMA do Serro. Rafael (2017) acrescenta ainda que a utilização desses dois tipos de fermentos pode determinar diferenças nas características dos queijos, inclusive relacionados a dinâmica microbiana e inocuidade do produto.

1.4. Microbiota de QMA

1.4.1. Micro-organismos patogênicos e deterioradores

O leite e seus derivados são alimentos altamente nutritivos, sendo um ambiente propício para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deterioradores (FRANCO e LANDGRAF, 1996). O QMA do Serro é tipicamente produzido com leite cru, não sofre nenhum tratamento térmico e é altamente manipulado, fatores que podem predispor a contaminação e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e, conseqüentemente, representar riscos à saúde dos consumidores (BRANT et al., 2007; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001). Nesse sentido, a adoção de ferramentas de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) são fundamentais para garantir a inocuidade do QMA do Serro (ZAFFARI et al., 2007). *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella* e *Campylobacter* são alguns dos micro-organismos patogênicos associados a surtos de toxinfecções alimentares relacionados com o consumo de leite e derivados (DONNELLY et al., 2001; FARROKH et al., 2013; GOULET et al., 2006; MARTINS et al., 2015).

Visando a prevenção de altos níveis de contaminação, parâmetros microbiológicos foram estipulados para a presença de alguns micro-organismos em QMA (Tabela 1).

Tabela 1 – Padrões microbiológicos estabelecidos pela Lei nº 14.185 de 2002, Decreto nº 42.645 de 2002 e Decreto nº 44.864 de 2008 para a produção de QMA

Parâmetro	Padrão
Coliformes a 30 °C (UFC/g)	5,0 x 10 ³
Coliformes a 45 °C (UFC/g)	5,0 x 10 ²
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/g)	1,0 x 10 ³
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25 g
<i>Listeria</i> spp.	Ausência em 25 g

Fonte: Minas Gerais, 2002; Minas Gerais, 2008.

Coliformes são bactérias Gram-negativas, bastonetes, não formadores de esporos e capazes de fermentar a lactose produzindo ácido lático e gás (APHA, 2001). Estão presentes no solo, vegetais e fezes, sendo sua presença associada às condições insatisfatórias de higiene, durante ou após a fabricação, já que são facilmente inativados por sanitizantes (APHA, 2001; JAY et al., 2005; PINTO et al., 2011). As

bactérias pertencentes a esse grupo são dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A presença de coliformes em queijos podem causar fermentações anormais, provocando estufamento precoce nos queijos (FURTADO, 2017).

A principal espécie de *Staphylococcus* relacionada com surtos por toxinfecções de origem alimentar é o *S. aureus*, que é usualmente associada a capacidade de produzir enterotoxinas termorresistentes. Esses micro-organismos são cocos, Gram positivos, anaeróbios facultativos e tolerantes a altas concentrações de sal e nitratos (PAL et al., 2020). A presença dessa bactéria em queijos artesanais está relacionada com a utilização de leite proveniente de vacas com mastite e a condições insalubres de higiene, além da manipulação excessiva desses alimentos, uma vez que o habitat natural desses micro-organismos são o ar, solo, água, homens e animais (BRAMLEY e MCKINNOM, 1990).

Salmonella spp. pertencem à família Enterobacteriaceae e são caracterizados como bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos (JAY, 2005). Esse micro-organismo é responsável por doenças como febre tifoide, febre entérica e salmonelose, podendo ser encontrado em produtos lácteos, cárneos processados, além de ovos e carne de aves (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Espécies do gênero *Listeria* são bastonetes, Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase positivos e psicrotróficos, destacando-se *L. monocytogenes* que é o principal patógeno pertencente a esse gênero (JAY, 2005). Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, náusea e vômito, além de mal-estar e diarreia (FRANCO e LANDGRAF, 1996). *L. monocytogenes* afeta principalmente indivíduos imunologicamente debilitados, como crianças e idosos, além de gestantes, podendo ocasionar aborto, parto prematuro ou septicemia neonatal (LECUIT, 2007; MARCO et al., 2000).

1.4.2. Bactérias ácido lácticas (BAL)

BAL representam um grupo de diversos micro-organismos que são normalmente encontrados em produtos lácteos, carnes e bebidas, sendo também constituintes naturais do trato digestório, intestino, cavidade oral e vagina de mamíferos, além de solo, adubo, silagem e água (JERONYMO-GENEVIVA et al., 2014).

Esses micro-organismos apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns, sendo bastonetes ou cocos Gram positivos, imóveis, catalase negativo, anaeróbios ou aerotolerantes, não formadores de esporos, ácido-resistentes e o principal produto da fermentação de carboidratos é ácido láctico. Os gêneros mais comuns são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Fructobacillus* e *Weissella* (VINDEROLA et al., 2019).

O processo de fermentação pode ser utilizado para classificar esses micro-organismos, em homo ou heterofermentativo. No processo homofermentativo, o único composto gerado é o ácido láctico, típico dos gêneros *Lactococcus* e *Streptococcus*. Já no processo heterofermentativo, têm-se como produto final, além do ácido láctico, compostos como dióxido de carbono, etanol ou acetato, ocorrendo nas espécies de *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (PARADA et al., 2007). BAL são capazes de causar deterioração precoce nos alimentos, entretanto, por possuírem a habilidade de reduzir o teor de lactose, produzir ácido e conferir melhoria nas características sensoriais e tecnológicas, esses micro-organismos são utilizados na produção de vários alimentos e bebidas, como salames, chucrutes, azeitonas, além de serem usadas como culturas *starters* para a produção de diversos tipos de queijos e bebidas lácteas (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014; MACORI e COTTER, 2018).

Outra função importante no que se refere a presença de BAL em queijos é sua atuação na maturação, relacionando-se diretamente com as características sensoriais do produto. Essas bactérias produzem de enzimas que são responsáveis pela degradação das micelas de caseína e peptídeos, formando compostos nitrogenados, que geram aromas e sabores característicos (PAULA, CARVALHO e FURTADO, 2009). BAL ainda possuem habilidade de inibir micro-organismos patogênicos e deterioradores por meio de competição por nutrientes e oxigênio, juntamente com a capacidade de produzir substâncias antagonistas, como bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas, como ácidos e peróxido (BALCIUNAS et al., 2013; FRANZ et al., 2007; MACORI e COTTER, 2018).

1.4.2.1. Métodos de enumeração de BAL

Para a enumeração restrita de BAL, os meios de cultura utilizados necessitam de suplementos e agentes seletivos, como ácidos nucleicos, aminoácidos e peptídeos,

vitaminas, sais, bases purínicas e pirimídicas (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Desse modo, para enumeração de BAL mesófilas, a *International Organization for Standardization* publicou a ISO 15214 que indica a utilização do ágar Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) com pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$, incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $72 \pm 3\text{ h}$, com incubação sob condições de anaerobiose ou microaerofilia. Entretanto, apenas essas condições não são suficientemente seletivas para a enumeração das BAL, sendo necessária a utilização de outros testes para uma identificação preliminar das colônias obtidas, como coloração de Gram e teste de catalase (ISO, 1998). Outros meios de cultura e condições de incubação (tempo, temperatura, atmosfera) podem ser utilizados para a enumeração e detecção de BAL. Alguns desses meios de cultura estão descritos na Tabela 2. Embora sejam descritos como seletivos, essas condições de cultivo não permitem o isolamento e enumeração somente dos grupos, gêneros ou espécies-alvo de BAL previstos (Tabela 2). Isso ocorre devido à alta diversidade genética que existe entre BAL, mesmo quando se considera um gênero ou uma espécie desse grupo, essa alta diversidade determina características fisiológicas diferentes, que comprometem a seletividade adequada desses protocolos.

Nesse contexto, o sistema Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA) tem sido considerado como uma alternativa para enumeração de BAL. Esse sistema foi amplamente difundido na indústria de alimentos na década de 1980, sendo caracterizado por um sistema de duplo filme plástico, sendo uma base rígida impregnada com nutrientes e um gel hidrossolúvel, e um filme superior também impregnado com o mesmo gel hidrossolúvel e corantes indicadores. Essas placas apresentam vantagens como facilidade de execução, menor tempo de incubação, menos etapas de preparo de material, além de ocupar um menor espaço na hora da incubação e descarte (CHAMPAGNE et al., 1994; MCGREGOR et al., 1995; ORTOLANI et al., 2007). O sistema possui diversas apresentações, para enumeração de diferentes grupos microbianos: as placas Petrifilm™ Aerobic Count (AC) foram originalmente desenvolvidas para enumeração de aeróbios mesófilos, e de maneira alternativa para enumeração de BAL, quando associadas a MRS e submetidas a incubação em anaerobiose (ORTOLANI et al., 2007). O Petrifilm™ AC possui o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) como substância indicadora, um corante incolor que se torna vermelho na forma reduzida, facilitando a visualização das colônias formadas (NERO et al., 2006).

Tabela 2 – Meios de cultura usados na enumeração de bactérias ácido lácticas

Grupo	Espécie	Meio de cultura	Seletividade	Incubação	Referência
BAL	-	MRS	Anaerobiose, pH (5,7)	30 C, 72h	ISO (1998)
<i>Lactobacillus</i>	-	APT	Aerobiose	35 C, 72h	APHA (1992)
<i>Lactobacillus</i>	-	MRS	Anaerobiose	25 C, 48h	Welthagen e Viljoen (1999)
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	RAC* com verde de bromocresol e clindamicina	Anaerobiose	37 C, 48h	Darukaradhya et al. (2005)
<i>Lactococcus</i>	-	M17	Aerobiose	25 C, 48h	Welthagen e Viljoen (1999)
<i>Pediococcus</i>	-	MRS com Feniletanol	Anaerobiose	37 C, 48h	Kang e Fung (1998)
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	M17	Aerobiose	37 C, 48h	Jordano et al. (1992)
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	Ágar <i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)	Aerobiose	37 C, 24h	Dave e Shah (1996)
<i>Enterococcus</i>	-	Kanamicina Esculina Azida	Aerobiose	37 C, 24h	Gomes et al. (2008)

* RAC – Reinforced Clostridial Agar com verde de bromocresol e clindamicina

A utilização alternativa das placas Petrifilm™ AC para enumeração de BAL determinou o desenvolvimento de diversas pesquisas, que avaliaram as condições de seletividade que poderiam ser incorporadas ao sistema. Nero et al. (2006) compararam o uso de Petrifilm™ AC associado ao caldo MRS com ágar MRS para enumeração de BAL de diferentes cepas ressuspendidas e em amostras de leite cru; para isso, todas as amostras foram submetidas a diluições decimais seriadas em caldo MRS, posteriormente plaqueadas e incubadas nas condições recomendadas. Os autores constataram que não houve diferença significativa entre os métodos analisados. Entretanto, colônias de *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*) e *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) apresentaram colorações muito claras e *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) apresentou colônias muito pequenas, o que dificultou as contagens nas placas de Petrifilm™ AC.

Resultados semelhantes também foram obtidos para enumeração de BAL em leites fermentados com diferentes culturas iniciadoras. No estudo de Nero et al. (2008), amostras de leites fermentados foram diluídas em caldo MRS e plaqueadas em Petrifilm™ AC e ágar MRS. Comparando os resultados, não foi encontrada diferença significativa entre os métodos analisados. A diluição em caldo MRS permitiu nutrientes suficientes para o crescimento e formação de colônias de BAL nesse tipo de placa.

Gonçalves et al. (2009) observaram a dificuldade de alguns micro-organismos em reduzir o TTC em situações específicas, durante a produção de iogurte. Quando as culturas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), assim que adicionadas ao leite, foram diluídas em caldo MRS pH 5,4 para posterior plaqueamento em Petrifilm™ AC, esses micro-organismos sofreram um estresse, devido a acidez do meio, o que dificultou a redução do TTC, reduzindo as contagens nessas placas. Entretanto, durante a fermentação desse produto (depois de 4 h) após uma possível adaptação desses micro-organismos às condições de baixo pH, ocorreu um novo plaqueamento, onde as placas de Petrifilm™ AC se mostraram eficientes, quando comparadas com os resultados obtidos sob as mesmas condições de diluições em placas com ágar MRS, pH 5,4. Resultados opostos foram observados quando culturas de *S. thermophilus* assim que adicionadas ao leite, foram diluídas em caldo M17 e plaqueadas em placas de Petrifilm™ AC e ágar M17. Como esse caldo não havia sido acidificado, a performance do Petrifilm™ AC para a enumeração desses micro-organismos foi melhor que em ágar M17. Todavia, após o período de

fermentação, a acidez do iogurte pode ter estressado esses micro-organismos, o que dificultou a redução do TTC, resultando numa contagem inferior, quando comparado com o ágar M17.

Outros estudos foram realizados avaliando o uso de placas de Petrifilm™ AC para enumeração de BAL específicas. Freitas et al. (2013) associaram as placas de Petrifilm™ AC com caldo de Lítio e glicerol para enumeração de propionibactérias. Colombo et al. (2014) avaliaram a utilização do Petrifilm™ AC associado a caldo MRS e suplementado com vancomicina (MRS-V), e obtiveram uma boa correlação com métodos tradicionais para enumeração de *Lb. casei*. Castilho et al. (2015) compararam diferentes métodos para enumeração de BAL em salame e observaram que caldo de MRS adicionado de vermelho de clorofenol associado com as placas de Petrifilm™ AC obtiveram resultados eficientes quando comparados aos dados obtidos pela metodologia convencional de enumeração.

Após essas pesquisas, a empresa 3M Microbiology lançou em 2017 uma apresentação de placas Petrifilm™ específica para contagem de BAL: Petrifilm™ Lactic Acid Bacteria (Petrifilm™ LAB). Até o momento, apenas um estudo relacionado a utilização dessas placas foi publicado: Kanagawa et al. (2018) avaliaram a performance das placas de Petrifilm™ LAB em diversos alimentos e constataram que não houve diferença significativa entre as contagens, quando comparadas com o plaqueamento em ágar MRS. Também foi observado que as colônias obtidas das placas de Petrifilm™ foram confirmadas como BAL, confirmando a efetividade das mesmas.

Dessa forma, o presente estudo visa analisar a performance de placas Petrifilm™ LAB para enumeração de BAL em QMA do Serro, Minas Gerais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho do Petrifilm™ LAB para enumeração de bactérias ácido lácticas presentes em QMA do Serro.

2.2. Objetivos Específicos

Considerando o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Analisar o perfil da microbiota presente em QMA do Serro;
- Analisar o comportamento dessa microbiota em setes protocolos para enumeração de BAL e *Staphylococcus*;
- Enumerar BAL em QMA do Serro utilizando cinco protocolos distintos;
- Confirmar as colônias isoladas dos cinco protocolos como BAL;
- Analisar as colônias isoladas por métodos fenotípicos e moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Etapa 1 – Análise da microbiota do QMA do Serro

3.1.1. Amostragem

Amostras de QMA do Serro (n = 6) foram obtidas no centro de distribuição da Associação de Produtores de QMA do Serro (CooperSerro, Belo Horizonte, MG, Brasil), sendo 3 queijos produzidos com “*rala*” e 3 produzidos com “*pingo*”. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até a realização das análises microbiológicas. Porções de 25 g dos queijos foram obtidas assepticamente, transferidas para bags estéreis, homogeneizadas com 225 mL de tampão citrato (2% m/v) e submetidas à diluição seriada decimal em cloreto de Sódio (NaCl) (0,85% m/v). Diluições selecionadas foram semeadas *pour plate* e em duplicata em ágar Padrão de Contagem (PCA; Oxoid Ltd.), e incubadas a 35 °C por 48h para enumeração e seleção de aeróbios mesófilos (APHA, 2001). Os resultados obtidos foram expressos unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), convertidas em log e comparadas por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ($p < 0,05$) (XLSTAT, Addinsoft, New York, NY, EUA).

3.1.2. Perfil da microbiota

Após o período de incubação, colônias de cada amostra foram selecionadas de maneira aleatória (10 a 20% das contagens observadas de uma placa selecionada): 76 de queijos produzidos com “*pingo*” e 64 de queijos produzidos com “*rala*” (n = 140). As colônias foram purificadas por duas passagens repetidas em ágar BHI (Oxoid Ltd.), com incubação à 37 °C por 24h e submetidas a testes de morfologia por coloração de Gram e produção de catalase. Posteriormente, os isolados foram caracterizados em três grupos: BAL (bacilos ou cocos Gram positivos e catalase negativo), *Staphylococcus* spp. (cocos Gram positivo e catalase positivo) e outros (com características distintas de BAL e *Staphylococcus* spp.). Os isolados caracterizados como *Staphylococcus* spp. foram submetidos a testes de produção de coagulase e DNase, conforme ISO 6888-1 (ISO, 1999). Todos os isolados foram submetidos a

extração de DNA com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, EUA).

Os isolados caracterizados como BAL ($n = 100$) foram inicialmente submetidos a um agrupamento genético por rep-PCR, utilizando o primer GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (GEVERS et al., 2001; VERSALOVIC et al., 1994). Para as reações de PCR foram adicionados 12,5 μ L de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1 μ L de cada primer 50 pMol, 2 μ L de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 25 μ L. As condições de amplificação foram realizadas segundo Gevers et al. (2001). Os produtos adquiridos foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0.5x e corados utilizando GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). Os perfis genéticos foram registrados e analisados pelo software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A similaridade entre os perfis foi calculada utilizando a correlação de Dice (Otimização de 1% e 5% de tolerância) e um dendrograma foi obtido a partir dos perfis.

Considerando os perfis genéticos obtidos com uma taxa de similaridade de 80%, 54 isolados de BAL foram selecionados para identificação através do sequenciamento do gene 16S rRNA, bem como os isolados caracterizados como *Staphylococcus* ($n = 17$) e outros ($n = 22$). Alíquotas dos DNAs extraídos dos isolados selecionados ($n = 93$) foram submetidas a uma reação de PCR com os primers 8f, (5'-CAC GGA TCC AGA CTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG-3') e 1512r, (5'-GTG AAG CTT ACG G(C/T)T AGC TTG TTA CGA CTT-3'), conforme Wiesburg et al. (1991). Para as reações de PCR foram adicionados 25 μ L de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1 μ L de cada primer 25 pMol/ μ L, 2 μ L de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 50 μ L. As condições de amplificação foram realizadas segundo Wiesburg et al. (1991). Os produtos adquiridos foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0.5x, corados utilizando GelRed (Biotium) e analisados quanto a presença de um produto de PCR com 1.000 pb. Em seguida, os produtos da PCR foram armazenados em placas de 96 poços e sequenciados (MacroGen Inc., Seul, Coréia do Sul). As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do software Mega 7 e comparadas empregando o National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o software Basic Alignment Search Tool (BLAST) para identificação dos isolados.

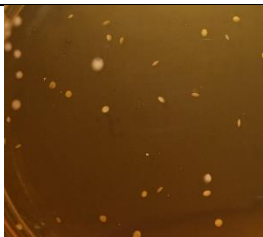
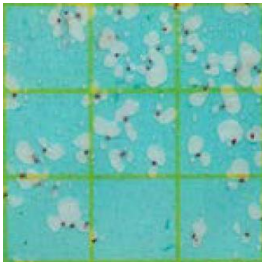
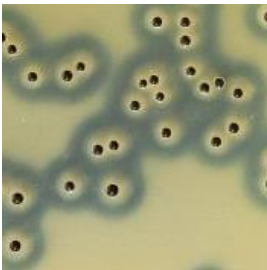
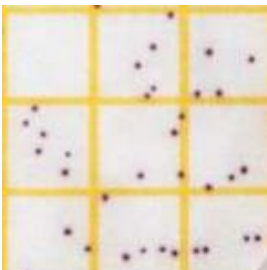
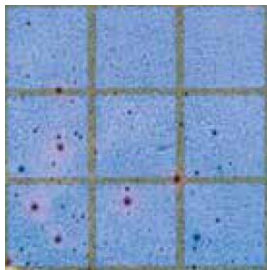
3.1.3. Comportamento da microbiota de QMA do Serro em meios de cultura seletivos

Todos os isolados obtidos das placas de PCA ($n = 140$) foram transferidos para caldo BHI (Oxoid Ltd.) e incubados *overnight* à 37 °C. Em seguida, as culturas obtidas foram diluídas em caldo BHI (Oxoid Ltd.) até obtenção de uma turbidez semelhante ao tubo 1 da escala 1 de McFarland, correspondendo à aproximadamente 3×10^8 UFC/mL, e submetidas a diluição seriada decimal em NaCl (0,85% m/v). Diluições selecionadas das culturas obtidas foram submetidas a sete protocolos para enumeração de BAL e *Staphylococcus*:

- ✓ MRS1: esse protocolo foi definido conforme a metodologia ISO 15214/1998 (ISO, 1998), em ágar MRS (BD - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) com pH ajustado para 5,7 e incubação a 30 °C por 72 h;
- ✓ MRS2: ágar MRS (BD) com pH ajustado para 5,7 e incubação em anaerobiose (GasPak, BD) a 30 °C por 72 h (ISO, 1998);
- ✓ MRS3: esse protocolo foi definido após modificações na metodologia ISO 15214/1998 (ISO, 1998), em ágar MRS (BD) com pH ajustado para 5,7 e incubação a 37 °C por 48 h;
- ✓ M17: ágar M17 (BD) e incubação a 37 °C por 48 h (APHA, 1992);
- ✓ Petrifilm LAB: Petrifilm™ LAB (3M) e incubação a 37 °C por 48 h;
- ✓ Baird-Parker: esse protocolo foi definido conforme a metodologia ISO 6888-1 (ISO, 1999), em ágar Baird-Parker (Oxoid) e incubação a 37 °C por 48 h;
- ✓ Petrifilm STX: Petrifilm™ STX (3M) e incubação a 37 °C por 24 h;

Após os períodos de incubação, foi realizada uma análise qualitativa onde se observou a presença de morfologia típica das colônias apresentadas em cada protocolo. As características de BAL e *Staphylococcus* spp. nos protocolos avaliados são apresentadas na Tabela 3. As frequências de isolados que apresentaram morfologias típicas e atípicas (ou ausência de colônias) nos protocolos avaliados foram comparadas para cada grupo microbiano definido por Chi-quadrado ($p < 0,05$, XLSTAT, Addinsoft).

Tabela 3 – Características morfológicas típicas de colônias de bactérias ácido lácticas e *Staphylococcus* em protocolos de enumeração avaliados.

Protocolo	Morfologia típica	Grupo microbiano	Exemplo
MRS1, MRS2, MRS3, M17	Colônias sem morfologia característica	Bactérias lácticas	
Petrifilm LAB	Colônias vermelho escuras associadas ou não a bolhas de gás	BAL homofermentativas (sem gás) e BAL heterofermentativas (com gás)	
Baird-Parker	Colônias cinza escuro a pretas, com dois halos: um opaco e um translúcido	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	
Petrifilm STX	Colônias vermelho-violetas	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Colônias escuras com halo rosa após adição do disco de DNase	<i>Staphylococcus</i> DNase positiva	

Ainda, as colônias formadas foram enumeradas e os resultados obtidos expressos em log UFC/mL. Os resultados das contagens foram agrupados considerando os grupos microbianos definidos e comparados por ANOVA e Tukey ($p < 0.05$) e por regressão linear ($p < 0,05$) (XLSTAT, Addinsoft).

3.2. Etapa 2 – Avaliação da performance de Petrifilm™ LAB para a enumeração de bactérias ácido lácticas em QMA do Serro produzidos com “*rala*” e “*pingo*”

3.2.1. Amostragem e diluições

Amostras de QMA do Serro foram obtidas (n = 55) no centro de distribuição da CooperSerro, sendo 48 queijos produzidos com “*rala*” e 7 produzidos com “*pingo*”. As amostras foram mantidas sob refrigeração até a realização das análises microbiológicas. Porções de 25 g das amostras foram obtidas assepticamente, transferidas para bags estéreis, homogeneizadas com 225 mL de tampão citrato (2% m/v) e submetidas à diluição seriada em escala decimal em NaCl (0,85% m/v).

3.2.2. Enumeração de BAL

Diluições selecionadas foram submetidas e cinco protocolos distintos para a enumeração de BAL:

- ✓ MRS1: esse protocolo foi definido conforme a metodologia ISO 15214/1998 (ISO, 1998), em ágar MRS (BD) com pH ajustado para 5,7 e incubação a 30 °C por 72 h;
- ✓ MRS2: ágar MRS (BD) com pH ajustado para 5,7 e incubação em anaerobiose (GasPak, BD) a 30 °C por 72 h (ISO, 1998);
- ✓ MRS3: esse protocolo foi definido após modificações na metodologia ISO 15214/1998 (ISO, 1998), em ágar MRS (BD) com pH ajustado para 5,7 e incubação a 37 °C por 48 h;
- ✓ M17: ágar M17 (BD) e incubação a 37 °C por 48 h (APHA, 1992);
- ✓ Petrifilm LAB: Petrifilm™ LAB (3M) e incubação a 37 °C por 24, 48 e 72 h;

Após incubação, as colônias formadas foram enumeradas e os resultados obtidos foram expressos em UFC/g.

3.2.3. Caracterização bioquímica

Considerando todos os protocolos avaliados e todas as amostras de QMA analisadas, colônias foram aleatoriamente selecionadas de maneira representativa

(aproximadamente 10% das colônias formadas por placa). Um total de 2.569 colônias foi obtido; todas as colônias foram purificadas após 2 a 3 passagens sucessivas em ágar MRS (BD) (30 °C por 24 h). Em seguida, os isolados foram submetidos a coloração de Gram e teste de catalase. Isolados que apresentava características de BAL (cocos ou bacilos Gram positivos e catalase negativa, $n = 1.901$) foram transferidos para caldo MRS suplementado com glicerol (20% v/v) e armazenados à -20 °C.

3.2.4. Análise de dados

As contagens obtidas pelos diferentes protocolos foram ajustadas para a enumeração de BAL, considerando a caracterização bioquímica. Em seguida, as contagens foram convertidas em $\log_{10}$ e comparadas considerando os tipos de amostras (“*pingo*”, “*rala*” e total) e tempos de incubação, por ANOVA e Tukey e regressão linear ($p < 0,05$, XLSTAT, Addinsoft). Adicionalmente, as frequências de isolados caracterizados como BAL, após os resultados da caracterização bioquímica, foram comparados por Chi-quadrado ($p < 0,05$) considerando os diferentes protocolos e tipos de amostras (“*pingo*”, “*rala*” e total) (XLSTAT, Addinsoft).

3.2.5. Caracterização molecular da microbiota láctica dos queijos

Uma amostragem das colônias caracterizadas como BAL foi selecionada para identificação molecular, considerando as colônias formadas nos protocolos Petrifilm LAB ($n = 467$) e MRS1 ($n = 541$), e obtidas de queijos “*rala*” ($n = 873$) e “*pingo*” ($n = 135$). Os isolados foram submetidos a extração de DNA com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) e rep-PCR, utilizando o primer GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (GEVERS et al., 2001; VERSALOVIC et al., 1994), conforme descrito anteriormente. Os produtos adquiridos foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0.5x e corados utilizando GelRed (Biotium), e os perfis genéticos foram registrados e analisados pelo software BioNumerics 6.6 (Applied Maths). A similaridade entre os perfis foi calculada utilizando a correlação de Dice (Otimização de 1% e 5% de tolerância) e um dendrograma foi obtido a partir dos perfis.

Considerando os perfis genéticos obtidos com uma taxa de similaridade de 80%, 384 isolados foram selecionados para identificação através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Alíquotas dos DNAs extraídos dos isolados selecionados foram submetidas a uma reação de PCR com os primers P1V1 (5'- GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3') e P4V3 (5'-ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3'), conforme Klijn et al. (1991). Para as reações de PCR foram adicionados 25 µL de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cada primer 10 pMol/ µL, 2 µL de DNA e água livre de DNA (Promega) até completar o volume de 50 µL. As condições de amplificação foram realizadas segundo Klijn et al. (1991). Os produtos adquiridos foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0.5x, corados utilizando GelRed (Biotium) e analisados quanto a presença de um produto de PCR com 1000 pb. Em seguida, os produtos da PCR foram armazenados em placas de 96 poços, sequenciados (Macrogen Inc.), e as sequências obtidas analisadas pelo NCBI utilizando o software BLAST para identificação dos isolados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etapa 1 – Análise da microbiota do QMA do Serro

4.1.1. Amostragem

Considerando as 6 amostras de QMA, a média de contagem de aeróbios mesófilos foi 7,4 log UFC/g (Tabela 4). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as contagens dos queijos produzidos com “*rala*” e “*pingo*”, que apresentaram médias de 8,3 log UFC/g e 6,5 log UFC/g, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 4 - Média geral em log UFC/g da contagem de Aeróbios mesófilos em QMA do Serro

Variável	Observações	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Contagem	6	5,066	8,756	7,381	1,339

Tabela 5 - Médias em log UFC/g por tipo de queijo da contagem de Aeróbios mesófilos em QMA do Serro

Categoria	Médias LS	Erro padrão	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)	Grupos
“ <i>Rala</i> ”	8,308	0,563	6,744	9,871	A
“ <i>Pingo</i> ”	6,454	0,563	4,891	8,018	A

Figueiredo et al. (2015) analisando leite e QMA do Serro encontraram para mesófilos aeróbios contagens variando de 5,09 a 6,91 log UFC/mL para leite e 8,62 a 9,26 log UFC/g para QMA. Pinto et al. (2009) ao analisarem QMA do Serro, encontraram valores entre 8,25 a 8,37 log UFC/g para análise de mesófilos aeróbios. Rafael (2017) encontrou em QMA da Canastra produzidos com “*pingo*”, contagens médias de mesófilos aeróbios entre 5,32 a 8,40 log UFC/g. Contagens com valores variando de 5,87 a 7,45 log UFC/g foram encontradas por Nóbrega et al. (2008) quando analisaram o mesmo tipo de queijo. Conforme ICMSF (1984), as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos estão relacionadas com a qualidade da matéria prima, a higienização do ambiente e manipuladores e o transporte e armazenamento desses produtos.

4.1.2. Perfil da microbiota

Após a caracterização dos isolados selecionados ($n = 140$), constatou-se que 71% era BAL ($n = 100$, cocos ou bacilos Gram positivo, catalase negativa). Do total de BAL, 67% dos isolados foram identificados como bacilos, sendo encontradas 31% em amostras de queijos produzidos com “*pingo*” e 36% em queijos produzidos com “*rala*”, como ilustrado na Figura 3.

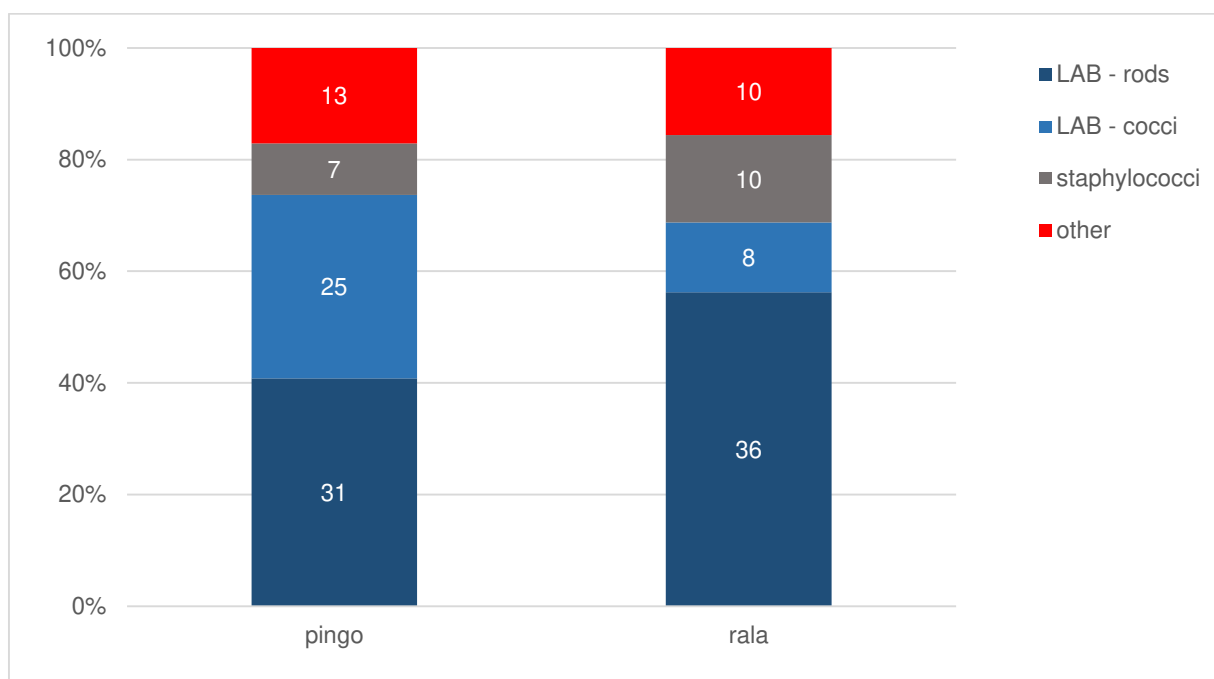


Figura 3 - grupos microbianos isolados de QMA do Serro produzidos com “*pingo*” e “*rala*” identificados bioquimicamente

Isolados identificados como *Staphylococcus* spp. totalizaram 12% das amostras, enquanto os isolados identificados como “outros” apresentaram um total de 16%. Uma similaridade entre esses grupos foi observada quando se levou em consideração a origem dos queijos (“*rala*” e “*pingo*”). A partir da amplificação de uma região do gene 16S rRNA de amostras selecionadas ($n = 93$), o perfil genético obteve um panorama similar com o apresentado anteriormente. A Tabela 6 detalha os grupos quanto aos gêneros identificados para cada tipo de queijo.

Tabela 6 – Identificação molecular a partir do sequenciamento do 16S rRNA das amostras isoladas de QMA produzidos com “pingo” e “rala”

Grupo	Gênero	“Pingo”	“Rala”	Total
BAL	<i>Lactobacillus</i> sp.	16	18	34
	<i>Lactococcus</i> sp.	0	4	4
	<i>Streptococcus</i> sp.	14	1	15
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	7	10	17
Outros	<i>Acinetobacter</i> sp.	7	10	17
	<i>Exiguobacterium</i> sp.	4	0	4
	<i>Aerococcus</i> sp.	1	0	1
	<i>Bacillus</i> sp.	1	0	1
Total		50	43	93

Lactobacillus (*Lb.*) sp. foi o gênero mais frequente em ambos os tipos de queijos. Estudos anteriores também encontraram esse gênero de BAL em queijos artesanais. Resende et al. (2011) constataram que *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum* foram as principais espécies encontradas em leite e QMA da Canastra. Luiz et al. (2016) analisando QMA de Araxá também observaram que *Lb. plantarum* e *Lb. rhamnosus* foram as espécies mais predominantes nesses queijos.

Perin et al. (2017) analisaram a microbiota de QMA de cinco regiões produtoras (Serro, Serra do Salitre, Araxá, Canastra e Campo das Vertentes) e constataram que o gênero mais prevalente em todas as regiões foi o *Lactobacillus*, sendo que em QMA do Serro destacaram-se as espécies *Lb. brevis* e *Lb. casei*. A prevalência de *Lactobacillus* spp. em queijos artesanais está relacionada com a capacidade desse gênero em se multiplicar em condições adversas, como em um ambiente mais ácido (baixo pH) e concentrações elevadas de sal (PERIN et al., 2017).

A presença de *Lactococcus* sp. em QMA já foi reportada por Resende et al. (2011), quando analisaram a microbiota de QMA da Canastra, e por Kamimura et al. (2019), que analisaram a diversidade microbiológica de queijos de diferentes regiões do Brasil, e constataram que *Lactococcus* sp. e *Streptococcus* sp. foram os gêneros predominantes nos QMA do Cerrado e Serro. Arcuri et al. (2013) também encontraram *Streptococcus* e *Lb. plantarum* em QMA do Serro utilizando a técnica de impressão digital de 16S rDNA de comunidades de bactérias por PCR-DGGE. *Streptococcus* sp. foi um dos gêneros mais predominantemente encontrados. Resultados similares foram observados por Lima et al. (2009), quando analisaram o “pingo” utilizado para produção de QMA da Serra do Salitre.

A variação da microbiota láctica em queijos artesanais pode ser explicada devido as peculiaridades das microrregiões, como clima, topografia, pastagens, raça do gado,

além das características de cada produtor, como a localidade dentro daquela microrregião, o modo de produção e utilização de “*pingo*” ou “*rala*”.

A presença de *Staphylococcus* sp. em queijos artesanais é relatada por diversos autores. Brant et al. (2007) analisaram QMA do Serro e constataram que 82,5% das amostras estavam impróprias para o consumo humano devido a altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva. Santos (2010) analisou o efeito da sazonalidade sobre a microbiota em QMA do Serro e demonstrou que, independente da estação do ano, as contagens de *S. aureus* estavam acima dos padrões estabelecidos para esse tipo de queijo. Outros trabalhos também encontraram resultados semelhantes em relação a *Staphylococcus* spp. (ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2000; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; LUBECK et al., 2001; PEREIRA et al., 2008). Andretta et al. (2019) analisaram a inocuidade microbiológica de QMA do Serro e encontraram altas contagens de *S. aureus* em ambos os tipos de queijos (“*rala*” e “*pingo*”), porém, não foram constatadas a presença de enterotoxinas produzidas por esses micro-organismos. A presença de *Staphylococcus* spp. pode ser relacionada com a ausência de condições higiênico-sanitárias no transporte e armazenamento, manejo inadequado e a ausência de sanidade do rebanho (BRANT et al., 2007). Além disso, essas altas contagens também podem estar relacionadas à produção manual desse tipo de queijo, já que *Staphylococcus* spp. também faz parte da microbiota natural do corpo humano.

Acinetobacter são bactérias Gram negativas, psicrotróficas e produtoras de lipases (PINTO et al., 2015). *Acinetobacter* sp. e *Aerococcus* sp. já foram identificados em amostras de leite e queijo. Rasofolo et al. (2010) analisaram o armazenamento de leite submetido a diversos tratamentos térmicos e identificaram que as espécies *Aerococcus viridians* (*A. viridians*) e *Acinetobacter calcoaceticus* permaneceram estáveis durante 3 dias de armazenamento a 4 °C. Castro et al. (2016) identificou *A. viridians* em amostra de soro fermento utilizado na produção de QMA do Campo das Vertentes. Hantsis-Zacharov e Halpern (2007) e Raats et al. (2011) identificaram espécies de *Acinetobacter* em leite cru refrigerado. A presença de *Acinetobacter* sp. também foi descrita por Larpin-Laborde et al. (2011) em queijo Livarot e por Pehrson (2017) em QMA da Mantiqueira. Esse micro-organismo é produtor de biofilmes, podendo aderir fortemente as superfícies de equipamentos em indústrias de laticínios, como foi descrito por Cherif-Antar et al. (2016). *Acinetobacter* sp. pode estar presente

na água, no solo, na pele das pessoas, principalmente na região axilar e dedos, podendo ser facilmente transferido para o leite e queijo (CHOI et al., 2005).

A presença de *Exiguobacterium* nesse trabalho foi identificado em queijos produzido com “pingo”. Esse gênero também foi relatado em queijo artesanal produzido na região amazônica, no trabalho de Martins et al. (2018), que identificou a espécie *E. acetylicum*. *Exiguobacterium* também já foi identificado em camarão por Lopez-Cortes et al. (2006). Essa bactéria está presente em diversos ambientes, como fontes termais, gelo glacial da Groenlândia e até na rizosfera de plantas, mas é pouco encontrada em alimentos (CHATURVEDI e SHIVAJI, 2006; CRAPART et al., 2007).

4.1.3. Comportamento da microbiota em meios de cultura seletivos

Após a identificação bioquímica e molecular dos isolados obtidos de QMA do Serro, todos os isolados foram plaqueados nos sete protocolos descritos no item 3.1.3. Na Tabela 7 encontra-se a frequência de colônias típicas apresentadas por cada grupo (BAL, *Staphylococcus* spp. e outros) nos diferentes protocolos analisados.

Tabela 7 – Frequência e (%) de isolados de BAL, *Staphylococcus* e outros grupos, obtidos de QMA do Serro, que apresentaram morfologia típica em meios de cultura e protocolos avaliados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*.

Grupo alvo	Protocolo	Isolados		
		BAL (n = 100)	<i>Staphylococcus</i> (n = 17)	Outros (n = 23)
BAL	Petrifilm LAB	92 (92,0%)	12 (70,6%)	14 (60,9%)
	M17	93 (93,0%)	17 (100,0%)	23 (100,0%)
	MRS1	83 (83,0%)	12 (70,6%)	12 (52,2%)
	MRS2	89 (89,0%)	10 (58,8%)	13 (56,5%)
	MRS3	82 (82,0%)	7 (41,2%)	12 (52,2%)
<i>Staphylococcus</i>	Petrifilm STX	13 (13,0%)	5 (29,4%)	5 (21,7%)
	Baird-Parker	7 (7,0%)	2 (11,8%)	2 (8,7%)

Em relação a BAL, foi possível observar que todos os protocolos utilizados para enumeração apresentaram bons desempenhos, destacando-se o Petrifilm™ LAB e o M17, que identificaram 92 e 93%, respectivamente, dos isolados desse grupo. Entretanto, foi observado que outros grupos microbianos também apresentaram colônias típicas nos protocolos utilizados para a enumeração de BAL. O protocolo M17 demonstrou ser o menos seletivo, sendo observado a presença de colônias típicas de todos os isolados caracterizados como *Staphylococcus* spp. e “outros” nesse meio de

cultura. No Petrifilm™ LAB foi identificado a presença de colônias com características típicas de BAL dos isolados de *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. aureus*, *Acinetobacter* spp. e *Exiguobacterium* sp. (Figura 4). A presença desses micro-organismos também foi constatada nos protocolos MRS1, MRS2 e MRS3, exceto *Exiguobacterium* spp. que não formou colônias visíveis no protocolo MRS2.

Para o grupo alvo de *Staphylococcus* spp. foi possível observar que uma baixa frequência desses isolados formaram colônias típicas nos protocolos Petrifilm™ STX e Baird-Parker. Porém, a presença de colônias típicas de BAL e “outros” foram identificadas. No Petrifilm™ STX, alguns isolados identificados como *Lb. plantarum* e *L. lactis* apresentaram morfologia típica, bem como alguns isolados de *Acinetobacter* spp. No ágar Baird-Parker isolados identificados como *Lb. plantarum*, *Streptococcus gallolyticus* e *Acinetobacter* spp. também apresentaram colônias típicas de *Staphylococcus* (Figura 4).

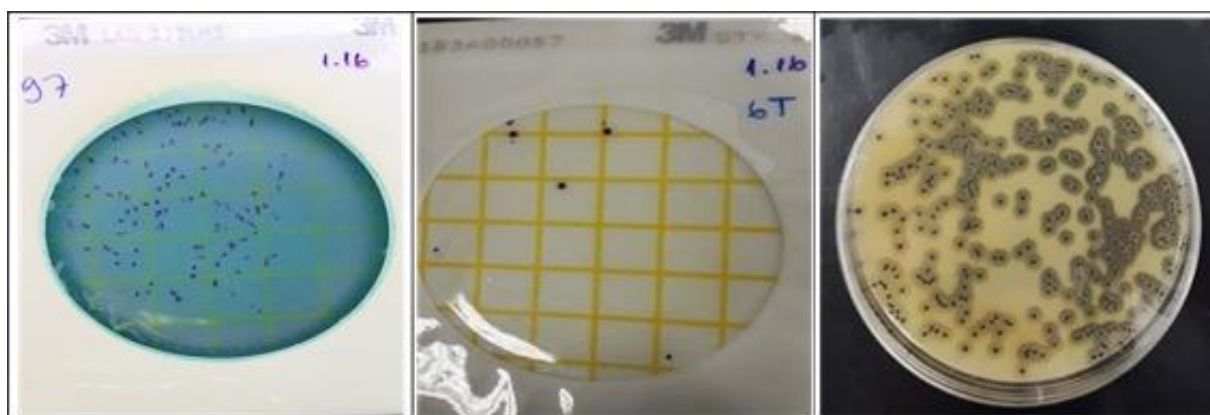


Figura 4 - Morfologias de isolados identificados como *Acinetobacter* sp em placas Petrifilm™ LAB (esquerda), Petrifilm™ STX (centro) e em ágar Baird-Parker (direita).

Na Tabela 8 encontra-se as frequências dos isolados que apresentaram colônias atípicas ou não formaram colônias de cada grupo (BAL, *Staphylococcus* e outros) nos diferentes protocolos analisados.

Tabela 8 – Frequência e (%) de isolados de BAL, *Staphylococcus* e outros grupos, obtidos de QMA do Serro, que apresentaram morfologia atípica em meios de cultura e protocolos avaliados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*.

Grupo alvo	Método	Isolados		
		BAL (n = 100)	<i>Staphylococcus</i> (n = 17)	Outros (n = 23)
BAL	Petrifilm LAB	8 (8%)	5 (29%)	9 (39%)
	M17	7 (7%)	0 (0%)	0 (0%)
	MRS1	17 (17%)	5 (29%)	11 (47%)
	MRS2	11 (11%)	7 (41%)	10 (43%)
	MRS3	18 (18%)	10 (58%)	11 (47%)
<i>Staphylococcus</i>	Petrifilm STX	87 (87%)	12 (70%)	18 (78%)
	Baird-Parker	93 (93%)	15 (88%)	21 (91%)

Os meios de cultura utilizados para a enumeração de BAL apresentaram baixas frequências de isolados com morfologia atípica ou ausência de colônias. Em relação ao Petrifilm™ LAB, cinco isolados identificados como *Lb. plantarum* e três identificados como *S. infantarius* não apresentaram colônias nas placas (Figura 5). Essas espécies também não foram identificadas nos demais protocolos. No MRS1, além desses isolados, uma amostra identificada como *Bacillus* sp. também não apresentou formação de colônias nas placas. Já no protocolo MRS3, além dos isolados de *Lb. plantarum* e *S. infantarius*, um isolado de *L. lactis* também não formou colônias visíveis.

Para o grupo alvo *Staphylococcus* spp., foi possível observar que boa parte dos isolados formaram colônias atípicas nos protocolos Petrifilm™ STX e Baird-Parker. Nas placas de Petrifilm™ STX, foi observado que seis isolados identificados como *S. epidermidis*, três identificados como *S. capitis*, dois *S. warneri* e um *S. aureus* apresentaram colônias atípicas. Já nas placas com ágar Baird-Parker, sete isolados de *S. epidermidis*, quatro *S. aureus*, três identificados como *S. capitis* e um isolado de *Staphylococcus* spp. apresentaram características atípicas (Figura 5).

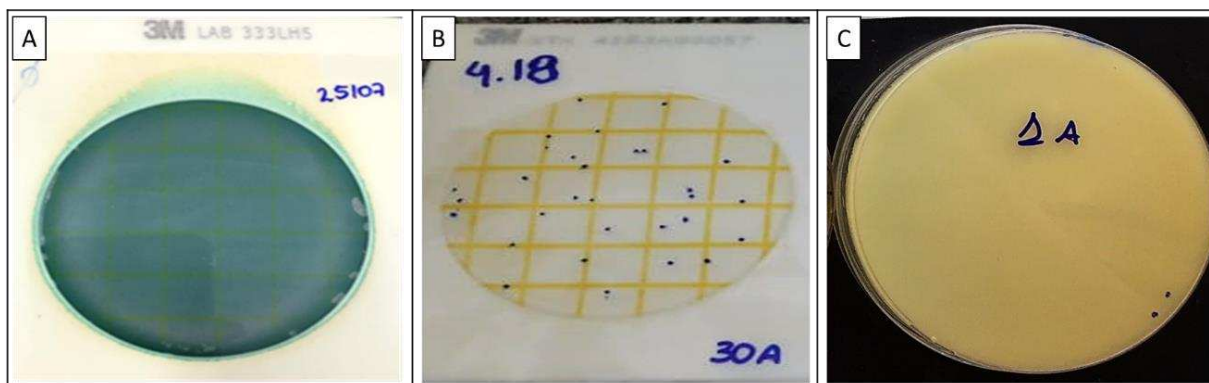


Figura 5 - A) ausência de colônias de *S. infantarius* em placa de Petrifilm™ LAB; B) ausência de colônias típicas em placa de Petrifilm™ STX inoculada com *S. epidermidis*; C) ausência de colônias típicas de *S. aureus* em ágar Baird-Parker.

Esses resultados também podem ser analisados individualmente para cada tipo de queijo (“*rala*” e “*pingo*”). Na Tabela 9 encontra-se as frequências da presença de colônias típicas apresentadas por cada grupo (BAL, *Staphylococcus* e outros) nos diferentes protocolos analisados, dos isolados obtidos de QMA do Serro produzido com “*pingo*”. Na Tabela 10 estão os resultados da frequência de colônias atípicas apresentadas em cada grupo nos protocolos avaliados. Também é possível observar o comportamento desses grupos de micro-organismos isolados de QMA do Serro produzido com “*rala*”, nos diferentes protocolos. Esses dados estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 9 – Frequência e (%) de isolados de BAL, *Staphylococcus* e outros grupos, obtidos de QMA do Serro produzindo com “*pingo*”, que apresentaram morfologia típica em meios de cultura e protocolos avaliados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*.

Grupo alvo	Método	Isolados		
		BAL (n = 56)	<i>Staphylococcus</i> (n = 7)	Outros (n = 13)
BAL	Petrifilm LAB	52 (92,9%)	4 (57,1%)	9 (69,2%)
	M17	55 (98,2%)	7 (100,0%)	13 (100,0%)
	MRS1	43 (76,8%)	4 (57,1%)	5 (38,5%)
	MRS2	49 (87,5%)	4 (57,1%)	7 (53,8%)
	MRS3	45 (80,4%)	3 (42,9%)	7 (53,8%)
<i>Staphylococcus</i>	Petrifilm STX	3 (5,4%)	0 (0,0%)	2 (15,4%)
	Baird-Parker	2 (3,6%)	1 (14,3%)	1 (7,7%)

Tabela 10 – Frequência e (%) de isolados de BAL, *Staphylococcus* e outros grupos, obtidos de QMA do Serro produzindo com “pingo”, que apresentaram morfologia atípica em meios de cultura e protocolos avaliados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*.

Grupo alvo	Método	Isolados		
		BAL (n = 56)	<i>Staphylococcus</i> (n = 7)	Outros (n = 13)
BAL	Petrifilm LAB	4 (7%)	3 (43%)	4 (30%)
	M17	1 (1,8%)	0 (0%)	0 (0%)
	MRS1	13 (23%)	3 (43%)	8 (61%)
	MRS2	7 (12,5%)	3 (43%)	6 (46%)
	MRS3	11 (19%)	4 (57%)	6 (46%)
<i>Staphylococcus</i>	Petrifilm STX	53 (94%)	7 (100%)	11 (84%)
	Baird-Parker	54 (96%)	6 (85%)	12 (92%)

Tabela 11 – Frequência e (%) de isolados de BAL, *Staphylococcus* e outros grupos, obtidos de QMA do Serro produzindo com “rala”, que apresentaram morfologia típica em meios de cultura e protocolos avaliados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*.

Grupo alvo	Método	Isolados		
		BAL (n = 44)	<i>Staphylococcus</i> (n = 10)	Outros (n = 10)
BAL	Petrifilm LAB	40 (90,9%)	8 (80,0%)	5 (50,0%)
	M17	38 (86,4%)	10 (100,0%)	10 (100,0%)
	MRS1	40 (90,9%)	8 (80,0%)	7 (70,0%)
	MRS2	40 (90,9%)	6 (60,0%)	6 (60,0%)
	MRS3	37 (84,1%)	4 (40,0%)	5 (50,0%)
<i>Staphylococcus</i>	Petrifilm STX	10 (22,7%)	5 (50,0%)	3 (30,0%)
	Baird-Parker	5 (11,4%)	1 (10,0%)	1 (10,0%)

Tabela 12 – Frequência e (%) de isolados de BAL, *Staphylococcus* e outros grupos, obtidos de QMA do Serro produzindo com “rala”, que apresentaram morfologia atípica em meios de cultura e protocolos avaliados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*.

Grupo alvo	Método	Isolados		
		BAL (n = 44)	<i>Staphylococcus</i> (n = 10)	Outros (n = 10)
BAL	Petrifilm LAB	4 (9%)	2 (20%)	5 (50%)
	M17	6 (13%)	0 (0%)	0 (0%)
	MRS1	4 (9%)	2 (20%)	3 (30%)
	MRS2	4 (9%)	4 (40%)	4 (40%)
	MRS3	7 (15%)	6 (60%)	5 (50%)
<i>Staphylococcus</i>	Petrifilm STX	34 (77%)	5 (50%)	7 (70%)
	Baird-Parker	39 (88%)	9 (90%)	9 (90%)

Em relação aos isolados de BAL obtidos de queijos produzidos com “pingo”, uma maior frequência de colônias típicas foi identificada nos protocolos Petrifilm LAB, M17 e MRS2 (Tabela 9). Para os isolados obtidos de queijo produzido com “rala”, onde uma microbiota mais estável é esperada, foi possível observar similaridade entre

os cinco protocolos (Tabela 11). Esses dados ficam evidentes quando se calcula a correlação entre o protocolo Petrifilm LAB com os demais utilizados para enumeração de BAL, como é apresentado na Tabela 13.

Para o grupo de *Staphylococcus* spp. foi possível verificar comportamentos semelhantes dos isolados obtidos de QMA do Serro produzidos com “*pingo*” (n = 10), onde nenhum isolado formou colônia típica no Petrifilm™ STX e apenas um deles formou colônias típicas no ágar Baird-Parker. Já nos isolados obtidos de queijos produzido com “*rala*” (n = 10) foi observado que 50% apresentaram colônias típicas no Petrifilm™ STX enquanto apenas 10% apresentaram colônias típicas no Baird-Parker, o que justifica a baixa correlação entre esses protocolos para esse tipo de queijo apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Correlação entre contagens de colônias típicas dos protocolos utilizados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*, para todos os queijos, queijos produzidos com “pingo” e queijos produzidos com “rala”

Grupo	Queijo	Comparação	r(X,Y)	r ²	T	P	N	constant dep: Y	slope dep: Y	constant dep: X	Slope dep: X
BAL	total	Petrifilm LAB x M17	0,38	0,14	3,75	0,0003	87	6,04	0,24	3,11	0,59
		Petrifilm LAB x MRS1	0,38	0,14	3,63	0,0005	82	3,97	0,44	5,44	0,32
		Petrifilm LAB x MRS2	0,50	0,25	5,36	0,0000	87	2,58	0,63	4,83	0,40
		Petrifilm LAB x MRS3	0,45	0,20	4,45	0,0000	81	2,74	0,60	5,36	0,33
	“pingo”	Petrifilm LAB x M17	0,46	0,22	3,70	0,0005	52	5,14	0,34	2,90	0,63
		Petrifilm LAB x MRS1	0,08	0,01	0,50	0,6180	43	6,26	0,13	7,51	0,05
		Petrifilm LAB x MRS2	0,30	0,09	2,14	0,0373	49	3,88	0,44	6,37	0,20
		Petrifilm LAB x MRS3	0,15	0,02	0,98	0,3345	44	5,45	0,23	7,15	0,10
	“rala”	Petrifilm LAB x M17	0,37	0,14	2,32	0,0267	35	6,74	0,17	1,18	0,82
		Petrifilm LAB x MRS1	0,72	0,52	6,28	0,0000	39	2,78	0,63	1,48	0,82
		Petrifilm LAB x MRS2	0,79	0,63	7,81	0,0000	38	1,76	0,77	1,46	0,82
		Petrifilm LAB x MRS3	0,80	0,64	7,97	0,0000	37	1,01	0,86	2,01	0,75
<i>Staphylococcus</i>	todos	Petrifilm STX x Baird-Parker	0,57	0,32	2,49	0,0272	15	3,50	0,55	3,05	0,59
	“pingo”	Petrifilm STX x Baird-Parker	0,90	0,82	4,69	0,0054	7	-1,63	1,20	2,55	0,68
	“rala”	Petrifilm STX x Baird-Parker	0,40	0,16	1,07	0,3261	8	4,75	0,38	4,18	0,42

Vale salientar que os resultados da frequência de isolados que apresentaram colônias típicas nesse trabalho são para o gênero *Staphylococcus*. Entretanto, o Petrifilm™ STX é indicado para enumeração de *Staphylococcus* DNase positiva. Quando esse dado é levado em consideração, a porcentagem da frequência de isolados com características típicas aumentam. Das 17 cepas caracterizadas como *Staphylococcus* spp, apenas 4 isolados são de espécies que apresentam resultados positivos para o teste de DNase (*S. aureus*), sendo que 3 delas formaram colônias típicas no protocolo Petrifilm STX. Assim, a frequência de isolados *Staphylococcus* DNase positiva que apresentaram morfologia típica em Petrifilm™ STX, para todos os queijos, passa a ser de 75%.

Em relação as médias obtidas em cada protocolo, considerando tipos de QMA do Serro e grupos microbianos avaliados, foram observadas diferenças significativas apenas para BAL em Petrifilm™ LAB e M17 em algumas situações (Tabelas 14). As contagens de BAL obtidas em Petrifilm™ LAB e M17 foram significativamente maiores que as contagens obtidas pelos outros protocolos em isolados obtidos de queijos produzidos com “pingo” e considerando ambos tipos de queijo (Tabela 14). Em relação a *Staphylococcus* spp., entretanto, apesar das baixas correlações, as médias das contagens dos isolados obtidos dos diferentes tipos de queijos e por diferentes protocolos não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$, Tabela 15).

Tabela 14 – Médias $\pm$ erro padrão de contagens de culturas de BAL obtidas de QMA do Serro (“pingo” e “rala”) e semeadas em 5 meios de cultura/protocolos diferentes de enumeração (resultados em log UFC/mL).

Queijo	Petrifilm LAB	M17	MRS1	MRS2	MRS3	ANOVA
“pingo”	7,86 $\pm$ 0,41 a	7,80 $\pm$ 0,36 a	7,24 $\pm$ 0,65 b	7,35 $\pm$ 0,62 b	7,26 $\pm$ 0,67 b	GL = 4, F = 14,01, P < 0,001
“rala”	7,81 $\pm$ 0,69 b	8,07 $\pm$ 0,31 a	7,66 $\pm$ 0,61 b	7,75 $\pm$ 0,58 b	7,71 $\pm$ 0,63 b	GL = 4, F = 3,33, P = 0,012
todos	7,82 $\pm$ 0,57 a	7,91 $\pm$ 0,36 a	7,44 $\pm$ 0,66 b	7,53 $\pm$ 0,63 b	7,46 $\pm$ 0,69 b	GL = 4, F = 12,07, P < 0,001

Obs: médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA, por grupo.

Tabela 15 – Médias $\pm$ erro padrão de contagens de culturas de *Staphylococcus* obtidas de QMA do Serro (“pingo” e “rala”) e semeadas em 2 meios de cultura/protocolos diferentes de enumeração (resultados em log UFC/mL).

Queijo	Petrifilm STX	Baird-Parker	ANOVA
“pingo”	7,81 $\pm$ 0,38 a	7,72 $\pm$ 0,51 a	GL = 1, F = 0.17, P = 0.691
“rala”	7,33 $\pm$ 0,57 a	7,57 $\pm$ 0,55 a	GL = 1, F = 1.15, P = 0.300
Todos	7,56 $\pm$ 0,53 a	7,64 $\pm$ 0,52 a	GL = 1, F = 0.31, P = 0.583

Obs: médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes por ANOVA.

Para as análises realizadas, foi possível verificar um bom desempenho dos protocolos de enumeração de BAL, destacando-se os protocolos Petrifilm™ LAB e M17. Entretanto, a presença de outros grupos microbianos que possuem a capacidade de formar colônias com morfologia típica em meios de cultura que enumeram BAL é uma preocupação analítica, já que essa característica pode afetar a confiabilidade dos resultados obtidos. A baixa seletividade do meio M17 e MRS em produtos com leite cru já foi descrita anteriormente. Pouillet et al. (1993) analisaram BAL do queijo Casar de Cáceres e verificaram que 18,2% dos isolados obtidos do plaqueamento em ágar M17 não eram BAL, enquanto 8,9% dos isolados em ágar MRS também não faziam parte desse grupo. Tornadijo et al. (1995) verificaram as alterações microbiológicas durante a fabricação e maturação do queijo espanhol Armada, produzido com leite cru de cabra. Esses autores constataram que 10% e 7,5% das colônias isoladas do plaqueamento em ágar M17, de leite e queijo, respectivamente, não eram identificadas como BAL, após confirmação com testes de coloração de Gram e produção de catalase.

Potes e Marinho (2007) investigaram diferentes meios de cultura para identificação de BAL provenientes de um queijo Português. Das estirpes isoladas dos meios MRS e M17 em aerobiose, 10% e 26,4%, respectivamente, foram identificadas como não BAL. Nesses mesmos meios de cultura, mas em condição de anaerobiose, 10,5% das colônias isoladas em MRS e 23% das isoladas em M17 também foram caracterizadas como não BAL. Analisando BAL isoladas de diferentes produtos lácteos de diferentes origens, Masalam et al. (2018) observaram que 92,47% dos isolados obtidos nas placas com ágar MRS eram Gram positivos, entretanto 29% desses isolados apresentaram resultados positivos para teste de catalase. Yunita e Dodd, (2018) analisando a comunidade microbiana do queijo de leite cru com “veias azuis” do Reino Unido, semearam amostras desses queijos em diversos meios de cultura para isolar BAL. Ao selecionar colônias do ágar M17 e amplificar a região do gene 16S rRNA desses isolados, os autores identificaram a presença de *Microbacterium* sp., *Staphylococcus devriesei*, *Sphingobacterium* sp., *Staphylococcus gallinarum* e *Kocuria* sp. entre as amostras, sendo que os dois últimos também foram identificados de isolados selecionados do ágar MRS. A possibilidade de desenvolvimento de outros micro-organismos em ágar MRS é descrito pela própria ISO 15214 (ISO, 1998), fazendo necessária a confirmação por testes de coloração de

Gram e produção de catalase, sendo que esses procedimentos, quando realizados, devem ser descritos.

Entre os protocolos testados para enumeração de *Staphylococcus* sp., foi possível observar que, para todos os queijos e queijos produzidos com “pingo”, houve correlações significativas entre os métodos (acima de 0,57), enquanto que para queijos produzidos com “rala”, não foi encontrado correlações significativas (Tabelas 13). Ainda, as médias das contagens dos isolados obtidas por Petrifilm™ STX e Baird-Parker não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$, Tabela 15). Equivalência entre esses métodos já haviam sido constatadas por outros autores. Ingham et al. (2003) analisaram a performance das placas Petrifilm™ STX comparando-as com placas contendo ágar Baird-Parker para enumeração de *S. aureus* em alimentos natural e artificialmente contaminados. Em leite cru, os autores confirmaram que 60% dos isolados obtidos no Petrifilm™ STX e 53% dos obtidos em Baird-Parker eram *S. aureus*. Em aves mecanicamente separadas, 55% e 50% dos isolados foram identificados com *S. aureus* nos métodos Petrifilm™ STX e Baird-Parker, respectivamente. Em queijos parmesão contaminados artificialmente, não foi observado diferença significativa entre os métodos testados. Os autores evidenciaram ainda, que ambos os testes apresentaram baixa seletividade para *S. aureus*, independente da origem do produto, devido à baixa porcentagem de isolados identificados como o micro-organismo alvo.

Analisando a presença de *S. aureus* em cinco produtos de origens lácteas (sorvete, leite cru, iogurte, soro de leite em pó e queijo), Sibernagel et al. (2003) não encontraram diferença significativa entre os protocolos Petrifilm™ STX e Baird-Parker. O mesmo foi observado por Viçosa et al. (2010) quando avaliaram metodologias e meios de cultura para a enumeração de *Staphylococcus* coagulase e termonuclease positivo, em leite cru e queijos frescos. Os autores avaliaram esses produtos quando naturalmente e artificialmente contaminados com cepas de referência de *Staphylococcus* coagulase positiva, onde as amostras foram submetidas a enumeração em ágar Baird-Parker, ágar de plasma de coelho fibrinogênio e Petrifilm™ STX. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as contagens obtidas dos três meios de cultura. Souza et al. (2015) analisaram a aplicabilidade de placas de Petrifilm™ para enumeração de diversos grupos microbianos em leite de ovelha. Para o gênero *Staphylococcus*, os autores compararam os resultados da enumeração em Petrifilm™ STX e ágar Baird-Parker e constataram

uma maior capacidade de recuperação de colônias no Petrifilm™ STX, já que esse método obteve maiores contagens de *S. aureus*.

Foi possível observar que os isolados de ambos os tipos de queijo não se comportaram da maneira esperada nos meios de cultura utilizados para enumeração dos dois grupos microbianos. Os diferentes isolados obtidos desses produtos, devido a sua diversidade, possuem características bioquímicas bem diversificadas, o que certamente comprometeu a utilização dos protocolos, uma vez que esses são baseados em características comuns dos componentes dos diferentes grupos microbianos.

4.1. Etapa 2 – Avaliação da performance de Petrifilm™ LAB para a enumeração de BAL em QMA do Serro produzidos com “*rala*” e “*pingo*”

As médias das contagens de BAL enumeradas pelos cinco protocolos, após ajuste considerando as análises bioquímicas, estão apresentadas na Tabela 16. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias obtidas pelos protocolos analisados, independente dos tempos de incubação ($p > 0,05$).

Tabela 16 – Média ($\pm$ erro padrão) das contagens de BAL obtidas de QMA do Serro (“*pingo*” = 7, “*rala*” = 48) utilizando diferentes protocolos de enumeração e tempos de incubação (resultados em log UFC/mL)

Grupo	Método	Tempo			ANOVA
		24h	48h	72h	
BAL	Petrifilm LAB	6,49 $\pm$ 0,14 a	6,76 $\pm$ 0,13 a	6,78 $\pm$ 0,13 a	GL = 6, F = 1,90, p = 0,080
	M17	-	-	6,54 $\pm$ 0,14 a	
	MRS1	-	-	6,76 $\pm$ 0,13 a	
	MRS2	-	-	6,73 $\pm$ 0,13 a	
	MRS3	-	6,31 $\pm$ 0,13 a	-	

Kanagawa et al. (2018) avaliaram a performance do Petrifilm™ LAB para enumeração de BAL em diversos alimentos, como vegetais cortados, picles, peixe cru, carne processada, entre outros. Os resultados foram comparados com análise desses mesmos produtos semeados em ágar MRS e incubadas a 30 °C/ 72h. Os autores não encontraram diferenças significativas entre as contagens obtidas, conforme observado nesse estudo.

Quando se analisa individualmente os tipos de QMA do Serro (“*rala*” e “*pingo*”) também não há diferença significativa entre as médias, como são apresentados nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 – Média ($\pm$ desvio padrão) das contagens de BAL obtidas de QMA do Serro produzidos com “*pingo*” (n = 7) utilizando diferentes protocolos de enumeração e tempos de incubação (resultados em log UFC/mL)

Método	Tempo			ANOVA
	24h	48h	72h	
Petrifilm LAB	6,69 $\pm$ 0,41 a	7,08 $\pm$ 0,41 a	7,11 $\pm$ 0,41 a	GL = 6, F = 0,34, p = 0,913
M17	-	-	6,77 $\pm$ 0,44 a	
MRS1	-	-	6,54 $\pm$ 0,44 a	
MRS2	-	-	6,71 $\pm$ 0,41 a	
MRS3	-	6,48 $\pm$ 0,44 a	-	

Tabela 18 – Média ($\pm$ desvio padrão) das contagens de BAL obtidas de QMA do Serro produzidos com “*rala*” (n = 48) utilizando diferentes protocolos de enumeração e tempos de incubação (resultados em log UFC/mL)

Método	Tempo			ANOVA
	24h	48h	72h	
Petrifilm LAB	6,45 $\pm$ 0,15 a	6,70 $\pm$ 0,14 a	6,73 $\pm$ 0,14 a	GL = 6, F = 1,85, p = 0,090
M17	-	-	6,51 $\pm$ 0,14 a	
MRS1	-	-	6,79 $\pm$ 0,13 a	
MRS2	-	-	6,73 $\pm$ 0,13 a	
MRS3	-	6,28 $\pm$ 0,14 a	-	

Embora não existam estudos avaliando o desempenho de Petrifilm™ LAB para a enumeração de BAL em queijos artesanais, diversos estudos já foram realizados associando o Petrifilm™ AC para enumeração de BAL em produtos lácteos e não lácteos (CASTILHO et al., 2015; COLOMBO et al., 2013; FREITAS et al., 2013; GONÇALVES et al., 2009; MIRANDA et al., 2011; NERO et al., 2006; NERO et al., 2008). Assim como observado no presente estudo, as pesquisas demonstraram não haver diferenças significativas entre as contagens do método alternativo (Petrifilm™) e as análises convencionais.

Entretanto, quando se é analisado os índices de correlações entre os protocolos, os resultados desse trabalho apresentam um perfil diferente dos demais, havendo uma baixa correlação entre os meios, como pode ser ressaltado nas Tabelas 19, 20 e 21. Quando se analisa a correlação entre as contagens de todos os queijos (“*rala*” e “*pingo*”) observa-se que o protocolo Petrifilm™ LAB nos diferentes tempos (24, 48 e 72h) se correlaciona estatisticamente com os protocolos MRS1 e MRS3 (Tabela 19). O mesmo é observado quando a correlação é entre os queijos produzidos com “*rala*” (Tabela 20). Para queijos produzidos com “*pingo*”, as contagens de BAL obtidas por Petrifilm™ LAB têm índices de correlação superiores a 0,87 com o protocolo MRS3, nos tempos 48 e 72h. Entretanto, o número de amostras desse tipo de queijo é baixo (n = 7), interferindo assim nos resultados obtidos (Tabela 21).

Tabela 19 - Correlação entre contagens – todos os queijos

Comparação (x:y)	r(X,Y)	r ²	T	P	N	Constant dep Y	Slope dep Y	Constant dep X	Slope dep X
Petri LAB 24h: M17	0,113437	0,012868	0,67547	0,503819	37	5,952160	0,101271	5,501402	0,127066
MRS1	0,486345	0,236532	3,43116	0,001463	40	4,117263	0,405372	2,529465	0,583493
MRS2	0,145220	0,021089	0,92830	0,358823	42	6,038473	0,114297	5,249644	0,184510
MRS3	0,529714	0,280597	3,74720	0,000626	38	2,605881	0,580466	3,362922	0,483399
Petri LAB 48h: M17	0,278842	0,077753	1,81329	0,077488	41	4,855042	0,254533	4,647037	0,305474
MRS1	0,549422	0,301865	4,31192	0,000093	45	3,474472	0,480388	2,520331	0,628377
MRS2	0,255183	0,065118	1,77044	0,083429	47	5,179282	0,229787	4,857876	0,283387
MRS3	0,579314	0,335605	4,55085	0,000047	43	1,783062	0,672221	3,570098	0,499247
Petri LAB 72h: M17	0,246794	0,060907	1,61068	0,115113	42	5,078199	0,222093	4,868633	0,274243
MRS1	0,533551	0,284676	4,18457	0,000134	46	3,588197	0,460632	2,617283	0,618013
MRS2	0,280358	0,078600	1,98092	0,053597	48	5,026611	0,249940	4,671573	0,314477
MRS3	0,596202	0,355456	4,81273	0,000020	44	1,693432	0,682287	3,458597	0,520978

Tabela 20 - Correlação entre contagens – queijos “*rala*” (n = 48)

Comparação (x:y)		r(X,Y)	r ²	t	P	N	Constant dep Y	Slope dep Y	Constant dep X	Slope dep X
Petri LAB 24h:	M17	0,023499	0,000552	0,12658	0,900144	31	6,45271	0,016954	6,10533	0,032572
	MRS1	0,494660	0,244689	3,21973	0,002940	34	4,26664	0,387354	2,18605	0,631693
	MRS2	0,117319	0,013764	0,67863	0,502103	35	6,22298	0,088550	5,40696	0,155435
	MRS3	0,497366	0,247373	3,14013	0,003777	32	3,04337	0,508406	3,35267	0,486567
Petri LAB 48h:	M17	0,236501	0,055933	1,39826	0,171361	35	5,29915	0,183046	4,61763	0,305567
	MRS1	0,575487	0,331186	4,28040	0,000127	39	3,46167	0,487754	2,14055	0,679002
	MRS2	0,213671	0,045655	1,34829	0,185547	40	5,44758	0,192273	5,11063	0,237450
	MRS3	0,526649	0,277359	3,66517	0,000812	37	2,32285	0,589760	3,73894	0,470291
Petri LAB 72h:	M17	0,188125	0,035391	1,11689	0,271872	36	5,57221	0,143548	5,01915	0,246544
	MRS1	0,552661	0,305434	4,08784	0,000217	40	3,61542	0,461639	2,28707	0,661630
	MRS2	0,241451	0,058299	1,55384	0,128302	41	5,28063	0,214486	4,90330	0,271806
	MRS3	0,546143	0,298272	3,91177	0,000390	38	2,22455	0,601326	3,60348	0,496024

Tabela 21 - Correlação entre contagens – queijos “pingo” (n = 7)

Comparação (x:y)		r(X,Y)	r²	t	P	N	Constant dep Y	Slope dep Y	Constant dep X	Slope dep X
Petri LAB 24h:	M17	0,415037	0,172255	0,91236	0,413191	6	2,27119	0,698338	4,77389	0,246665
	MRS1	0,484216	0,234465	1,10684	0,330442	6	2,82884	0,576354	3,78243	0,406808
	MRS2	0,307093	0,094306	0,72155	0,502893	7	4,70379	0,300289	4,58137	0,314052
	MRS3	0,773781	0,598736	2,44305	0,070974	6	-1,59341	1,253042	3,34718	0,477826
Petri LAB 48h:	M17	0,407482	0,166042	0,89241	0,422606	6	2,63884	0,600352	5,01075	0,276574
	MRS1	0,463120	0,214480	1,04507	0,354985	6	3,22039	0,482683	3,97618	0,444350
	MRS2	0,515932	0,266186	1,34674	0,235884	7	3,18656	0,497709	3,49443	0,534823
	MRS3	0,873140	0,762373	3,58233	0,023119	6	-2,04101	1,238083	2,89251	0,615769
Petri LAB 72h:	M17	0,429928	0,184838	0,95237	0,394841	6	2,36574	0,637882	4,94455	0,289769
	MRS1	0,483964	0,234221	1,10609	0,330732	6	3,03464	0,507958	3,88971	0,461103
	MRS2	0,530211	0,281123	1,39832	0,220877	7	3,05070	0,515329	3,44402	0,545523
	MRS3	0,886136	0,785236	3,82428	0,018709	6	-2,25805	1,265358	2,88457	0,620565

A baixa correlação entre os protocolos Petrifilm™ LAB e MRS2 pode estar associada à sua condição de anaerobiose. Aparentemente o sistema Petrifilm™ LAB não gera uma condição de anaerobiose semelhante a condição gerada pelo protocolo convencional (MRS2), podendo haver diferença nos micro-organismos presentes e na sua velocidade para formação de colônias visíveis. A baixa correlação entre as contagens obtidas em Petrifilm™ LAB e ágar M17 pode estar relacionada com a seletividade desse meio: como se trata de um alimento com um microbiota complexa e o ágar M17 é rico em nutrientes, o desenvolvimento de outros micro-organismos como Gram negativos e/ou catalase positiva é favorecido (FREITAS et al., 1995; POTES e MARINHO, 2007; POULLET et al., 1993; TORNADIJO et al., 1995). A baixa seletividade do ágar M17 foi evidenciada no item 4.1.3. desse trabalho e também pode ser observada na Tabela 22, onde os resultados apontam que apenas 67% das colônias isoladas do M17 foram identificados como BAL, após a caracterização bioquímica.

Mesmo havendo correlações estatisticamente significativas entre Petrifilm™ LAB nos diferentes tempos (24, 48 e 72h) com os protocolos MRS1 e MRS3, para todos os queijos e para aqueles produzidos com “*rala*”, foi verificado índices de correlação menores que 0,6. Esses resultados podem ser explicados e evidenciados na Tabela 22, que informa o número de colônias que foram confirmadas como BAL, de cada protocolo testado, após a caracterização bioquímica.

Potes e Marinho (2007) analisou colônias isoladas de queijos e verificou que 10% das colônias obtidas de MRS em aerobiose não eram BAL e 10,5% das colônias isoladas de MRS em anaerobiose também não era BAL. Acúrcio (2011) analisou a microbiota de leite cru de ovelha e verificou que 33% das colônias isoladas de ágar MRS e M17 eram atípicas para BAL. Pouillet et al. (1993) constataram que 8,9% dos isolados de queijo Casar de Caceres, incubados em ágar MRS, não apresentavam características bioquímicas típica de BAL. Castilho et al. (2015) analisou isolados de bacon obtidos de ágar MRS em aerobiose (30 °C/72h) e também encontrou micro-organismos que não apresentaram características de BAL, com resultados positivos para o teste de catalase.

De todos os protocolos analisados, independentemente do tipo que queijo, os isolados obtidos das placas de Petrifilm™ LAB foram os que mais se confirmaram após os testes bioquímicos; ou seja, a maior parte dos isolados que apresentaram morfologia típica foram confirmadas como BAL (Tabela 22). Em relação a todos os

queijos e aos queijos produzidos com “*rala*”, a porcentagem de confirmação de BAL foi estatisticamente maior que as demais. A não confirmação de 100% das colônias isoladas de Petrifilm™ LAB pode estar associada com a matriz láctea de queijos artesanais, que é muito complexa. Em outros alimentos com baixa diversidade de BAL, o comportamento da microbiota é mais padronizado, e o Petrifilm™ LAB mais efetivo, como relatado por Kanagawa et al. (2018), onde 100% das colônias analisadas obtidas do Petrifilm™ LAB foram identificadas como BAL.

Tabela 22 – Resultado da caracterização morfológica das colônias obtidas de queijos produzidos com “*pingo*”, com “*rala*” e total, das amostras semeadas nos diferentes protocolos de enumeração, confirmadas como BAL

Queijo	Método	n	BAL confirmada (%)
“ <i>pingo</i> ” (n = 7)	Petrifilm LAB	65	56 (86,2) a
	M17	55	38 (69,1) a
	MRS1	70	54 (77,1) a
	MRS2	69	54 (78,3) ab
	MRS3	70	55 (78,6) a
	Statistics		$\chi^2 = 5,13$, $df = 4$, $p = 0,275$
“ <i>rala</i> ” (n = 48)	Petrifilm LAB	402	331 (82,3) a
	M17	442	297 (67,2) b
	MRS1	471	342 (72,6) b
	MRS2	463	341 (73,7) b
	MRS3	462	333 (72,1) b
	Statistics		$\chi^2 = 25,74$, $df = 4$, $p < 0,001$
Total (n = 55)	Petrifilm LAB	467	387 (82,9) a
	M17	497	335 (67,4) b
	MRS1	541	396 (73,2) b
	MRS2	532	395 (74,2) b
	MRS3	532	388 (72,9) b
	Statistics		$\chi^2 = 30,84$, $df = 4$, $p < 0,001$

Obs.: frequências com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo procedimento de Marascuilo ($p < 0,05$)

A composição da microbiota do QMA do Serro caracterizada na Tabela 22, dos protocolos Petrifilm LAB e MRS1, foi confirmada pela identificação molecular de 384 isolados (Figura 6). Esses resultados são compatíveis com a composição esperada da microbiota de queijos artesanais, e confirmam ainda, a similaridade dos protocolos (MRS1 e Petrifilm LAB) empregados para enumeração de BAL, permitindo o isolamento dos mesmos gêneros para um estudo mais detalhado sobre a microbiota.

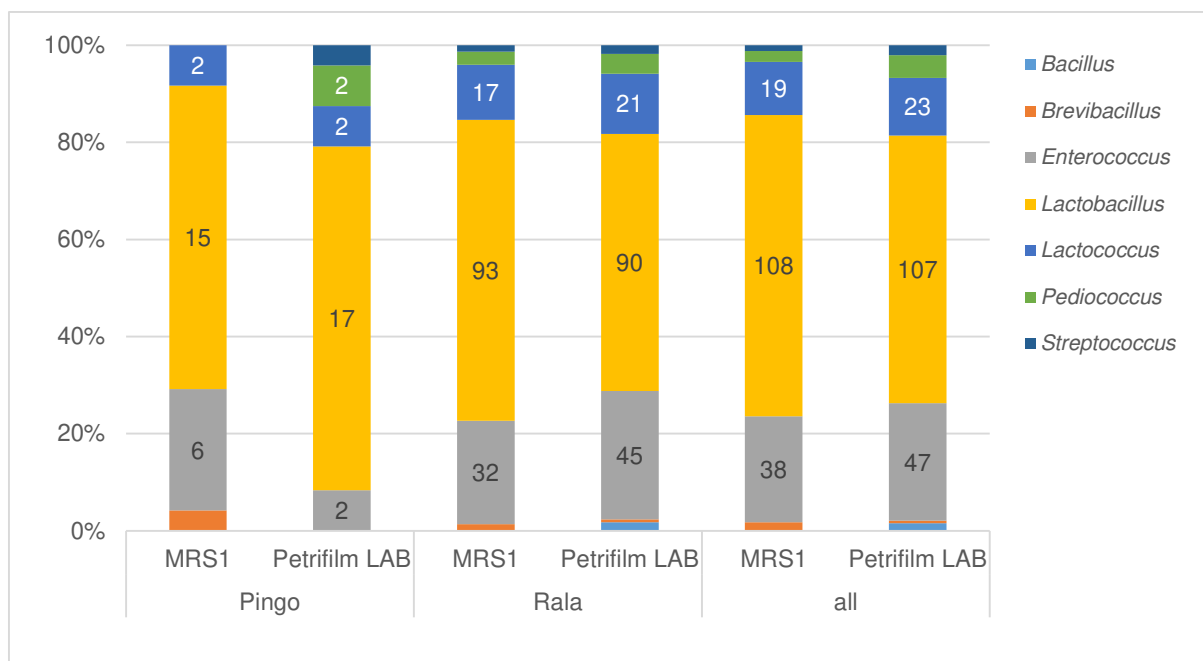


Figura 6 - Distribuição dos gêneros isolados de amostras de QMA do Serro e identificados por sequenciamento da região 16S rRNA

Foi possível observar similaridade entre os isolados de queijos produzidos com “rala” para os dois protocolos avaliados, bem como para todos os queijos (“rala” e “pingo”). O gênero BAL mais prevalente encontrado foi *Lactobacillus* sp., sendo identificado em 57% das amostras. Deste total, mais de 90% foram identificados com *Lb. plantarum*. *Enterococcus faecalis* foi a segunda espécie mais predominante (21,02%), sendo seguido por *L. lactis* (11,05%) e *Pediococcus acidilactici* (3,5%). A microbiota de queijos artesanais é muito complexa, variando de região para região, podendo variar até mesmo de um produtor para outro. Kamimura et al. (2019) analisaram queijos artesanais de diversas localidades do Brasil, identificaram *Streptococcus* como gênero mais dominante em QMA do Serro. Lima et al. (2009) analisaram a microbiota de QMA da Serra do Salitre, e identificaram *L. lactis*, *E. faecalis* e *S. agalactiae* como as espécies de BAL mais encontradas. Em queijo artesanal Serrano, os gêneros que mais prevaleceram foram *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (KAMIMURA et al., 2019). Perin et al. (2017) observaram que a microbiota predominante em QMA do Serro foi *Lactobacillus*, destacando-se a espécie *Lb. brevis*. Em contrapartida, o *Lactobacillus* que mais prevaleceu no queijo Canastra foi o *Lb. plantarum*, assim como no presente trabalho.

A diferença de microbiota em queijos artesanais não é só influenciada por fatores geográficos, mas também pelas BPF (MONTEL et al., 2014). Esses fatores

são de suma importância para manter um padrão de produção desses queijos, bem como garantir a saúde e segurança do consumidor.

5. CONCLUSÃO

O Petrifilm™ LAB apresentou bom desempenho e uma melhor seletividade para BAL quando comparado aos métodos tradicionais, sendo possível utilizá-lo para enumeração de BAL em QMA do Serro.

A microbiota do QMA do Serro interferiu nos protocolos utilizados para enumeração de BAL e *Staphylococcus*. Para BAL, os protocolos que apresentaram maiores desempenhos foram Petrifilm™ LAB e M17. Para *Staphylococcus*, os dois protocolos utilizados, Baird-Parker e Petrifilm™ STX, apresentaram comportamentos semelhantes e não foi encontrada diferenças significativas entre eles.

O tipo de fermento com que os queijos foram produzidos não afetaram a performance do Petrifilm™ LAB e após a identificação da região do 16S rRNA de amostras selecionadas, foi possível observar uma similaridade entre as BAL isoladas do protocolo Petrifilm™ LAB e MRS1, protocolo oficial para enumeração de BAL.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACÚRCIO, L. B. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido-láticas isoladas de leite de ovelha**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2011.

ALMEIDA FILHO, E. S., NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista Saúde Pública**, v. 34, p. 578-580, 2000.

ANDRETA, M., ALMEIDA, T. T., FERREIRA, L. R., CARVALHO, A. F., YAMATOGLI, R. S., NERO, L. A. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**. v. 102, p. 10790-10798, 2019.

APHA. American Public Health Association, **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3rd Ed. Washington, D.C. 1992.

APHA. American Public Health Association, **For the Examination of Dairy Products**. Ed. Robert T. Marshall. 17 Ed. Washington, D.C. 2001.

ARCURI, E. F., EL SHEIKHA, A. F., RYCHLIK, T., PIRO-MÉTAYER, I., MONTET, D. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. **Food Control**. v. 30, p.1–6. 2013.

BALCIUNAS, E. M., MARTINEZ, F. A. C., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D. G. M., CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. D. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control** v. 32, p. 134-142, 2013.

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.

BRAMLEY, A. J., MCKINNOM, C. H. **Dairy Microbiology: the microbiology of milk**. 2 ed. London/ Ney York: Elsevier Science Ltda, p. 163-207. 1990.

BRANT, L. M. F., FONSECA, L. M., SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996.

BRUNO, L. M., CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. **Embrapa Agroindustrial Tropical**, ISSN 1666-1915, 124. 30 p. Dezembro, 2009

CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology** v. 50, p. 131-149, 1999.

CASTILHO, N. P. A., OKAMURA, V. T., CAMARGO, A. C., PIERI, F. A., NERO, L. A. Adequacy of Petrifilm™ Aerobic Count plates supplemented with de Man, Rogosa & Sharpe broth and chlorophenol red for enumeration of lactic acid bacteria in salami. **Meat Science**, v. 110, p. 253-261, 2015.

CASTRO, R. D., OLIVEIRA, L. G., SANTANNA, F. M., LUIZ, L. M. P., SANDES, S. H. C., SILVA, C. I. F., SILVA, A. M., NUNES, A. C., PENNA, C. F. A. M., SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6086-6096, 2016.

CHAMPAGNE, C. P., TOMPKINS, T. A., BUCKLEY, N. D., GREEN-JOHNSON, J. M. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophiles* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. **Food Microbiology**, v. 27, p. 968-972, 2010.

CHATURVEDI, P., SHIVAJI, S. *Exiguobacterium indicum* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. **International Journal Systemic Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2765–2770. 2006.

CHERIF-ANTAR, A., MOUSSA-BOUDJEMÂA, B., DIDOUH, N., MEDJAHDI, K., MAYO, B., FLÓREZ, A. B. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 1, p. 27–38, 2016.

CHOI, J. Y., PARK, Y. S., KIM, C. O., YOON, H. J., SHIN, S. Y., KIM, Y. A., KIM, J. M. et al. Mortality risk factors of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. 599-603, 2005.

COGAN, T. M., BARBOSA, M., BEUVIER, E. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy Products. **Journal of Dairy Research**. v. 64, p. 409-421, 1997.

COLOMBO, M., OLIVEIRA, A. E. Z., CARVALHO, A. F., NERO, L. A. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. **Food Microbiology**, v. 39, p. 89-95, 2014.

CRAPART, S., FARDEAU, M. L., CAYOL, J. L. et al. *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 287–292. 2007.

CROW, V., CURRY, B., HAYES, M. The ecology of non starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjunct in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 275-283, 2001.

DARUKARADHYA, J., PHILLIPS, M., KAILASAPATHY, K., Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and nonstarter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. **International Dairy Journal** v. 16, p. 439–445. 2006.

DAVE, R. I., SHAH, N. P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 1529-1536. 1996.

DO VALE, R. C., RODRIGUES, M. P. J., MARTINS, J. M. Influência do tipo de fermento nas características físico-químicas de queijo Minas artesanal do Serro – Minas Gerais, maturado em condições controladas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73, n. 2, p. 82-90, 2018.

DONNELLY, C. W. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw milk: a review. **Bulletin of the International Dairy Federation**, p. 16-27, 2001.

DORES, M. T., FERREIRA, C. L. L. F. **Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios**. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v. 2, n. 2, p. 26-34, 2012.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Os melhores de 2018**. 2018. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=novosite_pagina_interna&id=22586 >. Acesso em: 29/08/2019

FARROKH, C., JORDAN, K., AUVRAY, F., GLASS, K., OPPEGAARD, H., RAYNAUD, S., THEVENOT, D., CONDRON, R., DE REU, K. Review of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**. v. 162, p.190-212, 2013.

FIGUEIREDO, S. P., BOARI, C. A., COSTA SOBRINHO, P. S., CHAVES, A. C. S. D., SILVA, R. B., CORREIO, H. B. F. S. Characteristics of raw milk and artisanal cheese produced in Serro, Minas Gerais State, Brazil, in different months. **Archives of Veterinary Science**. v. 20, p. 68-82, 2015.

FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese: An overview**. 3 ed. London: Elsevier Academic Press. v. 1, p. 1–18, 2004.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 144 p., 1996.

FRANZ, C. M. A. P., VAN BELKUM, M. J., HOLZAPFEL, W. H., ABRIQUEL, H., GALVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews** v. 31, p. 293-310, 2007.

FREITAS, A. C., PAIS, C. MALCATA, F. X. HOGGI, T. A. Microbiological Characterization of Picante da Beira Baixa Cheese. **Journal of Dairy Protection**. v. 59, p. 155-160, 1995.

FREITAS, R., LUIZ, L. M. P., ALVES, M. P., VALENCE-BERTEL, F., NERO, L. A., CARVALHO, A. F. Selective enumeration of propionibacteria in Emmental-type cheese using Petrifilm™ Aerobic Count plates added to Lithium Glycerol broth. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 270-275, 2013.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Editora Globo, 2ª edição, 297 p., 1991.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos Queijos Causas e Prevenção**. São Paulo: Setembro Editora, 3ª edição, 255 p., 2017.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, p. 33-36, 1980.

GALINARI, E., NÓBREGA, J. E., ANDRADE, N. J., FERREIRA, C. L. L. F. Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils user to make a Brazilian artisinal cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, p. 713-720, 2014.

GEVERS, D., HUYS, G., SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters** v. 205, p. 31-36, 2001.

GOMES, B. C., ESTEVES, C. T., PALAZZO, I. C. V., DARINI, A. L. C., FELIS, G. E., SECHI, L. A., FRANCO, B. D. G. M., MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**. v. 25, p. 668-675, 2008.

GONÇALVES, M. M., FREITAS, R., NERO, L. A., CARVALHO, A. F. Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm™ AC plates associated with acidified MRS and M17 broths. **Journal of Dairy Research**. v. 76, p. 229-233, 2009.

GOULET, V., JACQUET, C., MARTIN, P., VAILLANT, V., LAURENT, E., DE VALK, H. Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. **Euro surveillance**. v. 11, p. 79-81, 2006.

HANTSIS-ZACHAROV, E., HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7322, p. 7162-7168, 2007.

IG. Indicação Geográfica. **Serro**. 2015. Disponível em: <http://indicacao geografica.com.br/serro/>. Acesso em: 02/09/2019

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Regra de transição de Queijarias certificadas**. 2019. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/3904-regras-de-transicao-de-queijarias-certificadas>. Acesso em 03/09/2019.

INGHAM, S. C., BECKER, K. L., FANSLAU, M. A. Comparison of the Baird-Parker Agar and 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Methods for Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Naturally and Artificially Contaminated Foods. **Journal of Food Protection**. v. 66, p. 2151-2155, 2003.

ICMF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. **Certidão do Registro do modo artesanal de fazer queijo de Minas, nas regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre**. Data do Registro: 13 de jun. 2008. Brasília: Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2 p., 2008.

ISO, ISO 15214/1998 - International Organization and Standardization, **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony count technique at 30 degrees C**. ISO, Geneva, Switzerland. 1998.

ISO. ISO 6888-1/1999 - International Organization and Standardization, **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of Coagulase Positive *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* and Other species) – Technique Using Baird-Parker Agar Medium**, ISO, Geneva. Switzerland. 1999.

JAY, J. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7^a Ed. New York: Springer, p. 790, 2005.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B., DE PAULA, A. T., SILVA, L. F., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D., PENNA, A. L. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins** v. 6, p. 141– 156, 2014.

JORDANO, R., SERRANO, C. E., TORRES, M., SALMERON, J. Comparison of three M17 media for the enumeration of *Streptococcus thermophilus* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**. v. 55, p. 999-1000, 1992.

KAMIMURA, B.A., DE FILIPPIS, F., SANT'ANA, A.S., ERCOLINI, D., Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses, **Food Microbiology**. v. 80, p. 40-49, 2019.

KANAGAWA, S., OHSHIMA, C., TAKEHASHI, H., BURENQUIGE, KIKUCHI, M., SATO, F., NAKAMURA, A., MOHAMED, S. A., KUDA, T., KIMURA, B., Evaluation of Petrifilm Lactic Acid Bacteria Plates for Counting Lactic Acid Bacteria in Food. **Journal of Food Protection**, v. 81, p. 1030-1034, 2018.

KANG, D. H., FUNG, D. Y. C. Comparison of Kang-Fung medium and MRS medium for screening *Pediococcus* spp. from mixed culture systems. **Journal of Rapid Methods and Automation Microbiology**. v. 6, p. 77–83. 1998.

KLIJN, N., WEERKAMP, A. H., DEVOS, W. M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction amplified variable regions of 16S ribossomal-RNA and specific DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology** v. 57, p. 3390-3393, 1991.

LARPIN-LABORDE, S., IMRAN, M., BONAÏTI, C., BORA, N., GELSOMINO, R., GOERGES, S., IRLINGER, F., GOODFELLOW, M., WARD, A. C., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., SCHERER, S., GUÉGUEN, M., DESMASURES, N. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear ripened cheese. **Canadian Journal of Microbiology** v. 57, p. 651– 660, 2011.

LEANDRO, J. J. **Queijos – Uma introdução**. São Paulo: Editora: Biblioteca 24 horas, 3ª edição, 154 p., 2013.

LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1216–1225, 2007.

LIMA, C. D. L. C., LIMA, L. A., CERQUEIRA, M. M. O. P., FERREIRA, E. G., ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, p. 266-272. 2009.

LOGUERCIO, A. P., ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, p. 1063-1067, 2001.

LOPEZ-CORTES, A., SCHUMANN, P., PUKALL, R., STACKEBRANDT, E. *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov. isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 183–190, 2006.

LUBECK, G. M., LARA, J. A. F., BAGATINI, L. et al. Avaliação de algumas características físico-químicas e microbiológicas de algumas marcas de queijo tipo Colonial produzido no sudoeste do estado do Paraná. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, p. 185-193, 2001.

LUIZ, L. M. P., CASTRO, R. D., SANDES, S. H. C., SILVA, J. G., OLIVEIRA, L. G., SALES, G. A., NUNES, A. C., SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese, **CyTA - Journal of Food**. v. 15, p.125–128, 2017.

MACORI, G., COTTER, P. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. **Current Opinion in Biotechnology** v. 49, p. 172–178, 2018.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **O que é Indicação Geográfica (IG)?** 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/indicacao-geografica/o-que-e-indicacao-geografica-ig>. Acesso em: 02/09/2019.

MARCO, F., ALMELA, M., NOLLA-SALAS, J., COLL, P., GASSER, I., FERRER, M. D., de SIMON, M. In vitro activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains isolated in Barcelona, Spain. The Collaborative Study Group of Listeriosis of Barcelona. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 38, p. 259-261, 2000.

MARTINS, J. M., GALINARI, É., PIMENTEL-FILHO, N. J., RIBEIRO JR, J. I., FURTADO, M. M., FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 219-230, 2015.

MARTINS, M. C. F., FREITAS, R., MONIQUE, J. C. D., ELLER, M. R., NERO, L. A., CARVALHO, A. F. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, p. 295-300, 2018.

MASALAM, M. S. B., BAHIELDIN, A., ALHARBI, M. G., AL-MASAUDI, S., AL-JAOUNI, S. K., HARAKEH, S. M., AL-HINDI, R. R. Isolation Molecular Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria in Saudi Raw and Fermented Milk. **Hindawi**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

McGREGOR, J. U., TRAYLOR, S. M., GOUGH, R. H., HAZLETT, S., BIRD, K. Recovery of lactic acid bacteria on Petrifilm SM under various incubation atmospheres. **Journal of Food Protection**, v. 58, p.316–318, 1995.

MENESES, J. N. C. Queijo Artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil. **Dossiê interpretativo**, v. 1, Belo Horizonte: IPHAN, 2006.

MENEZES, S. S. M. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, p. 1-16. 2011.

MERGAREJO NETTO, M. **A Geografia do Queijo Minas Artesanal**. 1 ed. Belo Horizonte: Edição do Autor, 2014. v.1. 429p.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002. Identifica a **Aprova o regulamento da lei nº 14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2002.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa Do Estado De Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. **Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo de Minas artesanal**. Minas Gerais, Belo Horizonte, 2 ago. 2008.

MIRANDA, R. O., GAMA NETO, G., FREITAS R., CARVALHO, A. F., NERO, L. A. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial of *Streptococcus thermophiles*. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1509-1513, 2011.

MONTEL, M. C., BUCHIN, S., MALLET, A., DELBES-PAUS, C., VUITTON, D. A., DESMASURES, N., BERTHIER, F., Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal Food Microbiology**. v. 177, p. 136–154, 2014.

NERO, L. A., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., ORTOLANI, M. B. T., TAMANINI, R., FRANCO, B. D. G. M. Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and de ManRogosaSharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. v. 14, p. 249-257, 2006.

NERO, L. A., RODRIGUES, L. A., VIÇOSA, G. N., ORTOLANI, M. B. T. Performance of Petrifilm Aerobic Count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. v. 16, p. 132-139, 2008.

NÓBREGA, J. E., FERREIRA, C. L. F., DAS DORES, M. T., FERREIRA, E. M., DOMINGO, E. C., SANTOS, J. P. Seasonal differences in the endogenous starter culture used in the production of the Serra da Canastra cheese. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. v. 63, p. 26-30, 2008.

ORTOLANI, M. B. T., VIÇOSA, G. N., BELOTI, V., NERO, L. A. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 387–391, 2007.

PAL, M., KERORSA, G. B., MARIMI, L. M., KANDI, V. Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of *Staphylococcus Aureus*: A Comprehensive Review. **American Journal of Public Health Research**. v. 8, p.14-21, 2020.

PARADA, J. L., CARON, C. R., MEDEIROS, A. B. P., SOCCOL, C. R. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PAULA, J. C. J., CARVALHO, A. F., FURTADO, M. M. Basic principles of cheese production: from historical to salting. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 64, p. 19-25, 2009.

PEHRSON, M. E. S. F. **Efeito da adição de culturas probióticas sobre aspectos microbiológicos e parâmetros fermentativos de Queijo Artesanal das Terras Altas da Mantiqueira**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Lorena, SP. 2017.

PEREIRA, K. C., SÁ, O. R., PEREIRA, K. C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo Canastra e de sua matéria-prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). **Scientiae et Praxis**, v. 1, n. 2, p. 21-26, 2008.

PERIN, L. M., SARDARO, M. L. S., NERO, L. A., NEVIANI, E., GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**. v. 65, p. 160–169, 2017.

- PINTO, C. L. O., MACHADO, S.G., MARTINS, M. L., VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, p.105-116, 2015.
- PINTO, M. S., CARVALHO, A. F., PIRES, A. C. S., *et al.* The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International dairy Journal**. v. 21, p. 90-96, 2011.
- PINTO, M. S., FERREIRA, C. L. L. F., MARTINS, J. M., TEODORO, V. A. M., PIRES, A. C. S., FONTES, L. B. A., VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 39, p. 342-347, 2009.
- POTES, M. E., MARINHO, A. A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 102, p. 561-562, 2007.
- POULLET, B., HUERTAS, M., SANCHEZ, A., PILAR, C., LARRIBA G. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Caceres cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 60, p.123-127, 1993.
- RAATS, D., OFFEK, M., MINIZ, D., HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology**, v. 28, p. 465-471, 2011.
- RAFAEL, V. C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra** 2017. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2017.
- RASOFOLO, E. A., ST-GELAIS, D., LAPOINTE, G., ROY, D. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 138, p. 108-118, 2010.
- RESENDE, M. F. S., COSTA, H. H. S., ANDRADE, E. H. P., ACÚRCIO, L. B., DRUMMOND, A. F., CUNHA, A. F., NUNES, A. C., MOREIRA, J. L. S., PENNA, C. F. A. M., SOUZA, M. R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.
- SANT'ANNA, F. M., WETZELS, S. U., SANDES, S. H. C., FIGUEIREDO, R. C., SALES, G. A., FIGUEIREDO, N. C., CANTINI, Á. N., SCHMITZ, E. S., MANN, E., WAGNER, M., SOUZA, M. R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**. v. 82, p. 349-362, 2019.

SANTOS, A. S. **Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG. 2010.

SIBERNAGEL, K. M., JECHOREK, R. P., CARVER, C. N. 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. v. 86, p. 963-970, 2003.

SOUZA, L. M. J., COSTA, A. C., NERO, L. A., COUTO, E. P., FERREIRA, M. A. Evaluation of Petrifilm™ system compared with traditional methodology in count of indicators on sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk. **Food Science and Technology**. v. 35, p. 375-379, 2015.

TORNADIJO, M. E., FRESNO, J. M., BERNARDO, A., SARMIENTO, R. M., CARBALLO J. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goatls raw milk cheese (Armada variety). **Elsevier INRA**. v. 75, p. 551-570, 1995.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R., Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**. v. 5, p. 25-40, 1994.

VIÇOSA, G. N., MORAES, P. M., YAMAZI, A. K., NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. In raw milk fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**. v. 27, p. 447-452, 2010.

VINDEROLA, G., OUWEHAND, A., SALMINEN, WRIGHT, A. V. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Boca Ration: CRC Press, 5ª edição. 764p. 2019.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. v. 173, p. 697-703, 1991.

WELTHAGEN, J. J., VILJOEN, B. C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v. 16, p. 63-73, 1999.

YUNITA, D., DODD, C. E. R. Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. **Journal of Dairy Science**. v. 101, p. 1-13, 2018.

ZAFFARI, C. B., MELLO, J. F., COSTA, M. Qualidade Bacteriológica de Queijos Artesanais comercializados em Estradas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 37, p. 862-867, 2007.