

LÍVIA MARIA PINHEIRO LUIZ

**Identificação e agrupamento genético por MLST e PFGE de
isolados bacterianos obtidos de fazendas da região do
Campo das Vertentes, Minas Gerais**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L953i
2012

Luiz, Lívia Maria Pinheiro, 1983-
Identificação e agrupamento genético por MLST e PFGE
de isolados bacterianos obtidos de fazendas da região do
Campo das Vertentes, Minas Gerais / Lívia Maria Pinheiro
Luiz. – Viçosa, MG, 2012.
xiii, 93f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-91.

1. Biologia molecular. 2. Eletroforese de campo pulsado.
3. Microbiologia. 4. Biodiversidade. 5. Bactérias mesófilas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 576.163

LÍVIA MARIA PINHEIRO LUIZ

Identificação e agrupamento genético por MLST e PFGE de isolados bacterianos obtidos de fazendas da região do Campo das Vertentes, Minas Gerais

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de outubro de 2012.

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
(Coorientadora)

Emiliane Andrade Araújo
(Coorientadora)

Luís Augusto Nero

Luciana Rodrigues da Cunha

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

« Messieurs, c'est les microbes
qui auront le dernier mot »

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jacinto e Marli, pela dedicação e incentivo durante os meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pela bolsa de estudo, ao CNPq pela bolsa de estudo na França, e à Fapemig pelo financiamento da pesquisa.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela orientação, confiança, apoio e boas conversas.

Aos professores participantes da banca, pela atenção e receptividade ao convite.

À Professora Luciana, pelas ideias e sugestões.

Aos demais professores de Departamento de Tecnologia de Alimentos por permitirem o uso de seus laboratórios e materiais.

Às irmãs Patrícia e Marlize, pelas boas risadas nos fins de semana, pelo apoio e por acreditarem sempre em mim.

Aos amigos Natan e Pati, pela preciosa amizade e por estarem ao meu lado desde 2002.

Às amigas Vanessa e Laélia, pelas longas conversas, conselhos, viagens e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Leite, principalmente Maura e Rosângela, por todas as análises realizadas juntas, conversas, risadas e pausas para o “lanchinho”.

Ao Rafael, pela ajuda nas coletas das amostras e realização das análises no laboratório.

Aos amigos da Aliança Francesa, por todo aprendizado, troca de experiência e ótimos momentos juntos.

Ao Laurent, por ter me ensinado francês, pelas viagens e receptividade.

Ao laboratório STLO – Science et Technologie du Lait et de l’Oeuf, pela oportunidade de trabalho e por ter me acolhido tão gentilmente.

À todos os amigos que fiz no STLO, em especial Marc, Jorge, François, Marion e Yohann, por tornaram minha estadia no laboratório mais alegre e divertida.

À Florence e Marie No, pelas orientações e ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

À Victoria, por toda a paciência, por estar sempre disponível, por toda a ajuda e cumplicidade e grande amizade.

Aos moradores da República “Goutte Pendante”, Naaman, Federico, Mathilde e Sophie, minha 2ª família, pela ótima receptividade, companheirismo, pelas festas e viagens.

À Michele e Arlan, queridos companheiros, pela ajuda e cumplicidade, e por todos os momentos alegres que passamos juntos.

Aos amigos Heverson e Adrien, pela amizade verdadeira e pelas ótimas conversas e discussões.

À todos os amigos que fiz na Arca de Saint Antoine l’Abbaye, pelos momentos especiais que passei na comunidade e pelo aprendizado.

Ao Edgard, pela amizade incondicional e por poder confiar como a um irmão;

Ao Fabrício, pela agradável companhia e por me fazer rir nas horas difíceis.

À todos, que de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

BIOGRAFIA

LÍVIA MARIA PINHEIRO LUIZ, filha de Jacinto Luiz e Marli Pinheiro Luiz, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 23 de janeiro de 1983.

Em maio de 2002, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em outubro de 2006.

Em outubro do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, tendo defendido a dissertação em julho de 2008.

Em agosto de 2008 iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na mesma instituição, defendendo tese em outubro de 2012.

LISTA DE ABREVIACOES

AT: Allele Type

BAL: Bactéria do cido Ltico

BHI: Brain Heart Infusion

CIRM-BIA: Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'intérêt alimentaire

CLA: cido Linoleico Conjugado

FIL: Fédération Internationale du Lait

FISH: Fluorescent in Situ Hybridization

GRAS: Generally Recognized As Safe

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

MLST: Multilocus Sequence Typing

NCBI: National Center for Biotechnology Information

pb: par de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

ST: Sequence Type

TBE: Tris Borato EDTA

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

YEL: Yeast Extract Lactate

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Leite	4
2.2. Produção de leite em Minas Gerais	6
2.3. Microbiologia do leite cru	7
2.4. Bactérias Láticas	10
2.4.1. Genética de BAL	15
2.4.2. Identificação genômica de BAL	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Coleta das amostras e isolamento dos micro-organismos	28
3.1.1. Amostragem, e coleta das amostras	28
3.1.2. Análise das amostras	29
3.1.3. Isolamento e caracterização dos isolados	30
3.1.4. Análise da produção de ácido propiônico em caldo YEL por HPLC	30
3.2. Identificação molecular dos isolados e estudo da diversidade	31
3.2.1. Preparo das amostras	31
3.2.2. Extrato de DNA genômico total	31
3.2.3. Identificação dos isolados por técnica de PCR empregando-se <i>primers</i> universais	32
3.2.4. Sequenciamento do gene 16S rDNA	33
3.2.5. PCR espécie-específica	34
3.2.5.1. Cepas de referência utilizadas na PCR espécie-específica	35

3.2.6. PCR em tempo real.....	35
3.2.7. Pulsed Field Gel Electrophoresis.....	36
3.2.7.1. Enzimas de restrição.....	36
3.2.7.2. Preparo da cultura e dos blocos de agarose.....	36
3.2.7.3. Preparo do gel e condições de migração.....	37
3.2.7.4. Análise dos perfis eletroforéticos.....	37
3.2.8. Multilocus Sequence Typing.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Coleta das amostras, enumeração e isolamento dos micro-organismos.....	42
4.1.1. Bactérias propiônicas.....	42
4.1.2. Coletas das amostras e plaqueamento.....	42
4.1.3. Isolamento, caracterização e preparo dos isolados.....	43
4.1.4. Análise da produção de ácido propiônico em caldo YEL por HPLC.....	44
4.2. Identificação molecular dos isolados.....	44
4.2.1. PCR <i>primers</i> universais e sequenciamento do gene 16S rDNA.....	48
4.2.2. PCR espécie-específica.....	48
4.2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis.....	54
4.2.4. Multilocus Sequence Typing.....	62
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO 1. Perfil alélico de todos os ST conhecidos para os genes testados (dados de base para <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>).....	89
ANEXO 2. Soluções utilizadas para efetuar a extração do DNA genômico.....	90

RESUMO

LUIZ, Livia Maria Pinheiro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2012. **Identificação e agrupamento genético por MLST e PFGE de isolados bacterianos obtidos de fazendas da região do Campo das Vertentes, Minas Gerais.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadoras: Emiliane Andrade Araújo e Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto.

O Brasil é o 6º maior produtor de leite no mundo, sendo o estado de Minas Gerais o primeiro produtor de leite e queijos do país. O leite produzido nas diferentes regiões do Estado contém uma microbiota autóctone diversificada, e pode condicionar características sensoriais diversas aos produtos feitos a partir deste leite. O objetivo deste trabalho foi identificar uma parte da microbiota mesófila autóctone e agrupar geneticamente por meio das técnicas MLST e PFGE isolados obtidos de leite cru, solo e silagem de seis propriedades produtoras de leite na região do Campo das Vertentes no Estado de Minas Gerais. A partir de 200 isolados caracterizados inicialmente por coloração de Gram e teste da catalase, 50 foram identificados em nível de espécie por meio de técnicas genotípicas de PCR espécie-específica e sequenciamento do gene 16S rDNA. A diversidade clonal dos isolados pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* foi determinada por meio da técnica PFGE. A proximidade filogenética das cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi observada por meio da técnica MLST. Objetivou-se

também comparar o poder discriminatório das técnicas MLST e PFGE, utilizando as cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* como base de comparação. A caracterização molecular dos isolados levou a identificação de 4 gêneros de bactérias do ácido láctico: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus*, e também de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Entre os gêneros de BAL, *Lactococcus* e *Enterococcus* agruparam a maior parte das espécies encontradas. *L. lactis* foi a espécie mais frequente nas diferentes amostras, sendo isoladas principalmente do leite cru. A diversidade clonal dos isolados pertencentes ao gênero *Lactococcus* mostrou uma importante variabilidade, visto que os 10 isolados *L. lactis* subsp. *lactis* foram agrupadas em 4 diferentes grupos. Já para os isolados de *Enterococcus*, não foi observada variabilidade. Os isolados, oriundos de diferentes propriedades, foram concentradas em um mesmo grupo, indicando que estas cepas autóctones são dominantes da região. A técnica MLST nos permitiu caracterizar e observar as relações filogenéticas entre as cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* agrupando-as em diferentes ST. Por meio desta técnica, pode-se identificar e associar os diferentes ST com características tecnológica industriais, para aplicação destas cepas como culturas *starters*.

ABSTRACT

LUIZ, Lívia Maria Pinheiro, D.S., Universidade Federal de Viçosa, october 2012. **Identification and genetic clustering by MLST and PFGE of bacterial isolates from farms in the Campo das Vertentes Region, Minas Gerais.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Emiliane Andrade Araújo and Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto.

Brazil is the sixth largest milk producer in the world and the State of Minas Gerais is the largest milk and cheese producer of the country. The milk from different regions of the State contains a diverse endogenous microbiota, and it can provide different sensorial characteristics of products made from this milk. The aim of this work was to identify part of the autochthonous mesophilic microbiota isolated from raw milk, soil and silage from six milk producer farms in the Campo das Vertentes region in Minas Gerais State and to group the bacteria genetically. From 200 isolates initially characterized by Gram staining and catalase test, 50 were identified to the species level by genotypic techniques using species-specific PCR and sequencing of 16S rDNA. The clonal diversity of isolates belonging to the genera *Lactococcus* and *Enterococcus* were determined by PFGE technique. The phylogenetic relatedness of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* was observed by MLST technique. In addition, we compared the discriminatory power of MLST and PFGE techniques, using strains of *L. lactis* subsp. *lactis* as a basis for comparison. The molecular characterization of the isolates led to identification

of four genera of lactic acid bacteria: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* and *Lactococcus*, and also species belonging to the genus *Staphylococcus*. Among the LAB genera, *Lactococcus* and *Enterococcus* grouped most of the isolates found; isolates of *L. lactis* were present in a large number of samples, mainly from raw milk. The clonal diversity of isolates belonging to the genus *Lactococcus* showed a significant variability, since 10 *L. lactis* subsp. *lactis* strains were grouped into four different groups. For the *Enterococcus* isolates, we did not observe any variability. Isolates from different properties, were concentrated in the same group, indicating that these endogenous strains are dominant in the region. The MLST technique allowed us to observe and characterize the phylogenetic relationships among *L. lactis* subsp. *lactis* strains grouping them into different ST. By this technique, one can associate the different ST with industrial-technological characteristics, enabling the application of these strains as starter cultures.

1. INTRODUÇÃO

Com uma produção total de 31,4 bilhões de litros de leite em 2010 (FIL, 2011), o Brasil ocupa a 6ª posição no *ranking* mundial. O estado de Minas Gerais é o primeiro produtor de leite e queijos do país. A microbiota endógena do leite cru tem um papel importante no sabor característico desses queijos, e constitui um reservatório de biodiversidade natural potencialmente valorizável.

As bactérias lácticas, autóctones em produtos lácteos fermentados, são encontradas naturalmente nesses ecossistemas, contribuindo para a sua diversificação. Estes micro-organismos participam de forma importante na elaboração de derivados de leite e são os constituintes principais de fermentos lácteos, sejam eles industriais ou artesanais.

O estado de Minas Gerais destaca-se na produção de leite e apresenta regiões tradicionais de produção de queijos. Estes queijos são produzidos utilizando como cultura *starter* os micro-organismos presente naturalmente no leite cru, o que caracteriza o produto conforme a região do estado onde é produzido.

A maior parte dos trabalhos sobre caracterização da biodiversidade dos ecossistemas destas regiões utilizaram métodos fenotípicos e bioquímicos para a identificação das isolados bacterianas provenientes de amostras como leite cru, queijos e ambientes de fazenda. Estes métodos oferecem uma ideia da microbiota presente nos diferentes ecossistemas,

mas não permitem, em geral, conhecer a biodiversidade e distinguir linhagens de uma mesma espécie. Estudos mostraram que a sistemática bacteriana não se limita aos métodos bioquímicos e fenotípicos. Para o estudo da biodiversidade e compreensão das relações filogenéticas entre os organismos, a análise genotípica é particularmente útil, devido ao estudo das informações contidas no DNA.

Métodos genotípicos têm sido utilizados com sucesso para identificação e caracterização das comunidades bacterianas em diferentes ecossistemas. Técnicas moleculares permitem uma melhor diferenciação de micro-organismos em diferentes níveis; de gênero, espécie e até mesmo de cepas, em função dos métodos utilizados. Assim, estes métodos são promissores para uma rápida e acurada identificação microbiana, além de possuírem a vantagem de reprodutibilidade.

Neste trabalho, técnicas como PCR espécie-específica, sequenciamento do gene 16S rDNA, PFGE e MLST foram utilizados para o estudo da comunidade bacteriana em diferentes níveis (espécie, subespécie e perfis genéticos), para o conhecimento da biodiversidade no ambiente de fazendas na região do Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais.

OBJETIVO GERAL

Identificar uma parte da microbiota mesófila autóctone e agrupar geneticamente por meio da MLST e PFGE isolados obtidos de leite cru, solo e silagem de seis propriedades produtoras de leite na região do Campo das Vertentes no Estado de Minas Gerais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar bactérias pertencentes ao gênero *Propionibacterium* de diferentes ecossistemas em propriedades produtoras de leite na região do Campo das Vertentes;
2. Caracterizar e identificar a coleção de culturas obtida do isolamento;
3. Identificar os isolados em nível de espécie por meio de técnicas genotípicas de PCR espécie-específica e sequenciamento de parte do gene 16S rDNA;
4. Determinar a diversidade clonal de cepas pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* por meio da técnica PFGE;
5. Estudar a proximidade filogenética de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* por meio da técnica MLST;
6. Comparar o poder discriminatório das técnicas moleculares MLST e PFGE, utilizando cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite

Entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 2011).

O leite de alguns animais, especialmente vacas; mas também de búfalas, cabras, ovelhas e camela é usado para o consumo humano, seja na forma de leite fluido ou de seus derivados. É um alimento nutritivo, indispensável para o recém-nascido e fundamental em muitas dietas. O consumo de produtos lácteos é associado com uma alimentação de alta qualidade (Steins, 2008).

A tradição do consumo de leite e produtos lácteos na nutrição humana é milenar. Este consumo varia consideravelmente entre as diferentes regiões do planeta, podendo chegar a 180 Kg de leite anual per capita na Finlândia e menos que 60 Kg em países como Brasil e Japão (FIL, 2011). Os lipídeos do leite têm sido associados ao aumento da concentração de colesterol no sangue devido ao alto conteúdo de ácidos graxos saturados (Haug et al., 2007). Alguns cientistas supõem que a presença de ácido linoléico conjugado (CLA) nos lipídeos do leite pode ajudar na redução do risco de câncer (Lee et al., 2005). Este ácido graxo é proveniente da fermentação do

rumem, dessa forma a quantidade de CLA nos lipídeos do leite varia com a alimentação. Efeitos benéficos que outros ácidos graxos proporcionam são estudados. Ácido butírico pode também ter um papel importante na redução do risco de câncer (Entin-Meer et al., 2005). Ácidos caprílico e cáprico podem ter atividades antivirais (Skrivanová, et al., 2010). E o ácido láurico pode apresentar funções antiviral e antibacteriana (Lieberman et al., 2007).

O leite é sintetizado por controle hormonal nas glândulas mamárias a partir de constituintes presentes no sangue. Desta forma, alterações que afetem o estado fisiológico do animal, como estresse e mastite, irão alterar a composição do leite. Essa composição também varia com o estágio de lactação, idade, raça, nutrição e estado de saúde do úbere. A composição aproximada dos constituintes do leite de vaca é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição aproximada do leite de vaca

Componente	Conteúdo médio no leite (%)
Água	87,0
Lactose	4,7
Lipídeos	4,0
Proteínas	3,5
Cinzas	0,8

Fonte: Walstra, 2006

O leite é um alimento acessível, rico em uma grande variedade de nutrientes importantes na alimentação humana como minerais, vitaminas e proteínas facilmente digeríveis com um perfil balanceado de aminoácidos (Steins, 2008). A importância do leite, sob o ponto de vista nutricional, deve-se a qualidade destas proteínas, ao elevado teor de cálcio, fósforo, magnésio e às vitaminas A, riboflavina e niacina (Walstra, 2006). O leite também contém ácidos graxos insaturados conhecidos por terem um efeito positivo na saúde, especialmente o ácido linoleico conjugado e o ácido graxo ômega 3 (Butler et al., 2011; Haug et al., 2007).

O leite e seus derivados são utilizados como carreadores de diferentes ingredientes benéficos para o homem. Alimentos funcionais, como o queijo tipo cottage simbiótico desenvolvido por Araújo et al. (2010), o

iogurte probiótico e rico em fibras desenvolvido por Santo et al. (2011), e o leite enriquecido com ácidos graxos saudáveis (Fonollá et al., 2009) são alguns exemplos de como os produtos lácteos têm sido utilizados como uma rica fonte para o carregamento de grande variedade de ingredientes que promovem a saúde.

A microbiota do leite cru é responsável pelas características sensoriais de queijos feitos a partir deste leite, além de contribuir para a biopreservação. Assim, a diversidade microbiana do leite cru está diretamente ligada à qualidade dos produtos lácteos, mas é também uma fonte atrativa de novas culturas *starters* (Mallet et al., 2012).

A qualidade do leite, determinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foi recentemente modificada pela publicação da Instrução Normativa n. 62 de 2011. Esta Normativa fixa a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite cru refrigerado nas propriedades rurais, sua coleta e seu transporte refrigerado (Brasil, 2011).

2.2. Produção de leite em Minas Gerais

Em 2004 o Brasil assumiu uma importante posição de exportador de leite e derivados no cenário mundial. O país, 6º produtor mundial de leite, assume um papel respeitável entre os principais países produtores de leite.

O sudeste brasileiro é a região com a maior produção nacional de leite, sendo o estado de Minas Gerais o principal produtor, com um volume de 8,4 bilhões de litros no ano de 2010.

O avanço da cadeia produtiva do leite do Estado de Minas Gerais conta com diferentes programas de melhoria da qualidade, como o Educampo do SEBRAE, Balde Cheio do SENAR e Minas leite da EMATER. O Minas Leite, um Programa Estadual da Cadeia Produtiva do Leite, conta com o apoio do governo do Estado e informa que a produção de leite em Minas Gerais aumentou no ano de 2012, graças a adesão de produtores de agricultura familiar ao programa (Secretaria da Agricultura MG, 2012).

Minas Gerais é tradicionalmente conhecido por sua grande produção leiteira e famoso pelos produtos artesanais produzidos nas diversas regiões do estado. A Portaria n. 1022 de 2009 reconheceu a região do Campo das

Vertentes como produtora de queijo Minas artesanal (Brasil, 2009). No total, são 5 regiões tradicionais: Cerrado, Araxá, Canastra, Serro e Campo das Vertentes. A tecnologia de fabricação destes queijos é semelhante, porém as características sensoriais de cada queijo diferem entre as regiões (Dores, 2007).

2.3. Microbiologia do leite cru

O conhecimento da microbiota bacteriana presente no leite cru é de crucial importância para os produtores de leite e para a indústria que irá transformá-lo em seus diferentes derivados. O pagamento por qualidade pelas indústrias de laticínios ocorre em algumas regiões, e quanto menor o número de micro-organismos, maior será o valor pago por este leite. O número máximo de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos no leite cru deve ser de $6,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, de acordo com a Instrução Normativa 62/2011 (Brasil, 2011). Porém, devido aos programas de qualidade das empresas, a contagem microbiana deve ser a menor possível (Paiva et al., 2012).

A produção de leite de boa qualidade é um desafio que pode ser alcançado desde que algumas medidas sejam tomadas; começando pela obtenção do leite cru até a chegada a planta de processamento. A qualidade deve ser priorizada, onde práticas de higiene, bom manejo nutricional, controle sanitário e resfriamento do leite nas propriedades e no transporte sejam sempre observadas e padronizadas pelos produtores (Cerqueira et al., 1999).

O leite é uma fonte rica de nutrientes, e por apresentar um valor de pH próximo da neutralidade, permite a multiplicação de diferentes espécies de micro-organismos. A microbiota presente no leite cru pode variar muito e abranger diversos gêneros. Estes micro-organismos são primariamente bactérias, mas fungos filamentosos e leveduras podem se multiplicar igualmente no leite (Walstra, 2006).

Essa ampla biodiversidade de micro-organismos presente no leite cru pode conter micro-organismos que incluem bactérias de interesse alimentar e tecnológico, como as bactérias ácido lácticas, que contribuem para reações

fermentativas desejáveis; ou bactérias propiônicas, por seu papel na formação de olhaduras durante a maturação de queijos. Entretanto, a presença de bactérias deterioradoras pode ter efeito negativo na qualidade do leite e de seus derivados, enquanto que a presença de patógenos pode causar sérios danos ao homem (Quigley et al., 2011). Geralmente, leite cru proveniente de uma vaca sadia contém uma baixa carga microbiana (menos de 500 UFC.ml⁻¹), mas esta carga pode aumentar 100 vezes ou mais quando o leite permanece à temperatura ambiente (Robinson, 2002).

A temperatura de armazenamento do leite logo após a ordenha é um dos principais fatores que determinam a sua qualidade microbiológica. A refrigeração minimiza o problema de multiplicação de micro-organismos mesófilos, que são responsáveis pela acidificação do leite por meio da fermentação (Nornberg et al., 2009). Porém, o armazenamento sob refrigeração por períodos prolongados favorece a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos, os quais podem produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que provocam a deterioração de produtos lácteos processados (Arcuri et al., 2008; Pinto et al., 2006). Embora represente menos de 10 % da microbiota inicial em condições sanitárias adequadas, a população de micro-organismos psicrotróficos no leite cru pode alcançar altas concentrações em condições precárias de higiene (Cousin, 1982).

Na Tabela 2 apresenta-se alguns exemplos dos principais gêneros de bactérias associadas ao leite cru.

Tabela 2: Alguns gêneros de bactérias possivelmente associados com leite

Gênero	Morfologia	Gram	Requerimento de oxigênio
<i>Micrococcus</i>	Cocos	+	Aeróbio
<i>Staphylococcus</i>	Aglomerado de cocos	+	Aeróbio
<i>Lactococcus</i>	Diplococos	+	Aerotolerante
<i>Streptococcus</i>	Cadeia de cocos	+	Aerotolerante
<i>Lactobacillus</i>	Bastonete	+	Aerotolerante
<i>Bacillus</i>	Bastonete, esporos	+	Aeróbio
<i>Clostridium</i>	Bastonete, esporos	+	Anaeróbio
<i>Escherichia</i>	Bastonete	-	Aeróbio facultativo
<i>Salmonela</i>	Bastonete	-	Aeróbio facultativo
<i>Pseudomonas</i>	Bastonete	-	Aeróbio

Fonte: adaptado de Walstra, 2006

Os isolados de LAB mais frequentemente encontrados no leite cru pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (Franciosi et al., 2009). *Lactococcus lactis* é a espécie mais comum de BAL encontrada em leite e também a principal espécie de muitas culturas *starters*; industrial ou artesanal (Pogacic et al., 2011). Esse é um dos principais motivos para o crescente estudo de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* para o uso em novas culturas *starters*.

O ambiente de fazendas produtoras de leite é um centro de interesse na tecnologia de produção de queijo, pois ele pode influenciar as comunidades microbianas no leite. A microbiota presente naturalmente no leite cru tem um papel importante na diversidade do *flavor* dos queijos e ela pode, além disso, ter um efeito protetor contra micro-organismos patogênicos, devido a produção de ácidos orgânicos (Vacheyrou et al., 2011).

O estado de Minas Gerais possui diferentes regiões onde o leite cru é utilizado para a fabricação artesanal de queijos. Os produtores destas regiões utilizam a microbiota autóctone presente no leite, sem adição fermento industrializado. Com esta prática, uma grande biodiversidade de

micro-organismos é inserida ao produto, conferindo aos queijos características sensoriais próprias de cada região (Barbosa e Olímpio, 2004).

2.4. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas são bacilos e cocos gram positivos que sintetizam ácido láctico como principal ou único produto da fermentação. São células procariotas, heterotróficas e quimio-organotróficas. Todas as bactérias lácticas multiplicam-se anaerobiamente, mas a maior parte delas não é sensível ao O₂, sendo denominadas microaerófilas ou anaeróbias aerotolerantes. São imóveis, não esporuladas, não produzem catalase e apresentam exigências nutricionais numerosas para se multiplicarem como aminoácidos, peptídeos, sais, ácidos graxos e carboidratos (Holzapfel et al., 2001).

As bactérias lácticas são muito difundidas na natureza e capazes de multiplicar-se em diferentes condições ambientais. Como estes micro-organismos são fastidiosos, eles estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como leite, vegetais, carne, frutas e bebidas. Alguns deles também fazem parte da microbiota do intestino de humanos e animais (Dalié et al., 2010). Algumas espécies de BAL fazem parte da microbiota benéfica do intestino e são utilizadas como probióticos por meio da ingestão de alimentos que contenham essas cepas. *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* e *Enterococcus faecium* são algumas das espécies probióticas predominantes no mercado (Ferreira, 2012). A indústria de laticínios é a que apresenta maior disponibilidade de alimentos probióticos, em especial nos iogurtes e em outros leites fermentados.

Uma importante diferença entre os subgrupos de BAL está relacionada à natureza dos produtos formados a partir da fermentação dos carboidratos (Madigan et al., 2010). No primeiro grupo, denominado homofermentativo, é gerado quase exclusivamente um único produto da fermentação da lactose – o ácido láctico. O segundo grupo, denominado heterofermentativo, gera a partir da fermentação da lactose além do lactato, etanol e CO₂ (Roissart e Luquet, 1994).

Os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* são reconhecidos como BAL (Sneath et al., 1986). A organização celular, o tipo de fermentação e a porcentagem GC DNA dos cinco principais gêneros de bactérias lácticas empregados na indústria de leite e derivados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Características dos cinco principais gêneros de bactéria do ácido láctico

Gênero	Organização Celular	Fermentação	% GC DNA
<i>Streptococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Cocos em cadeias	Heterofermentativo	38-41
<i>Pediococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos geralmente em cadeias	Homofermentativo	32-53
	Bacilos geralmente em cadeias	Heterofermentativo	34-53
<i>Lactococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo	38-41

Fonte: Bergey's Manual, 1986.

A utilização de bactérias lácticas pelo homem data de tempos remotos, e ainda hoje é utilizada em uma das tecnologias mais antigas para a conservação dos alimentos: a fermentação. A fermentação por BAL, um dos grupos de micro-organismos de maior importância na microbiologia de alimentos, é utilizada para manter a qualidade de diferentes produtos fermentados, além de trazer benefícios para o homem (Ross et al., 2002).

A produção de produtos fermentados em grande escala industrial depende da utilização de culturas *starters* selecionadas, o que conduziu a uma baixa variabilidade na microbiota dos produtos lácteos. Entretanto, alguns produtos lácteos tradicionais ainda contam com fermentações lácticas espontâneas ou com culturas *starters* não selecionadas, o que resulta em uma grande variedade de produtos com diferentes *flavors*, consistência e qualidade microbiológica. Estes produtos têm sido apontados como fontes de novas e interessantes cepas para o uso na fermentação do leite (Marino et al., 2003).

Além de serem empregadas na produção de alimentos fermentados como culturas iniciadoras ou *starter*, BAL são também utilizadas para outros propósitos. Pesquisas indicam que BAL tem efeitos benéficos na saúde humana. Elas produzem alguns compostos antagonistas capazes de controlar a multiplicação de bactérias patogênicas e a microbiota deterioradora indesejável (Dalié et al., 2010). Ácido láctico e outros produtos do metabolismo como peróxido de hidrogênio, diacetil, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas agem como bioconservantes e inibem microorganismos patogênicos e deterioradores (Deegan et al., 2006). Diferentes cepas de *Lactobacillus* (Jatobá et al., 2008), de *Streptococcus* e de *Enterococcus* (Nes et al., 2011) são utilizadas como probióticos e biopreservativos na produção de muitos alimentos (Dworkin et al., 2006).

De acordo com Magnusson et al. (2003), três mecanismos podem explicar a eficiência antimicrobiana de BAL: a produção de ácido orgânico, a competição por nutrientes e a produção de compostos antagonistas.

Inúmeras cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lb. plantarum* são capazes de sintetizar peptídeos ou proteínas antimicrobianas conhecidas como bacteriocinas, cuja atividade é estreitamente direcionada contra bactérias taxonomicamente relacionadas (Dalié et al., 2010).

As bactérias lácticas são bastante utilizadas na forma de fermentos artesanais, mas com o desenvolvimento das indústrias de alimentos, em especial a indústria leiteira, a produção de fermentos industriais capazes de garantir a qualidade e a padronização do produto tornou-se necessária (Pfeiler e Klaenhammer, 2007). A busca pela presença, número e tipo de BAL são de grande importância para a indústria. Três principais aplicações são indispensáveis: (i) identificação da microbiota bacteriana das culturas *starters* e de queijos, (ii) determinação do número total de BAL em produtos lácteos, (iii) detecção de cepas e/ou biótipos em produtos lácteos (Giraffa e Rossetti, 2004).

Lactococcus spp. é o principal gênero de bactérias mesofílicas usado na produção de produtos lácteos fermentados. Embora cinco espécies sejam reconhecidas, somente *L. lactis* é de importância tecnológica (Axelsson, 2004). Esta espécie inclui três subespécies. *L. lactis* subsp. *lactis* (inclui a

biovar *diacetylactis*), encontrada em vários ambientes incluindo animais, produtos lácteos e plantas e *L. lactis* subsp. *cremoris*, apenas isolada de leite cru e produtos lácteos, com algumas exceções (Nomura et al., 2006). A subespécie *L. lactis* subsp. *hordniae* não tem sido encontrada em produtos lácteos (Schleifer et al., 1985).

Cepas de lactococos têm sido usadas por séculos como *starters* para produção de queijos fermentados e outros produtos lácteos (Delgado e Mayo, 2004), além do uso na agricultura e na medicina veterinária (Pu et al., 2002).

Muito tem sido falado sobre a necessidade de novas ou aperfeiçoadas cepas para substituir e complementar culturas *starters* frequentemente utilizadas na fermentação industrial (Robinson, 2002). Por isso, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de rastrear novas linhagens de culturas *starters*. Em um estudo realizado por Nomura et al. (2006), os autores sugerem o isolamento de cepas de *L. lactis* de plantas, para o uso em fermentação de produtos lácteos. As cepas isoladas de vegetais fermentados apresentaram habilidade para fermentar diversos carboidratos e uma maior tolerância ao estresse que as cepas isoladas de derivados de leite.

Enterococos pertencem ao grupo de BAL e têm uma importância ambígua para os alimentos, com ambos os aspectos benéficos e deteriorantes (Tulini et al., 2011). Eles podem aumentar a vida de prateleira pela produção de antimicrobianos, sintetizar compostos aromáticos e contribuir para a promoção da saúde como culturas probióticas (Franz et al., 2003). Por outro lado, propriedades indesejáveis de enterococos têm sido reportadas, como indicação de contaminação, presença de fatores de virulência e genes de resistência a antibióticos (Aslam et al., 2012; Jamet et al., 2012). Em alguns países do sul da Europa, enterococos são usados como culturas *starters* para queijos (Gomes et al., 2010). Entre as culturas probióticas e protetoras, *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais utilizadas (Cebrián et al., 2012). No entanto, pesquisas estão sendo feitas com o objetivo de selecionar novas cepas ou espécies de *Enterococcus* para a produção de queijos tradicionais em países do Mediterrâneo (Fortina et al., 2008).

O gênero *Lactobacillus* consiste de um grupo genética e filogeneticamente diverso de BAL (Marth e Steele, 2001). O gênero pode ser dividido em três grupos baseados no produto final da fermentação (I): formado apenas de lactobacilos homofermentativos estritos; (II): formado por lactobacilos heterofermentativos facultativos; e (III): formado por lactobacilos heterofermentativos estritos. (Roissart e Luquet, 1994). Espécies de cada grupo podem ser encontradas como culturas *starters* em vários produtos lácteos, como iogurte, diversos tipos de queijos, kefir e leite acidófilo (Minervini et al., 2012; Gulitz et al., 2011; Ng et al., 2010). Eles se multiplicam lentamente no leite, por isso são geralmente usados em combinação com *Streptococcus thermophilus* (Marth e Steele, 2001).

As espécies deste gênero estão amplamente distribuídas na natureza, principalmente no trato gastrointestinal, boca, vagina e estômago de homens e animais (Wall et al., 2007), assim como em plantas, material orgânico e alimentos fermentados (Bernardeau et al., 2006).

Os lactobacilos são os micro-organismos mais ácido tolerantes entre as BAL, iniciando a multiplicação em pH ácido (5,5-6,2) e reduzindo o pH do leite para abaixo de 4,0. São reconhecidos como seguro, devido a sua longa história de uso em alimentos fermentados e sua presença na microbiota intestinal de humanos (Gil-Campos et al., 2012).

Outro gênero de BAL de importância para a indústria de alimentos é *Leuconostoc*. São as únicas bactérias em forma de coco com metabolismo heterofermentativo. Elas produzem, a partir de hexoses, CO₂, ácido acético e ácido lático (Roissart e Luquet, 1994).

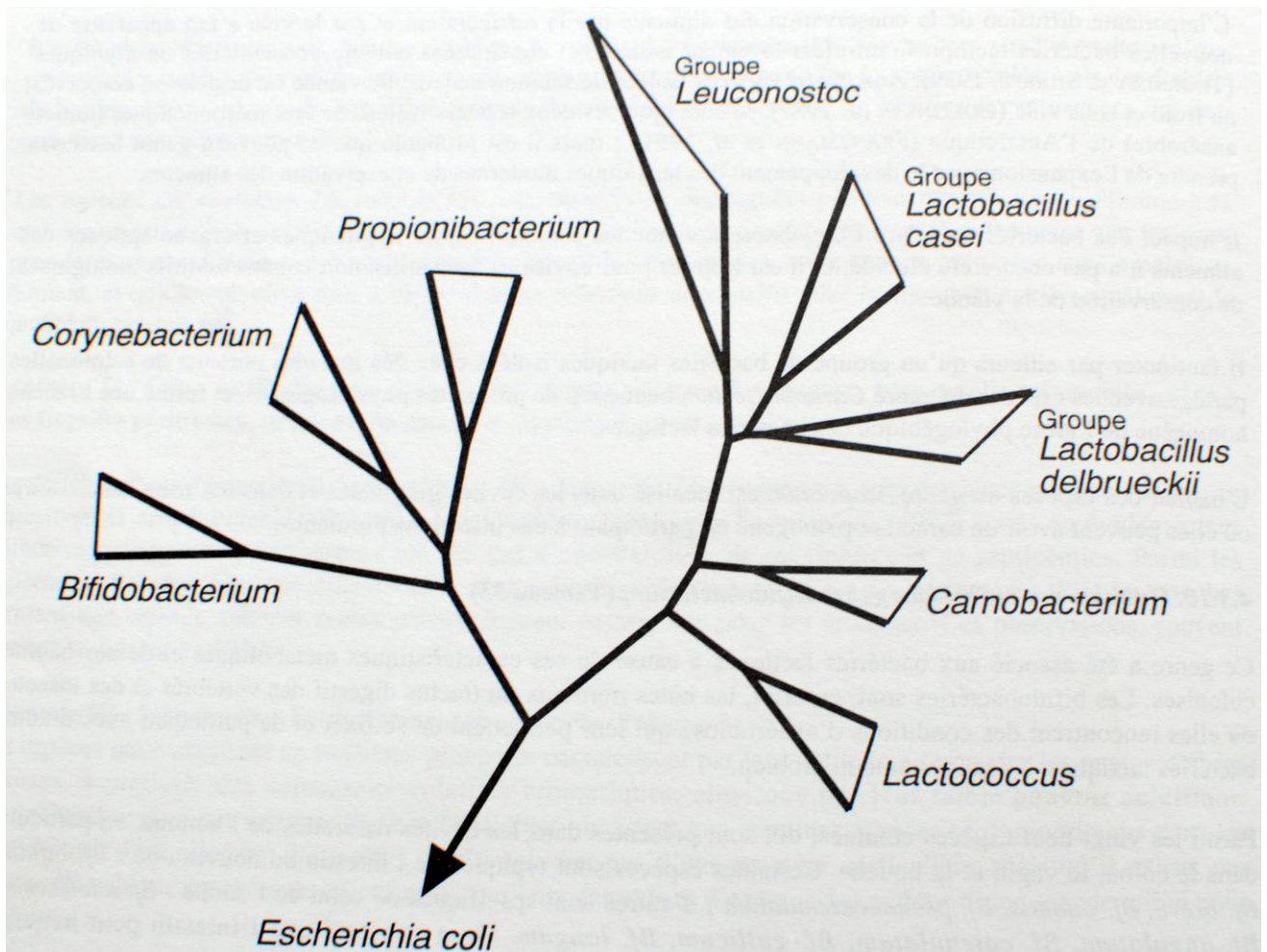
Leuconostoc spp. são organismos ambientais geralmente encontrados em plantas. Deste habitat natural eles se disseminaram para vários nichos, incluindo leite cru ou produtos alimentares refrigerados (Dicks et al., 1993). Estas espécies têm um papel importante em muitos processos de fermentação de alimentos, como fermentação de salsichas, vegetais e cereais. Em produtos lácteos, cepas de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* e *L. lactis* estão associadas com cultura láctica *starter* na produção de queijos (Ogier et al., 2008). Elas são mais tolerantes ao ácido que os *Lactococcus* e possuem sistema enzimático para fermentar o citrato (Axelsson, 2004).

Espécies de *Leuconostoc* estão muitas vezes presentes em culturas lácteas *starters* e também no ambiente de laticínios; assim poderiam ser consideradas bactérias do ácido láctico não *starters* (NSLAB), da mesma forma que os lactobacilos mesófilos. Esse papel de formação de aroma e textura em certos produtos lácteos torna essas bactérias essenciais para a indústria de laticínios.

2.4.1. Genética de BAL

A taxonomia de BAL é uma área ativa de pesquisa, que tem sido aperfeiçoada nos últimos anos. Novas espécies foram anexadas, de acordo com a definição filogenética e fisiológica de bactérias ácido lácticas (Marth e Steele, 2001).

As relações filogenéticas dos diferentes gêneros de BAL são apresentadas na Figura 1. A análise comparativa das sequências dos genes 16S rRNA e 23S rRNA mostraram que as bactérias Gram positivas se separam em duas linhas de acordo com o conteúdo G+C. Uma linha composta de bactérias Gram positivas com uma porcentagem G+C inferior a 50 % (*Clostridium*) e uma outra formada por bactérias contendo um teor em G+C superior a 50 % (Actinomicetos) (Holzapfel et al., 2001). Bactérias lácticas típicas têm um teor de G+C inferior a 50 %, enquanto que outras bactérias Gram positivas implicadas na indústria de alimentos, como as bactérias propiônicas e as bifidobactérias, apresentam um teor de G+C superior a 50 %, fazendo parte do filo Actinomicetos (Roissart e Luquet, 1994). *Lactobacillus* é filogeneticamente diverso, formando os grupos *Lactobacillus casei* – *Pediococcus* e *L. delbrueckii*. O primeiro é o maior e mais heterogêneo. Ele compreende mais de 30 espécies de *Lactobacillus* e 5 espécies de *Pediococcus*. A maior parte de seus membros são heterofermentativos estritos ou facultativos. O segundo grupo abrange somente espécies homofermentativas estritas (Roissart e Luquet, 1994).



(Fonte: Roissart e Luquet, 1994)

Figura 1: Árvore filogenética de bactérias Gram positivas baseada na análise da sequência comparativa de 16S rRNA, formadas de bactérias com conteúdo G+C elevado (lado esquerdo) e com conteúdo G+C baixo (lado direito).

Existe pouca analogia entre a classificação tradicional e a relação filogenética de bactérias lácticas. Os gêneros morfologicamente distintos, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* são filogeneticamente entrelaçados (Marth e Steele, 2001).

A abordagem clássica da taxonomia de BAL esteve sempre baseada nas características morfológicas e fisiológicas. Esta identificação foi ampliada para incluir marcadores quimiotaxonômicos, análise de proteínas totais e outras características da célula (Holzapfel et al., 2001). Porém, estes métodos de identificação e tipagem bacteriana não são geralmente reprodutíveis. Uma identificação segura é dependente de informações

genotípicas. A biologia molecular é uma importante ferramenta para o estudo da biodiversidade genômica das espécies em um determinado ecossistema. Por meio de técnicas moleculares e métodos de cultura-independente, é possível explorar e conhecer novos ecossistemas, e determinar o potencial biotecnológico de uma determinada região (Ndoye et al., 2011).

2.4.2. Identificação genômica de BAL

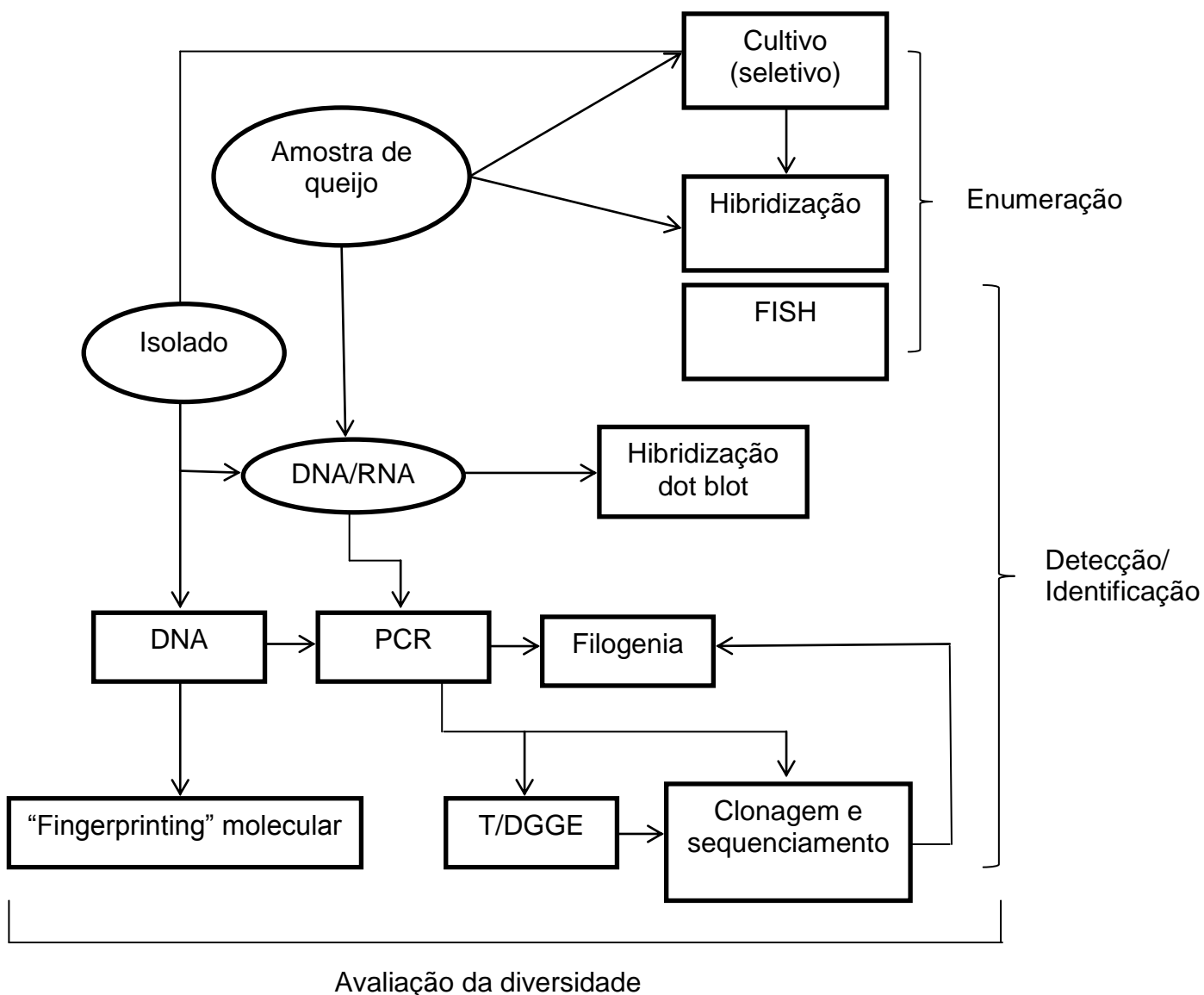
Tradicionalmente, o conhecimento da diversidade bacteriana em um determinado ecossistema é derivado de estudos de cultura, com base na multiplicação de micro-organismos em meio seletivo e sua posterior identificação em nível de gênero/espécie usando a caracterização fenotípica. Embora estes métodos sejam razoavelmente sensíveis, eles nem sempre permitem a discriminação de espécies ou cepas, nem a detecção das relações filogenéticas entre certos grupos de bactérias (Randazzo et al., 2009).

A limitação que estas técnicas microbiológicas tradicionais apresentam dificulta o real conhecimento da comunidade microbiana e seu papel na natureza. A classificação baseando-se em características fisiológicas e bioquímicas não se apresentam muito confiáveis para a avaliação da possível modificação da microbiota autóctone de um produto ou região. Portanto, para um melhor entendimento da diversidade microbiana e seu papel na manutenção do ecossistema, outras técnicas complementares à abordagem microbiológica clássica são necessárias (Pedroso et al., 2005).

Métodos de identificação baseados na extração do DNA ou RNA oferecem a possibilidade de conhecer o perfil de membros não cultiváveis de uma comunidade microbiana bem como a distinção daquelas que são metabolicamente ativas (Ndoye et al., 2011).

No início da década de 1980, uma variedade de técnicas moleculares foi desenvolvida para o estudo do “*fingerprinting*” como alternativa para a caracterização molecular das estruturas de comunidades presentes em diversos ecossistemas (Bruce 1996). Em geral, estas técnicas têm a vantagem sobre os métodos de identificação fenotípica por não serem influenciadas pelas condições de cultura.

Embora o uso destas técnicas esteja ainda em desenvolvimento, suas aplicações mostram ser uma poderosa ferramenta para determinar a estrutura e monitorar as comunidades microbianas em diferentes ambientes. Atualmente, estas técnicas podem ser divididas em: (i) métodos de cultura-dependente, baseado no cultivo seguido de identificação fenotípica ou molecular; e (ii) métodos de cultura-independente, baseado na extração do DNA total sem a necessidade de cultivo da célula (Randazzo et al., 2009). Na Figura 2 exemplifica-se as abordagens moleculares mais utilizadas para estudos da comunidade bacteriana em queijos.



(Fonte: Adaptado de Randazzo et al., 2009)

Figura 2: Fluxograma das atuais abordagens moleculares usadas isoladamente ou em conjunto para análise de comunidades microbianas

Técnicas de identificação genotípica revolucionaram a detecção de DNA/RNA em estudos ecológicos, pois elas não são influenciadas pelo estado fisiológico das células e permanecem constantes durante a multiplicação. O DNA genômico é obtido de qualquer material biológico e em seguida diferentes técnicas moleculares podem ser aplicadas de acordo com o que se deseja avaliar (Madigan et al., 2010).

A seleção dos métodos de tipagem mais apropriadas depende do custo, do rendimento e da reprodutibilidade. Alguns destes métodos são descritos abaixo.

1. PCR

O processo da reação em cadeia pela DNA polimerase (PCR) foi descrito pela primeira vez em 1983 pelo pesquisador norte-americano Kary Mullis. Outros pesquisadores já haviam descrito a técnica, mas Mullis inovou: conseguiu especificidade na cópia de apenas segmentos específicos, introduzindo o conceito de *primer* ou iniciadores de PCR (Mullis e Faloona, 1987).

A descoberta desta técnica foi tão revolucionária que a Revista *Science* selecionou a PCR como o principal desenvolvimento científico do ano de 1989 e escolheu como a primeira “Molécula do Ano” a DNA polimerase termoestável, enzima que polimeriza a reação (Guyer e Koshland Jr, 1989).

O desenvolvimento da técnica de amplificação de sequências específicas de ácidos nucléicos por reações de polimerização em cadeia da polimerase permite sintetizar em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA. Uma fita simples do DNA em estudo é utilizada como molde para a síntese de novas fitas complementares, catalisadas pela enzima DNA polimerase. Esta enzima adiciona os nucleotídeos presentes na reação complementando a fita molde. Esta amplificação é delimitada por dois iniciadores (*primers*), que são pequenas sequências de oligonucleotídeos. A região do DNA genômico a ser amplificada é definida por *primers* específicos, que se anelam às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento do DNA que deseja-se amplificar. Quando a PCR é utilizada em estudos comparativos ou filogenéticos, os *primers* são específicos para regiões do gene que exibem sequências conservadas em uma grande variedade de organismos (Madigan et al., 2010). Dessa forma é possível isolar e identificar uma ampla gama de bactérias, incluindo aquelas para quais métodos de isolamento e cultivo em meios de laboratório ainda não foram desenvolvidos (Ralyea et al., 1998).

A tecnologia da PCR tornou-se uma das mais influentes descobertas da revolução da biologia molecular, pela qual Mullis recebeu o Prêmio Nobel em 1993 (Walker, 2002). Considerando o impacto da PCR, outras técnicas foram desenvolvidas baseadas nesta reação.

PCR espécie-específica é uma das técnicas moleculares mais simples e mais eficazes para a detecção de gêneros ou espécies bacterianas, de acordo com o conjunto de *primers* que é utilizado. O desenvolvimento de *primers* gêneros ou espécies específicos que reconhecem uma região altamente conservada da sequência 16S rDNA (Fungaro, 2000), visa a disponibilização de um método de detecção sensível e específico, fornecendo resultados confiáveis (Mullié et al., 2003).

Fortina et al. (2007) desenvolveram uma PCR espécie-específica com *primers* específicos para a espécie *Enterococcus italicus*, utilizando o gene 16S rRNA como alvo. O protocolo desenvolvido foi altamente eficiente, capaz de identificar cepas de *E. italicus* em queijos. Os autores sugerem ainda que esta técnica oferece uma confiável e rápida alternativa aos métodos fenotípicos convencionais para a identificação de *E. italicus* dentro do diversificado gênero *Enterococcus*.

A PCR quantitativa (qPCR/PCR em tempo real), é usada predominantemente para detectar, identificar e quantificar tanto populações de micro-organismos patogênicos quanto benéficos, como os fermentadores ou probióticos (Solieri e Giudici, 2010; Le Dréan et al., 2010).

Desenvolvida em meados dos anos 90 para análises e quantificação de ácidos nucleicos, PCR em tempo real é uma técnica molecular que tem ganhado rapidamente popularidade. É utilizada para monitorar membros de comunidades microbianas específicas. Sua tecnologia baseia-se na detecção e quantificação da fluorescência de um marcador, ou de um agente de ligação ao DNA, como “Syber Green”, e é uma ferramenta eficiente para efetiva detecção, identificação e quantificação de bactérias em diferentes tipos de amostras ou produtos (Rasolofa et al., 2010).

A qPCR apresenta ainda muitas vantagens como a velocidade e reprodutibilidade além de não requerer grande quantidade de amostra. Entretanto, o limite da quantificação foi estimado em $3,3 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ de

Lactobacillus sakeii em carne e salsicha (Martín et al., 2006), e em 1×10^3 - 10^4 UFC.g⁻¹ de *Listeria monocytogenes* em queijo (Rantsiou et al., 2008).

A técnica qPCR foi utilizada com sucesso para a enumeração de bactérias lácticas em vinho (Neeley et al., 2005) e para a identificação e enumeração de *Lactobacillus buchneri* em silagem (Schmidt et al., 2008), e também para detectar a sobrevivência de *Escherichia coli*, *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* em queijo dinamarquês feito com leite cru, em diferentes estágios da maturação (Masoud et al., 2012).

2. PFGE

Inúmeros métodos são utilizados com o propósito de caracterizar espécies e cepas de micro-organismos de interesse alimentar. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) é conhecida como padrão ouro para análise da estrutura filogenética de populações bacterianas devido ao seu alto poder discriminatório e de reprodutibilidade (Magalhães et al., 2005). A diversidade de cepas de uma determinada espécie pode ser estudada por esta técnica, pois gera um perfil molecular facilmente interpretado, característico de cada cepa.

O elemento chave desta técnica é a seleção das enzimas de restrição. O uso de enzimas de “raros cortes” cliva o cromossomo em grandes fragmentos, depois da digestão do DNA cromossomal. O número de fragmentos vai variar entre os diferentes clones. Em virtude do tamanho dos fragmentos, técnicas sofisticadas são utilizadas para separar os grandes fragmentos de DNA em um campo elétrico de contínua reorientação (Randazzo et al., 2009). Estas enzimas de restrição possuem poucos sítios de reconhecimento, gerando um perfil com aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 800 Kb (Alves et al., 2003). Elas são altamente específicas e clivam apenas uma determinada sequência de nucleotídeos. Algumas das enzimas de restrição mais utilizadas para estudos com bactérias lácticas são: *SmaI* para o gênero *Lactococcus* (Kahala et al., 2008), *XbaI* para *Enterococcus* (Kagkli et al., 2007), e *NotI* para o *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (Kahala et al., 2008; Vancanneyt et al., 2006). A impressão do DNA obtido depende da especificidade da enzima de restrição usada e da sequência do genoma bacteriano e é, portanto, característica de

uma espécie ou cepa bacteriana em particular. Esta impressão representa o genoma completo e assim pode detectar alterações específicas (deleção de DNA, inserções ou rearranjos) dentro de uma determinada cepa ao longo do tempo. Seu alto poder discriminatório tem sido útil para a diferenciação de cepas pertencentes às mesmas espécies de BAL (Randazzo et al., 2009)

Para a realização da PFGE, blocos de agarose com a cultura de micro-organismo são preparados (Figura 3). Desta forma, o DNA bacteriano fica protegido no interior do bloco. Estes blocos são colocados com enzimas para que ocorra a lise celular e depois de algumas lavagens, ocorre a digestão com a enzima de restrição. Os blocos de agarose com o DNA digerido são colocados em géis de agarose e submetidos a eletroforese em campo pulsado. Um gel de agarose a 0,8 % é apropriado para separação de fragmentos de 20-30kb, enquanto que géis mais concentrados (2,5-3 %) separam fragmentos menores (80-500pb) (Magalhães et al., 2005).

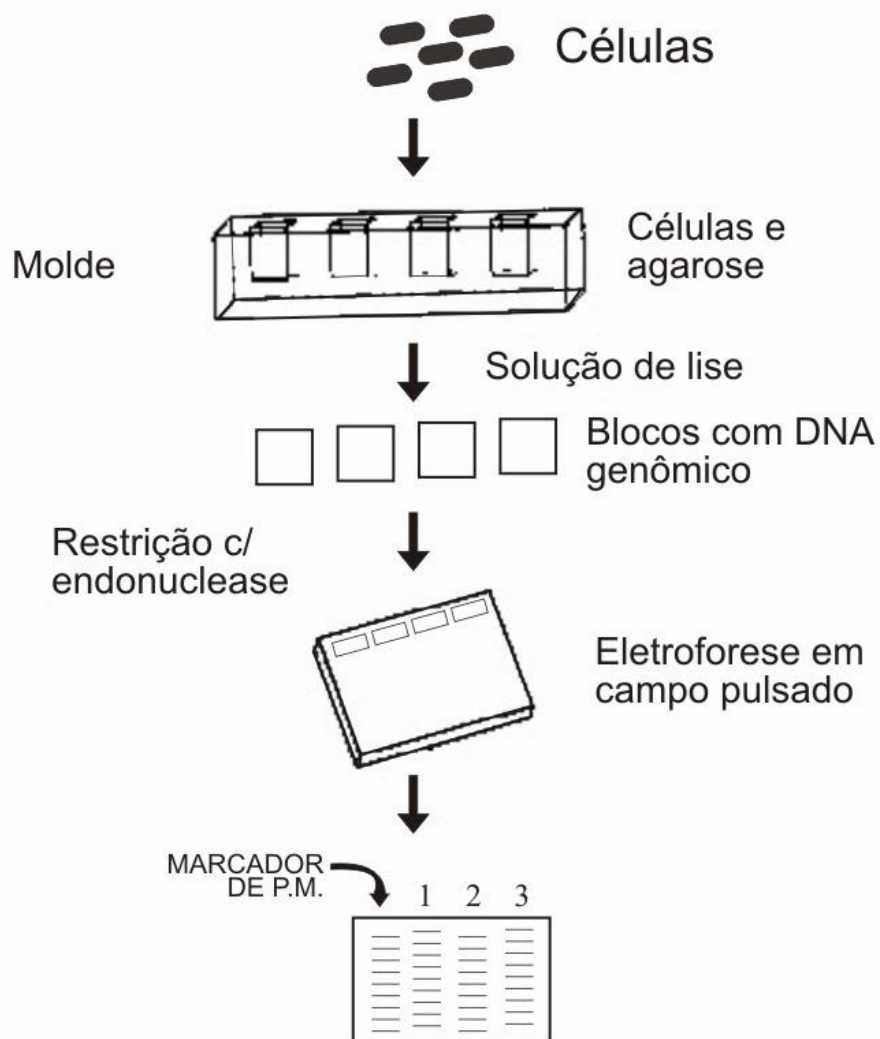


Figura 3: Esquema da realização da técnica PFGE

Para determinar o grau de contaminação do leite cru com enterococos e coliformes a partir de fezes bovinas, um estudo realizado por Kagkli et al. (2007) utilizou a técnica de PFGE. Enterococos e coliformes foram isolados de fezes bovinas, tetas, leite cru e ambiente de ordenha em uma fazenda. A relação clonal de cada grupo bacteriano foi investigada usando a enzima de restrição *Xba*I. Este método dividiu os 301 isolados de *Enterococcus* em 46 grupos, onde todos os isolados do leite, 67 % dos isolados da tubulação e um isolado da água de lavagem de mãos mostraram o mesmo padrão

PFGE. Nenhum isolado fecal bovino ou humano teve um padrão PFGE similar aos dos isolados do leite. Para coliformes, a PFGE dividiu os 302 isolados em 34 diferentes grupos. Somente um isolado da água de lavagem de mãos, identificado como *E. coli*, um isolado da água de rinsagem das tetas e 2 isolados do tanque de leite foram similares aos isolados de fezes bovina. Os autores puderam concluir que fezes bovinas não é uma importante fonte de contaminação do leite cru por enterococos e coliformes.

A técnica PFGE tem sido muito utilizada para estudos em nível de sub-espécie devido ao seu alto poder discriminatório e reprodutibilidade.

3. MLST

O sequenciamento de fragmentos internos de genes *housekeeping* de uma dada espécie é chamado de Multilocus Sequence Typing (MLST). Este método foi proposto em 1998 como método portátil, universal e definitivo para a caracterização microbiana, usando o patógeno humano *Neisseria meningitidis* como exemplo (Maiden, 2006).

Os genes *housekeeping* estão localizados nos cromossomos e estão presentes nas células em qualquer circunstância, pois codificam funções essenciais, como por exemplo a produção de DNA e RNA polimerase (Madigan et al., 2010). A MLST tem como alvo esses genes, os quais evoluem lentamente. Por isso estes genes podem mostrar um alto grau de variabilidade entre bactérias relacionadas que o gene 16S rRNA a fim de distinguir subespécies ou cepas (Ndoye et al., 2011).

A proposta da técnica MLST como uma abordagem universal foi feita possivelmente graças a três avanços na microbiologia molecular: (i) melhor conhecimento da evolução bacteriana; (ii) aumento na disponibilidade e diminuição do custo do sequenciamento com alto rendimento, e (iii) desenvolvimento da tecnologia de informação, principalmente o desenvolvimento da internet como uma troca eficiente e instantânea de informações (Chan et al., 2001).

O método é baseado no sequenciamento de um limitado número (geralmente 5 ou 7) de genes *housekeeping* presente no genoma *core* (genoma típico da espécie como um todo). Como se baseia em sequências

de nucleotídeos, a MLST é altamente discriminatória e fornece resultados inequívocos que são diretamente comparáveis entre laboratórios. Para uma abordagem padronizada dos resultados, dados MLST estão disponíveis gratuitamente na internet (<http://www.mlst.net/>) para assegurar que uma nomenclatura uniforme esteja prontamente disponível a todos os que desejam trabalhar com esta técnica (Maiden, 2006).

A MLST exibe suficiente poder de resolução para fazer a distinção até mesmo de linhagens estreitamente relacionadas. Estas linhagens podem ser discriminadas com base em uma única alteração nucleotídica em somente um dos vários genes analisados (Madigan et al., 2010).

Embora a MLST tenha sido principalmente desenvolvida para estudar os principais patógenos bacterianos, muitos esquemas recentes foram criados para algumas bactérias lácticas: *Lactococcus lactis* (Passerini et al., 2010), *Lactobacillus plantarum* (Rivas et al., 2006), *Lactobacillus delbrueckii* (Tanigawa e Watanabel, 2011) e também para a espécie láctea *Propionibacterium freudenreichii* (Dalmasso et al., 2011).

O esquema criado por Passerini et al. (2010) para cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* pode ser consultado no endereço: <http://www-mlst.biotoul.fr/Lactococcuslactissubsp. lactis/> (Figura 4). O estudo foi realizado com 36 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* de origem láctea e não láctea e com um total de 6 loci distribuídos uniformemente entre o cromossomo. O esquema MLST permitiu 25 sequências tipo (ST) serem distinguidas entre 32 cepas analisadas.

Passerini et al. (2010) mostraram em seu estudo, por meio da PFGE e da MLST, que os genes e não os genomas revelaram a domesticação de cepas de *Lactococcus lactis*. Os resultados da técnica MLST apresentaram alta variabilidade dentro da subespécie *lactis*.

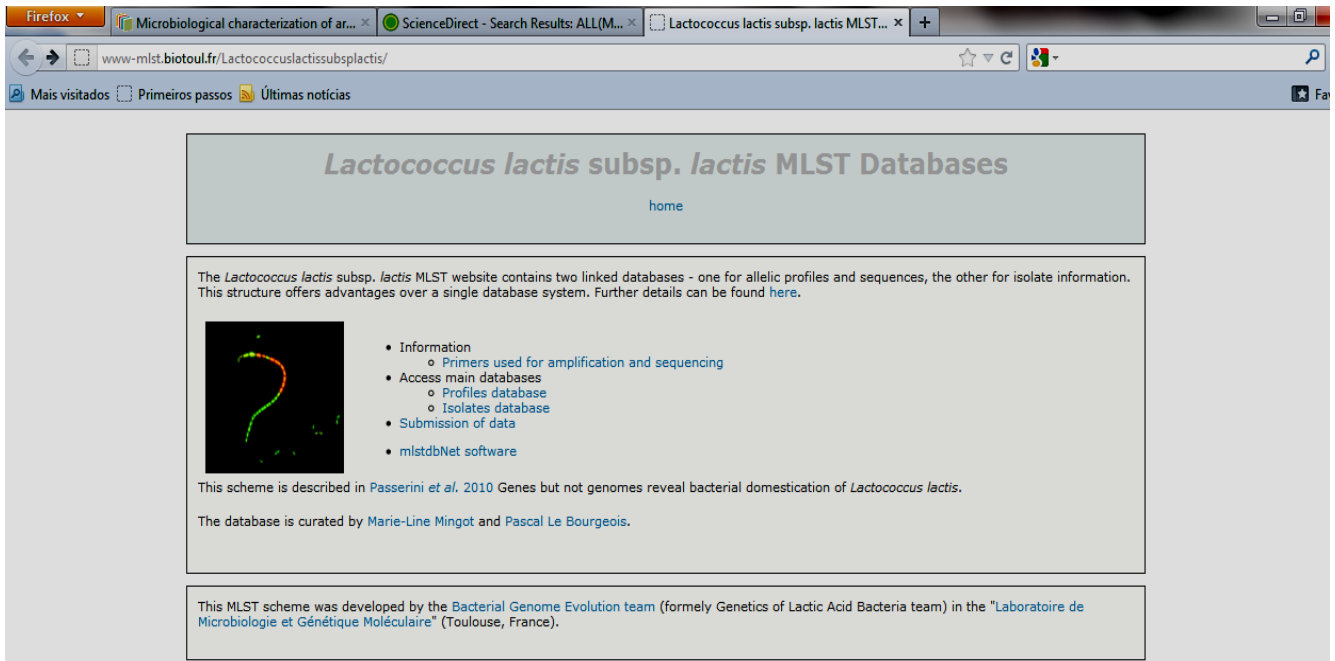


Figura 4: Exemplo da homepage para estudo de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*

O uso da MLST será de grande ajuda na definição do *status* de novas cepas de bactérias lácticas, e pode ser mais informativo que outros métodos de genotipagem (Passerini et al., 2010). Este método apresenta uma poderosa habilidade de discriminação de cepas, sendo geralmente utilizado na discriminação de cepas de acordo com suas origens (Tanigawa e Watanabe, et al. 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: o isolamento e a caracterização fenotípica dos isolados foram realizadas no Laboratório de Culturas Lácticas, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) situado na Universidade Federal de Viçosa. As análises biomoleculares foram realizadas no Centre International de Ressources Microbiennes-Bactéries d'Intêret Alimentaire (CIRM-BIA)/Science et Technologie du Lait et de L'Oeuf, localizado em Rennes, França.

3.1. Coleta das amostras e isolamento dos micro-organismos

3.1.1. Amostragem e coleta das amostras

No período de junho a setembro de 2010 foram coletadas amostras de leite cru, solo e silagem em diferentes propriedades na região do Campo das Vertentes - MG. As propriedades foram identificadas como: "Zé Francisco" (Z), "Júlio Carlos" (JC), "Aniceto" (AN), "Juninho" (JU), "José Santos" (JS) e "Clair" (CL). As propriedades foram selecionadas com base na boa qualidade do leite produzido nestas fazendas. Foram coletadas seis amostras por propriedade, 2 para o leite, 2 para a silagem e 2 para o solo, perfazendo um total de 36 amostras. O solo foi coletado de forma

randômica, em torno do local onde as vacas pastavam e descansavam. A silagem foi coletada em diferentes pontos do volume estocado na própria fazenda e o leite cru coletado do tanque de expansão, localizado na propriedade.

3.1.2. Análise das amostras

Após cada coleta, o material foi transportado sob refrigeração em caixas isotérmicas para o laboratório de Culturas Láticas e mantido sob refrigeração até o momento das análises microbiológicas.

Amostras de silagem e solo (25 g) foram diluídas em 225 mL de solução salina (NaCl 0,85 % (m/v) esterilizada e homogeneizada (solução mãe). Para as amostras de leite cru, uma alíquota de 1 mL foi diluída em 9 mL de solução salina (NaCl 0,85 % (m/v) esterilizada e homogeneizada (solução mãe). A partir de cada solução mãe, diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-8} foram efetuadas e plaqueadas pela técnica de “*spread plate*” em *Yeast Extract Lactate Agar* (Malik et al., 1968) (Tabela 3). O ágar é YEL é utilizado para seleção de bactérias propiônicas. Por isso este meio foi utilizado para isolamento, visto que o objetivo inicial da pesquisa era o estudo destas bactérias. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias em condições de anaerobiose (Câmara de anaerobiose - COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA).

Tabela 3 : Composição do meio *Yeast Extract Lactate Agar*

Ingredientes	Quantidade (para 1 L)
Triptona	20 g
Extrato de Levedura	10 g
Lactato de sódio (50 %)	20 mL
K ₂ HPO ₄	1 mL
MnSO ₄	1 mL
Ágar	13,5 g
Água destilada	1000 mL

3.1.3. Isolamento e caracterização dos isolados

Após o período de incubação, 10 % das colônias foram randomicamente selecionadas de placas que apresentaram contagem entre 25 e 250 colônias, repicadas em caldo YEL e incubadas a 30 °C por 72 horas. Os isolados foram submetidos ao teste morfológico e tintorial de Gram e ao teste de catalase, segundo protocolos do Laboratório de Culturas Láticas. Aqueles que se apresentaram como catalase negativos/positivos, gram positivos, em forma de coco ou bacilo, foram transferidos para caldo BHI suplementado com 30 % de glicerol (v/v) e estocados, em triplicata, a -80 °C para posterior caracterização e identificação.

3.1.4. Análise da produção de ácido propiônico em caldo YEL por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

A capacidade de produção de ácido propiônico dos isolados foi analisada pela técnica de HPLC, com objetivo de avaliar a presença de bactérias propiônicas entre as cepas. Os isolados foram cultivados em caldo YEL a 32 °C por 48 horas. Alíquotas de 1 mL foram centrifugadas sob refrigeração em uma Microcentrífuga Sigma 2k15 (Long Island Scientific, Port Jefferson, USA) a 10000 g por 10 minutos, e o sobrenadante

posteriormente congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso. As amostras foram descongeladas e analisadas em cromatógrafo Ultimate 3000 Dual (DIONEX), em coluna PHENOMENEX® Rezex ROA 300×7,8 mm, utilizando como fase móvel H_2SO_4 0,005M, temperatura de operação de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com detector de índice de refração (Shodex RI-101). Foram utilizados como padrões lactose, glicose, galactose, succinato, lactato, formato, acetato, propionato, etanol e butirato.

3.2. Identificação molecular dos isolados e estudo da diversidade

O estudo genotípico foi realizado empregando-se as técnicas de PCR com *primers* universais, sequenciamento do 16S rDNA, PCR espécie-específica, PFGE e MLST.

3.2.1. Preparo das amostras

Os isolados estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram ativados 2 vezes em caldo YEL, para completa remoção do glicerol, incubados ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h) e transferidos para tubos *ependorf* contendo 1 mL de ágar YEL semi sólido (1 %). O procedimento foi realizado em duplicata e as amostras enviadas ao laboratório na França.

3.2.2. Extração do DNA genômico total

A extração do DNA foi realizada de acordo com protocolos do laboratório CIRM-BIA e seguindo-se instruções do fornecedor QIAGEN, (Hilden, Germany). As soluções utilizadas para efetuar a extração de DNA estão listadas no Anexo 2:

1. Preparo das células

As culturas foram ativadas em 10 mL de caldo YEL ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h) e centrifugadas (1 mL) a 10000 g por 10 minutos. Eliminou-se o sobrenadante e o DNA foi extraído a partir do *pellet*.

2. Lise e lavagem das células

Ao *ependorf* contendo o *pellet*, foram adicionados 180 µL de tampão lise, seguindo-se homogeneização e incubação a 37 °C por uma hora. Após este período, 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão AL do kit Qiagen foram adicionados, homogeneizados lentamente e a amostra incubada por 30 minutos a 70 °C. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de álcool absoluto, seguindo-se agitação lenta. A amostra foi transferida para uma coluna do kit Quiagen e centrifugada a 10000 g por 2 minutos. Procedeu-se troca do tubo coletor, adicionou-se 500 µL de AW1 (kit Quiagen) e realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O tubo coletor foi trocado mais uma vez, e adicionou-se 500 µL de AW2 (kit Quiagen), sendo a coluna centrifugada a 10000 g por 3 minutos.

3. Recuperação e verificação da concentração do DNA

A coluna foi colocada dentro de um *ependorf* estéril, sendo posteriormente adicionados 100 µL de AE (kit Quiagen). Após 2 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 2 minutos, procedendo-se nova extração nas mesmas condições descritas anteriormente. As frações de DNA foram reunidas no mesmo *ependorf*, quantificadas (ng/µL) em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 - Labtech, Palaiseau, França) e estocadas a – 20 °C.

3.2.3. Identificação dos isolados por técnica de PCR empregando-se *primers* universais

A reação de PCR utilizando *primers* universais W001: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3' e W002: 5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3' foi realizada em termociclador C1000TM (Bio Rad) de acordo com procedimentos adotados por Godon et al. (1997). A quantidade de cada componente necessária para a reação de amplificação é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Componentes e suas respectivas quantidades utilizadas para reação de PCR com *primers* universais

Mix PCR	Marca	Quantidade (50 µL)
Água pura	Sigma	38,5
Tampão com MgCl ₂	Q-Biogene	5
DNTP (5mM)	Q-Biogene	2
<i>Primer</i> W001 (60 µM)	Sigma	1
<i>Primer</i> W002 (60 µM)	Sigma	1
Taq (2,5 U/ µL)	Q-Biogene	0,5
DNA	-	2

A PCR foi realizada com desnaturação inicial a 96 °C por 4 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 40 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos, polimerização a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e polimerização final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da reação de PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v), empregando-se TBE 0,5 X (Tampão Tris Borato EDTA 10 X Sigma T4415 como tampão. A eletroforese foi efetuada a 100 V por 30 a 40 minutos. O gel foi corado em brometo de etídio (0,5 g/mL) por 15 minutos e os perfis analisados em transiluminador (G:Box Chemin XT4).

3.2.4. Sequenciamento do gene 16S rDNA

Os produtos de DNA foram sequenciados pelo Sequencing Service of AGOWA Genomics (Berlin, Germany) e os resultados analisados por similaridade com sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A similaridade é dada em porcentagem, então para cada isolado, uma PCR espécie-específica foi realizada para cada isolado para confirmar a indicação do sequenciamento, inclusive para aqueles que apresentaram 100 % de similaridade.

3.2.5. PCR espécie-específica

Para todas as amostras bacterianas analisadas, uma ou mais PCR espécie-específicas foram realizadas, de acordo com os resultados do sequenciamento.

As análises de PCR realizadas dividiram-se em 5 grandes grupos de bactérias: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Staphylococcus* (Tabela 5).

Tabela 5: Grupo de micro-organismos, primers, sequência do DNA e tamanho do produto esperado nas análises de PCR espécie-específica realizada neste experimento.

Grupos	Par de primers	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)	Fonte
<i>Lactococcus</i>				
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LacreR LacF	GGGATCATCTTTGAGTGAT GTACTTGTACCGACTGGA	163	Pu et al., 2002
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LacreR CreF	GGGATCATCTTTGAGTGAT GTGCTTGCACCGATTTGAA	163	Pu et al., 2002
<i>L. garvieae</i>	1RL LgR	TTTGAGAGTTTGATCCTGG AAGTAATTTTCCACTCTACTT	482	Pu et al., 2002
<i>Enterococcus</i>				
<i>E. faecium</i>	EFM1 EFM2	TKCAGCAATTGAGAAATAC CTTCTTTTATTTCTCCTGTA	169	Licitra et al., 2007
<i>E. durans</i>	ED1 ED2	AAACGCAGCTATTGAAAA AAGCGTCCGGCAGCC	247	Licitra et al., 2007
<i>E. faecalis</i>	EFS1 EFS2	CTGTAGAAGACCTAATTTCA CAG CTG TTT TGA AAG CAG	210	Licitra et al., 2007
<i>E. italicus</i>	ItaF ItaR	TACCGCATAATACTTTTTCTCT TACCGCATAATACTTTTTCTCT	323	Fortina et al., 2007
<i>Lactobacillus</i>				

<i>L. casei</i>	Y2 Casei	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT TGCACTGAGATTGACTTAA	290	Ward e Timmins, 1999
<i>L. paracasei</i>	Y2 Para	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT CACCGAGATTCAACATGG	290	Ward e Timmins, 1999
<i>L. plantarum</i>	Lp11 Lp12	AATTGAGGCAGCTGGCCA GATTACGGGAGTCCAAGC	253	Quere et al., 1997
<i>Leuconostoc</i>				
<i>L. mesenteroides</i>	LnM1 LnM2	TGTCGCATGACACAAAGTTA ATCATTTCCTATTCTAGCTG	290	Cibik et al., 2000
<i>Staphylococcus</i>				
<i>S. warneri</i>	SwaF SwaR	TGTAGCTAACTTAGATAGTGTTTCCTTCT CCGCCACCGTTATTTCTT	63	Iwase et al., 2007

3.2.5.1. Cepas de referência utilizadas na PCR espécie-específica

Para cada reação de PCR espécie-específica, uma cepa pertencente ao banco de culturas do laboratório CIRM (Rennes, França) foi utilizada como controle positivo, para comparação dos perfis entre a cepa testada e a cepa controle. As cepas são classificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CIRMBIA 44T), *L. lactis* subsp. *cremoris* (CIRMBIA 81T), *Enterococcus faecalis* (CIRMBIA 739T), *E. faecium* (CIRMBIA 496T), *E. durans* (CIRMBIA 743T), *E. italicus* (DSM 15952T), *Lactobacillus casei* (CIRMBIA 667T), *L. paracasei* (CIRMBIA 672T), *L. plantarum* (CIRMBIA 466T), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (CIRMBIA 430T) e *Staphylococcus warneri* (CIRMBIA 1065T).

3.2.6. PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada com todos os isolados que poderiam pertencer a espécie *Staphylococcus warneri*. A metodologia empregada foi baseada na q-PCR sugerida por Iwase et al. (2007), utilizando-se o par de primers SwaF (5'-3' TGTAGCTAACTTAGATAGTGTTTCCTTCT), e SwaR, (5'-3' de

CCGCCACCGTTATTTCTT) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos; e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

3.2.7. Pulsed Field Gel Electrophoresis

Após a confirmação das espécies pela PCR espécie-específica, a diversidade genética foi determinada pela técnica de PFGE.

As bactérias selecionadas para a análise de PFGE pertencem aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* por serem as espécies de interesse industrial com maior número de isolados.

3.2.7.1. Enzimas de restrição

Inicialmente, quatro enzimas de restrição (*SmaI*, *XbaI*, *NotI*, *ApaI*) foram testadas neste experimento com o objetivo de selecionar as que poderiam ser utilizadas na distinção das cepas isoladas. *NotI* e *SmaI* (Kahala et al., 2008) foram selecionadas para as análises de *L. lactis* e *SmaI* e *ApaI* (Doulgeraki et al., 2010; Kagkli et al., 2007) para as análises de *Enterococcus* e *L. garvieae*. *XbaI* foi usada para a análise do marcador (cepa *Propionibacterium freudenreichii* ITGP18=TL 142) em ambas as análises.

3.2.7.2. Preparo da cultura e dos blocos de agarose

Cada cepa identificada na PCR espécie-específica pertencente aos gêneros *Lactococcus* ou *Enterococcus* foram inoculadas em caldo M17, incubadas a 30 °C por 12 a 18 horas e analisadas em espectrofotômetro a 650 nm (DO<1).

Os blocos de agarose foram preparados de acordo com metodologia descrita por Lortal et al. (1997). Os blocos foram mantidos durante uma hora em tampão de restrição a 4 °C sendo posteriormente transferidos para 300 µL de tampão de digestão fresco contendo 15 unidades da enzima de restrição. Procedeu-se incubação *overnight* a 25 °C para a enzima *SmaI* e a 37 °C quando a enzima utilizada foi *XbaI*, *ApaI* ou *NotI*. Como marcador, foi

utilizada em ambas as análises a cepa *Propionibacterium freudenreichii* (ITGP18=TL 142).

3.2.7.3. Preparo do gel e condições de migração

Os blocos digeridos foram inoculados em gel de agarose 1 % (Ultrapur, Gibco-BRL, Scotlad) utilizando-se TBE 0,5 X como tampão de corrida. Eletroforese em campos pulsados foi realizada em cuba de eletroforese (Bio-Rad CHEF DR) a 200 V e solução tampão a 14 °C. Para as cepas de *Lactococcus lactis* utilizou-se tempo inicial de 2 s e tempo final de 25 s, tempo total de corrida de 21 h, de acordo com Kahala et al. (2008). Para as cepas de *L. garvieae* e *Enterococcus*, empregou-se tempo inicial de 5 s e tempo final de 35 s durante 20 h e tempo inicial de 5 s e tempo final de 10 s durante 4 h respectivamente, segundo Nóbrega (2012). O gel foi corado em solução de brometo de etídio, visualizado em transiluminador e analisado pelo logiciel Bionumerics (Applied Maths, Belgium).

3.2.7.4. Análise dos perfis eletroforéticos

Para a interpretação dos padrões de restrição do DNA cromossomal por PFGE, foram considerados como tendo o mesmo perfil as cepas que partilharam pelo menos 89,7 % de similaridade – para as cepas de *L. lactis* e 93,5 % para as cepas de *E. lactis* e *L. garvieae* (similaridade entre os marcadores). As análises foram realizadas utilizando o algoritmo UPGMA, com o programa Bionumerics (Applied Maths, Belgium), usando otimização de 1 %,

3.2.8. Multilocus Sequence Typing

Por meio da técnica de PFGE, as cepas de *Lactococcus* e *Enterococcus* foram separadas em diferentes grupos, de acordo com a origem de cada cepa.

Para confirmar os resultados obtidos pela PFGE e estabelecer uma relação filogenética entre as cepas de *Lactococcus lactis*, recorreu-se ao

esquema MLST proposto por Passerini et al. (2010) de modo a determinar os perfis alélicos de cada clone. Objetivou-se também comparar o poder discriminatório entre as técnicas MLST e PFGE. O esquema de Passerini et al. (2010) foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Genética Molecular da Universidade de Toulouse, França. Este esquema baseia-se no sequenciamento de fragmentos de 6 genes *housekeeping*: *bcaT*, *glyA*, *pdp*, *pepXP*, *pgk* e *recN*. Neste trabalho foram utilizados 5 genes, excluindo-se o gene *pepXP*, pois a amplificação deste gene não funcionou para as cepas testadas (Tabela 6).

Tabela 6: Locus e primers utilizado para PCR_MLST de *L. lactis* subsp. *lactis*

Locus	Primers	Sequência	Tamanho (pb)
<i>bcaT</i>	bcaT_PCR_F	5'-AATTTAGACTGGGAAAATTTAGG-3'	516
	bcaT_PCR_R	5'-CAACATCACCAAACCTGAATG-3'	
<i>glyA</i>	glyA_PCR_F	5'-ATGATTTTTGATAAAGAAGATTTTGA-3'	453
	glyA_PCR_R	5'-CTTCAACTTCTTTAAATCCTCT-3'	
<i>pdp</i>	pdp_PCR_F	5'-ATGGTTGATCTCATTCAAAGAA-3'	492
	pdp_PCR_R	5'-TTCAGTAACTAATTCGTCAG-3'	
<i>pgk</i>	pgk_PCR_F	5'-TGGCAAATGACTGTAAAAGA-3'	480
	pgk_PCR_R	5'-TTTTCAGTCAAAGCTGCAAGTC-3'	
<i>recN</i>	recN_PCR_F	5'-TTGTCGAATCAATGGTCAAATGG -3'	489
	recN_PCR_R	5'-TCCATATAAAGCTCAGAAAGTTTCG-3'	

Um total de 20 isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* foram analisadas pela técnica MLST. Dez cepas provenientes das coletas realizadas nas fazendas do Campo das Vertentes - MG e 10 isolados provenientes da Coleção de Cultura CIRM-BIA/França. Os isolados oriundos da Coleção CIRM-BIA abrange cepas de diferentes origens mundiais, isoladas de leite ou produto lácteo. O objetivo desta escolha foi o de validar a metodologia e

comparar as cepas brasileiras com as cepas isoladas em diferentes partes do mundo (Tabela 7).

Tabela 7: Cepas, amostras e país de isolamento.

Nome da cepa	Amostra	País
LC1-1 JU	Leite cru	Brasil
LC1-2 JU	Leite cru	Brasil
LC3 JU	Leite cru	Brasil
LC5 JU	Leite cru	Brasil
LC8 JU	Leite cru	Brasil
LC4-2 JU	Leite cru	Brasil
LC5-1 JS	Leite cru	Brasil
LC5-2 JS	Leite cru	Brasil
LC7-J	Leite cru	Brasil
SO11-2 J	Solo	Brasil
235	Leite cru	França
237	Leite cru	França
243	Leite cru	França
44	Não informado	Dinamarca
47	Cultura starter	Austrália
633	Leite cru	França
644	Queijo Majorero	Espanha
646	Queijo Domiati	Egito
648	Leite de yack	Nepal
88	Kefir	URSS

MLST foi realizada como descrito por Passerini et al. (2010). As análises de PCR foram feitas com cada par de *primer* (Tabela 6), para as 20 cepas de *Lactococcus* selecionadas. Um volume de 50 µL de mistura compunha o mix de cada análise de PCR, contendo 10 ng de DNA, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, Saint-Rémy-Les-Chevreuses, France). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 30 segundos, 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 60 segundos e 72 °C por 10 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da reação da PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) como já descrito anteriormente. Os perfis de banda para cada par de *primer* foram visualizado sob luz ultravioleta e o tamanho do produto amplificado comparado ao tamanho esperado de cada sequência (locus) amplificada (Tabela 6).

Após verificação da amplificação, os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento (AGOWA, Berlin, Germany) e analisados para verificar o alelo de cada um dos genes. *Primers* com diferentes sequências dos *primers* para amplificação foram utilizadas para o sequenciamento (Tabela 8).

Tabela 8: Locus e *primers* utilizados para o sequenciamento dos genes amplificados

Locus	Primers	Sequência
<i>bcaT</i>	bcaT_SEQ_F bcaT_SEQ_R	5'-AGGATTCAGCTATCGGAACTTAC-3' 5'-TTTAGTATGTGTGCTTGGGTCAA-3'
<i>glyA</i>	glyA_SEQ_F glyA_SEQ_R	5'-GTTATGGCAGCACAAGGTTC-3' 5'-GTTGTTGTAACGACATCAGCATAAG-3'
<i>pdp</i>	pdp_SEQ_F pdp_SEQ_R	5'-TCACGATGGCAATGGTTCATTC-3' 5'-TCATTTTATTTCGATTTCCGATAGC-3'
<i>pgk</i>	pgk_SEQ_F pgk_SEQ_R	5'-CAAAGCTGGTAAATCACTTGCCAC-3' 5'-TGTGGTCAAGTGGCAAAATCAA-3'
<i>recN</i>	recN_SEQ_F recN_SEQ_R	5'-CGTCAACAGCTCAATTTACGAC-3' 5'-GCAATTTTATGGCGCGCTTC-3'

Para análise do MLST, as sequências foram analisadas por meio de ferramentas disponíveis no endereço eletrônico: <http://www-mlst.biotoul.fr/Lactococcuslactissubsplactis/>. Todas estas ferramentas permitiram obter o alinhamento das sequências e o seu número correspondente (alelo). A combinação dos 5 alelos indicou a sequência tipo

(sequence type – ST) e o complexo clonal (clonal complex – CC) a que cada uma das cepas pertencia.

Para obtenção da figura dos complexos clonais e análise das ST, o programa *on line* eBurst V3 (<http://eburst.mlst.net>) foi utilizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1. Coleta das amostras, enumeração e isolamento dos micro-organismos

4.1.1. Bactérias propiônicas

Foi utilizado o meio de cultura YEL para isolamento dos micro-organismos, pois a enumeração de bactérias propiônicas normalmente é feita neste meio. Porém estes micro-organismos não foram encontrados nas amostras coletadas. O meio YEL inibe a multiplicação da maior parte de leveduras, entretanto lactobacilos mesófilos e enterococos se multiplicam igualmente (Jan et al, 2001). Este resultado não comprova que bactérias propiônicas não estão presentes na região estudada. Porém o meio de cultura utilizado não se mostrou eficiente para o isolamento destas bactérias. A coleção de micro-organismos estudada nesta pesquisa é oriunda deste isolamento.

4.1.2. Coleta das amostras e plaqueamento

A partir das 36 amostras coletadas nos três biotopes das seis propriedades do Campo das Vertentes, 200 cepas de micro-organismos mesófilos foram isoladas. A média da contagem ($\log \text{UFC.ml}^{-1}$ ou UFC.g^{-1})

de micro-organismos nas três repetições foi de 4,5 no leite cru e no solo e de 6,5 para a silagem.

Para as amostras de leite cru e solo, as colônias foram isoladas de placas de Petri provenientes das diluições 10^{-3} e 10^{-4} . Já para a silagem, foram utilizadas as placas de diluições 10^{-5} e 10^{-6} . O isolamento foi realizado a partir de placas de Petri com contagem entre 25 a 250 colônias e após verificação da pureza os isolados foram estocados (triplicata) em meio glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O leite dentro das glândulas mamárias é estéril (Robinson, 2002), mas ele pode ser contaminado a partir de diversas fontes como as tetas, durante a ordenha, pelo ar do ambiente de ordenha e manipulador. A formação de biofilme em virtude da deposição e adesão de micro-organismos nas superfícies de equipamentos e utensílios para processamento de leite pode também representar uma fonte de contaminação do leite, podendo trazer graves consequências à qualidade, como alteração e veiculação de patógenos (Andrade, 2008).

O resultado neste estudo indica que a variabilidade da qualidade global do leite cru foi determinada principalmente por critérios de higiene adotados em cada fazenda, visto que a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos variou de uma fazenda para outra.

4.1.3. Isolamento, caracterização e preparo dos isolados

Os 200 isolados das diferentes amostras foram selecionados após teste morfotintorial da coloração de Gram e teste da catalase. Destes, 83 apresentaram-se como bactérias gram positivas em forma de cocos ou bacilos. O teste de catalase foi realizado para fim de classificação, visto que bactérias lácticas são catalase negativa e bactérias propiônicas são catalase positiva.

4.1.4. Análise da produção de ácido propiônico em caldo YEL por HPLC

Não foi verificada, por meio da técnica de HPLC, a produção de ácido propiônico pelas cepas selecionadas, evidenciando não haver bactérias do gênero *Propionibacterium* dentre os micro-organismos isolados.

4.2. Identificação molecular dos isolados

Imediatamente após a chegada dos isolados na França, os mesmos foram repicados em caldo BHI e em seguida foi feita uma observação microscópica para verificar possíveis contaminações. Dentre os isolados que apresentaram as mesmas características fenotípicas (Gram, catalase e morfologia), oriundos da mesma placa de Petri, somente um isolado foi retirado para análise, descartando-se o risco de isolar um mesmo clone. Um total de 50 isolados foram recuperados e purificados. Após extração do DNA, análises de PCR com *primers* universais foram realizadas com todos os isolados, a fim de se obter material amplificado para o sequenciamento do gene 16S rDNA. A classificação dos isolados em função das fazendas, morfologia observada ao microscópio, concentração de DNA extraído e o resultado do sequenciamento 16S são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição dos isolados por gênero, identificação das fazendas, resultado da similaridade dos isolados (sequenciamento gene 16S rDNA) e resultado da PCR espécie-específica e qPCR.

Gêneros	Isolados	Fazendas	Sequenciamento gene 16S rDNA (% de similaridade)	PCR espécie-específica
<i>Lactococcus</i>				
	SO2	J	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	SO11-2	J	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC7-1	J	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> (99 %)/ <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC1-1	JU	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (100 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC1-2	JU	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)/ <i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC3	JU	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC4-2	JU	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC5	JU	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC8	JU	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	SI9	AN	<i>Lactococcus garvieae</i> (98 %)	<i>L. garvieae</i>
	LC5	CL	<i>Lactococcus garvieae</i> (100 %)	<i>L. garvieae</i>
	LC5-1	JS	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	LC5-2	JS	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99 %)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Enterococcus</i>				
	LC5-2	J	<i>Enterococcus faecalis</i> (99 %)/ <i>E. faecium</i> (99 %)/ <i>E. durans</i> (99 %)/ <i>E. lactis</i> (99 %)	<i>E. lactis</i>
	SO1-2	JU	<i>E. faecalis</i> (99%)/ <i>E. faecium</i> (99 %)/ <i>E. faecalis</i> (99 %)/ <i>E. lactis</i> (99 %)	<i>E. lactis</i>

LC5-1	Z	%) <i>E. faecium</i> (100 %)/ <i>E. durans</i> (100 %)/ <i>E. faecalis</i> (100 %)/ <i>E. lactis</i>	<i>E. lactis</i>
LC13-1	Z	(99 %) <i>E. faecium</i> (99 %)/ <i>E. durans</i> (99 %)/ <i>E. faecalis</i> (99 %)/ <i>E. lactis</i> (99 %)	<i>E. lactis</i>
LC1	AN	<i>E. italicus</i> (98 %)	<i>E. italicus</i>
LC2	AN	<i>E. italicus</i> (98 %)	<i>E. italicus</i>
LC5	AN	<i>E. italicus</i> (98 %)	<i>E. italicus</i>
LC1	JS	<i>E. faecalis</i> (99%)/ <i>E. faecium</i> (99 %)/ <i>E. durans</i> (99 %) <i>E. lactis</i> (99 %)	<i>E. lactis</i>
<i>Lactobacillus</i>			
SO1-1	JU	<i>Lactobacillus paracasei</i> (99 %)/ <i>L. casei</i> (99 %)	<i>L. casei</i>
SI2	JU	<i>Lactobacillus paracasei</i> (99 %)/ <i>L. casei</i> (99 %)	<i>L. casei</i>
<i>Leuconostoc</i>			
LC4	JS	<i>Leuconostoc citreum</i> (100 %)/ <i>Lactobacillus plantarum</i> (100 %)	<i>L. citreum</i>
SI9	JS	<i>L. mesenteroides</i> (99 %)	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Staphylococcus</i>			
LC2	JS	<i>Staphylococcus</i> sp. (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
LC7	JS	<i>Staphylococcus</i> sp. (98 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
LC9	JS	<i>Staphylococcus</i> sp. (98 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SI2	JS	<i>Staphylococcus</i> sp. (98 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO5	JS	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (98%)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO2	JU	<i>S. warneri</i> (98 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>

SO5	JU	<i>Staphylococcus warneri</i> (99%) / <i>S. pasteurii</i> (99%)	<i>Staphylococcus</i> sp
SI1	JU	<i>Staphylococcus</i> sp (99 %)/ <i>S. pasteurii</i> (99 %)/ <i>S. pulmonis</i> (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO9	JU	<i>S. epidermis</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
SI6	JU	<i>S. warneri</i> (99 %)/ <i>S. pasteurii</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
LC8	Z	<i>Staphylococcus</i> sp (98 %)/ <i>S. warneri</i> (98 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO3	AN	<i>S. warneri</i> (99 %)/ <i>S. pasteurii</i> (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO4	AN	<i>S. warneri</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
SO6	AN	<i>S. warneri</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
SO7	AN	<i>S. warneri</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
LC3	AN	Uncultured <i>Staphylococcus</i> sp. (97 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
LC9	AN	<i>Staphylococcus</i> sp. (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SI1	AN	<i>Staphylococcus</i> sp. (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SI4	AN	<i>Staphylococcus</i> sp. (98%)	<i>Staphylococcus</i> sp
SI5	AN	<i>Staphylococcus</i> sp. (98 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SI11	AN	<i>Staphylococcus</i> sp. (97 %)/ <i>S. warneri</i> (97 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO1	CL	<i>S. warneri</i> (99 %)/ <i>S. pasteurii</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp
SO3	CL	<i>S. warneri</i> (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
SO10	CL	<i>S. warneri</i> (99 %)/ <i>P. pulmonis</i> (99 %)	<i>Staphylococcus warneri</i>
LC1	CL	<i>S. warneri</i> (99 %)/ <i>S. pasteurii</i> (99 %)/ <i>P. pulmonis</i> (99 %)	<i>Staphylococcus</i> sp.

LC: leite cru; SO: solo; SI: silagem

4.2.1. PCR *primers* universais e sequenciamento do gene 16S rDNA

Para a análise de PCR utilizando *primers* universais, todos os isolados apresentaram banda no tamanho de 1500 pb, correspondendo a uma amplificação do gene 16S rDNA. Os isolados que não apresentaram banda e/ou banda inespecífica tiveram o DNA amplificado novamente pelos *primers* W001 e W002.

O sequenciamento dos genes 16S rDNA gerou resultados satisfatórios na maioria das vezes. Assim pôde-se analisar os dados com auxílio do logiciel VectorNTI/Invitrogen. Quando as sequências obtidas foram muito pequenas ou quando a porcentagem de similaridade com os dados de base do GenBank/NCBI foi baixa (< 97 %), nova amplificação foi realizada para um novo sequenciamento.

4.2.2. PCR espécie-específica

Primers espécies- específicos ou gêneros-específicos foram utilizados para amplificação do DNA cromossômico dos isolados após indicação de possíveis gêneros/espécies por meio da técnica de sequenciamento 16S rDNA. Na Tabela 9 apresenta-se os resultados das análises de PCR para cada isolado.

De acordo com a Tabela 9, observamos uma diversidade de espécies, porém em alguns casos, há identificações imprecisas para as espécies do gênero *Staphylococcus*. q-PCR foi realizada somente para as cepas de *S. warneri*, pois foram as espécies mais encontradas dentro deste gênero. Desta forma, foram obtidos dos 50 isolados por PCR espécie-específica 11 *L. lactis*, 2 *L. garvieae*, 5 *E. lactis*, 3 *E. italicus*, 2 *L. paracasei*, 1 *L. mesenteroides*, 1 *L. citreum*, 14 *S. warneri* e 11 *Staphylococcus* sp.

Dentre as 50 cepas analisadas pela PCR espécie-específica, 25 pertencem ao grupo de bactérias lácticas e 25 ao gênero *Staphylococcus*. Os diferentes gêneros encontrados distribuíram-se de forma variada entre os 3 ecossistemas analisados (Figura 2).

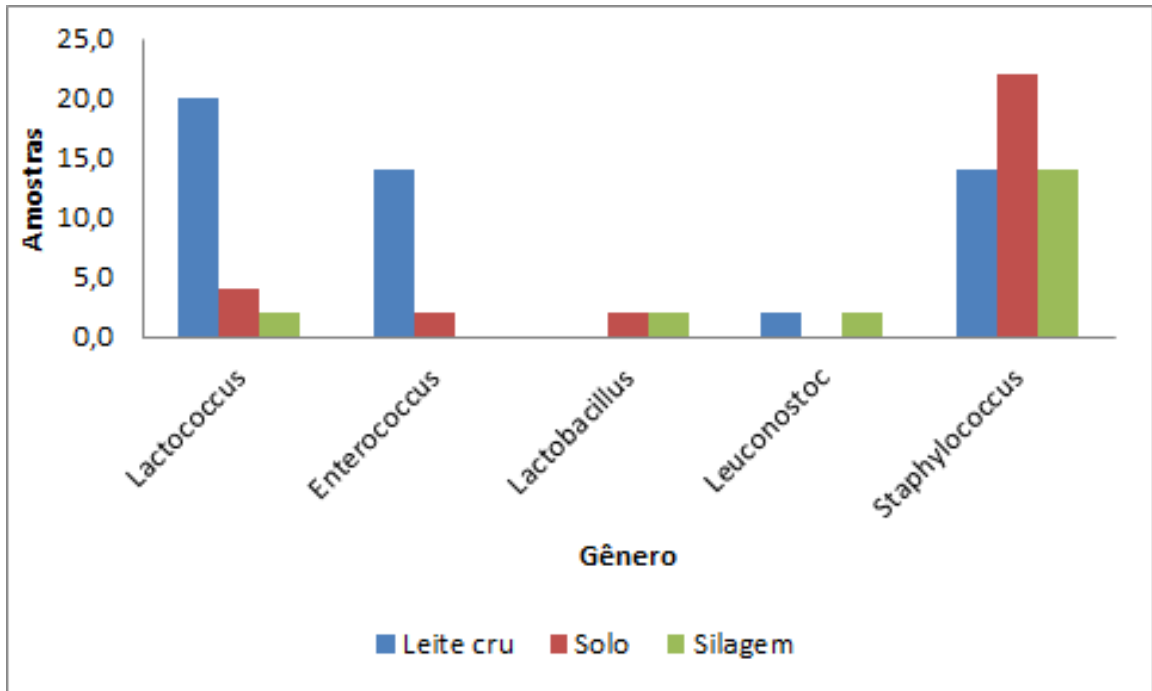


Figura 2: Distribuição dos gêneros encontrados nos diferentes ecossistemas (porcentagem)

As bactérias lácticas mesófilas dominantes nas diferentes ecossistemas pertencem aos gêneros *Lactococcus* (52 %), *Enterococcus* (32 %), *Lactobacillus* (8 %) e *Leuconostoc* (8 %) (Figura 3). As LAB foram principalmente encontradas em leite cru (72 %), e em menor proporção no solo (12 %) e silagem (12 %) (Figura 4).

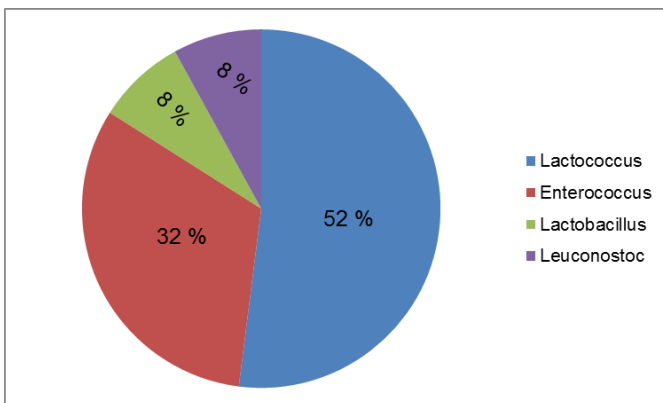


Figura 3: Distribuição dos gêneros de BAL encontrados nas diferentes ecossistemas (%)

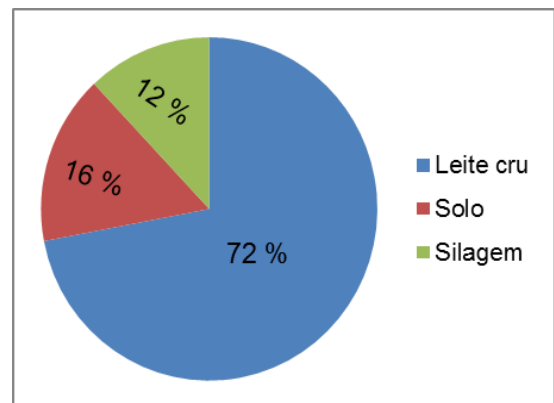


Figura 4: Distribuição de bactérias lácticas encontradas nas diferentes ecossistemas (%)

Lactococcus spp. foi o gênero dominante de LAB encontrado nas amostras avaliadas, principalmente isolado de leite cru (77 %). Resultados similares foram observados por Ouadghiri et al. (2008) em estudo realizado com leite cru e queijo no Marrocos. Os pesquisadores identificaram 16 espécies diferentes de BAL, sendo o gênero *Lactococcus* encontrado em maior proporção, como nesta pesquisa. A espécie mais frequentemente encontrada foi *L. lactis*, seguida de *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Franciosi et al. (2009) investigaram a biodiversidade e o potencial tecnológico de BAL isoladas de leite cru na Itália. Seus resultados corroboram os resultados deste estudo, onde quatro principais gêneros de BAL foram encontrados, sendo o gênero *Lactococcus* encontrado em maior número. O grupo mais heterogêneo foi constituído por cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, que apresentaram nível de similaridade de somente 25,2 %, mostrando alta diversidade dentro desta subespécie.

Lafarge et al. (2004) sugerem que a microbiota dominante do leite cru é representada pelos gêneros de LAB *Lactococcus* e *Lactobacillus* e em menor número por micro-organismos dos gêneros *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Seus resultados corroboram, em partes, os resultados do presente trabalho, já que o gênero *Lactobacillus* representou somente 8 % dos isolados encontrados.

Lactococcus lactis foi a espécie predominante isolada neste estudo, encontrada principalmente no leite. Estes resultados corroboram os resultados de Zamfir et al. (2006), que estudaram a biodiversidade de BAL em leite e produtos lácteos na Romênia. A espécie mais encontrada nas amostras estudadas pertencia à espécie de *L. lactis*, sendo encontradas também espécies de *Enterococcus durans* e *Leuconostoc mesenteroides*. No presente trabalho, mesmo não tendo sido encontrada a espécie *E. durans*, outras espécies deste diversificado gênero foram encontradas, como *E. lactis* e *E. italicus*.

Na natureza, *L. lactis* são encontrados em plantas ou no trato gastrointestinal e superfície de animais. Acredita-se que estes micro-organismos estejam presentes em superfícies de plantas e multiplicam-se no trato gastrointestinal depois de serem ingeridos por ruminantes. Em contraste,

espécies “domesticadas” de *L. lactis*, usadas pela indústria láctea como *starters* na fermentação de queijos, vivem em um nicho diferente, e foram selecionadas por sua rápida multiplicação e produção de ácido láctico no leite (Bolotin et al., 2012).

L. lactis é reconhecido como um micro-organismo seguro (GRAS) sendo o constituinte primário de muitas culturas *starters* – industrial e artesanal – usados na produção de um grande número de produtos lácteos fermentados, incluindo leites fermentados, queijos frescos e macios e vários tipos de queijos duros (Pogacic et al., 2011). Diversos autores descrevem a presença de *L. lactis* em queijos artesanais feitos a partir de leite cru (Van Hoorde et al., 2008; De Freitas et al., 2007). Estudo realizado por Gutiérrez-Méndes (2008), foi avaliado a formação de aroma por cepas de *L. lactis* isoladas de diferentes ecossistemas: queijo feito com leite cru, fontes não lácteas e culturas *starters* comerciais. As cepas isoladas de queijo ou culturas *starters* apresentaram maior atividade proteolítica e fermentação mais rápida da lactose que aquelas isoladas de fontes não lácteas. Além disso, estas cepas também apresentaram melhor utilização do citrato. Assim, ambientes lácteos como leite cru ou queijos feitos a partir deste leite parecem ser as melhores escolhas para o isolamento de novas cepas de *L. lactis* com características tecnológicas desejáveis (Gutiérrez-Méndes et al., 2010).

Neste estudo, também foi encontrado espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*, isoladas principalmente do leite cru. Estes micro-organismos são ubiquamente encontrados tanto na microbiota intestinal de humanos como na de animais (Facklam et al., 2002). Em estudo realizado por Kagkli et al. (2007), foi verificado que a principal fonte de contaminação do leite cru nas fazendas por cepas de *Enterococcus* spp. não eram proveniente das fezes dos ruminantes, e sim do equipamento de ordenha e dos tanques de armazenamento do leite, provavelmente pela capacidade que estes micro-organismos têm de formar biofilmes em diferentes superfícies que entram em contato com alimentos (Mohamed e Huang, 2007).

Micro-organismos deste gênero encontrados em alimentos geram algumas controvérsias. Eles estão presentes como parte da microbiota

natural em produtos lácteos, onde apresentam efeitos benéficos como proteção e características sensoriais (Giraffa, 2003). Por outro lado, o gênero *Enterococcus* é de especial relevância médica já que atualmente é considerado um patógeno humano oportunista emergente, sendo constantemente relatado como causador de infecções hospitalares (Morandi et al., 2006)

Neste estudo foram identificadas duas espécies deste gênero: *Enterococcus lactis* e *E. italicus*. Bactérias pertencentes a este gênero são conhecidas por produzirem bacteriocinas (Hadji-Sfaxi et al., 2012), fato este confirmado no estudo realizado por Raykova et al. (2009). A bacteriocina produzida pela cepa de *E. lactis* EN5 mostrou um amplo espectro de atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas, tendo uma forte inibição contra as bactérias do primeiro grupo.

As cepas de *E. italicus* foram encontradas somente em leite cru, proveniente da mesma fazenda. Esta espécie foi identificada pela primeira vez em um estudo de população bacteriana natural usada na produção de queijos artesanais na Itália (Fortina et al. 2003). Estudos moleculares revelaram a nova espécie nomeada *E. italicus* sp. Nov (Fortina et al., 2004). Pesquisas focalizando o potencial biotecnológico de *E. italicus* foram realizadas por Fortina et al. (2008). As cepas apresentaram características relacionadas ao uso como culturas adjuntas na produção de queijos artesanais. Além disso, as cepas de *E. italicus* foram associadas com perfis de baixa virulência, o que resulta em um baixo risco de saúde dentro da nova espécie.

Por meio das análises de PCR espécie-específica, 9 espécies foram encontradas nas diferentes amostras. *Enterococcus lactis* e *Lactococcus lactis* foram as espécies dominantes de LAB, presentes em mais da metade das fazendas visitadas. Enterococos e lactococos estavam presentes no leite cru em uma concentração de 77 % e 88 %, respectivamente.

Já para os isolados pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, estes foram encontrados principalmente na terra (44 %), e em igual número nas amostras de leite (28 %) e silagem (28 %) (Figura 3).

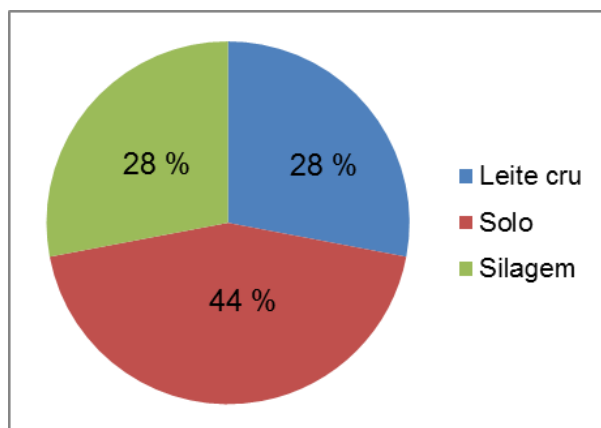


Figura 3: Distribuição de bactérias do gênero *Staphylococcus* encontradas nas diferentes amostras (%)

A população microbiana presente no leite cru inclui bactérias de relevância tecnológica, como as bactérias lácticas. Este grupo de micro-organismos pode contribuir para futuras reações de fermentação, como nos queijos Pecorino Siciliano (Vernille et al., 2008), de origem italiana e o de origem francesa Ossau-Iraty (Feutry et al., 2012), e o leite desnatado fermentado “Iben”, de origem marroquina (Ouadghiri et al., 2008). Entretanto, bactérias deterioradoras podem ter consideráveis efeitos negativos na qualidade do leite e de produtos lácteos (Cousin, 1982). A presença de patógenos também pode gerar problemas severos de saúde (Quigley et al., 2011), como demonstra os pesquisadores Hill et al. (2012), que encontraram, mesmo em pequeno número, patógenos dos gêneros *Staphylococcus*, *Listeria* e *Campylobacter*, no leite cru da Nova Zelândia.

Ercolini et al. (2009) realizaram um estudo de identificação molecular de bactérias mesófilas e psicrotólicas em leite cru em uma região no sul da Itália. *Pseudomonas* spp. foi o principal contaminante entre as bactérias Gram negativas. Isolados Gram positivos pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e *Lactococcus* foram os principais micro-organismos presentes nas amostras de leite cru.

A elevada prevalência de *Staphylococcus* spp. no leite pode ser devido a uma possível falta de higienização tanto dos manipuladores quanto dos utensílios utilizados no ambiente de ordenha. Além das condições de higiene durante a ordenha, a temperatura de estocagem do leite, sem

refrigeração adequada, seria um importante fator para a multiplicação destes micro-organismos no leite cru.

As espécies do gênero *Staphylococcus* estão disseminadas no ambiente de forma ubiqüitária, com um número específico de espécies que habitam nichos ecológicos (Soares et al., 2011). Estes micro-organismos, encontrados naturalmente na pele e mucosas de animais de sangue quente, foram encontrados como contaminantes em grande número amostras de leite cru, ar de sala de ordenha, feno, poeira e superfície de tetos em um estudo realizado por Vacheyrou et al. (2011). Estes pesquisadores estudaram a comunidade microbiana em leite cru e a potencial transferência de micro-organismos dos estábulos para o leite em fazendas francesas. Esses autores concluíram que além da contaminação ambiental existir, a superfície dos tetos são as principais fontes de contaminação do leite cru. Por isso, é sempre importante ressaltar que as condições de produção, em particular práticas de higiene nas fazendas, influenciam a qualidade e a quantidade de carga microbiana do leite cru (Lafarge et al., 2004).

Entre os isolados de *Staphylococcus* spp, *S. warneri* foi a principal espécie encontrada (56 %). Resultados similares foram encontrados por Lafarge et al. (2004) que estudaram a população microbiana do leite cru em uma região na França. Dentre as espécies do gênero *Staphylococcus*, *S. warneri* foi encontrada com mais frequência nas amostras de leite. Apesar de infecção com esta espécie ser rara, em comparação com a espécie *S. aureus*, casos de infecções em hospedeiros imunocomprometidos tem aumentado gradualmente (Otto, 2004). Em 2010 foi registrado o primeiro caso de meningite humana causada por *S. warneri* em uma paciente venezuelana. A doença foi tratada por meio de antibióticos (Incani et al., 2010).

Micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* foram encontrados em pequena quantidade nas diferentes amostras avaliadas.

4.2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis

A diversidade clonal para os isolados dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* foi determinada pela técnica PFGE (Tabela 11).

Tabela 11: cepas utilizadas para análise PFGE

Cepas	PCR espécie-específica	Origem	Fazenda	Identificação no gel (PFGE)
SO11-2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Solo	J	A
LC7-1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	J	B
LC1-1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JU	C
LC1-2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JU	D
LC3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JU	E
LC4-2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JU	F
LC5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JU	G
LC5-1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JS	H
LC5-2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JS	I
LC8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite	JU	J
SO2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Solo	J	L
SI9	<i>Lactococcus garvieae</i>	Silagem	AN	N
LC5	<i>Lactococcus garvieae</i>	Leite	CL	O
LC5-2	<i>Enterococcus lactis</i>	Leite	J	P
SO1-2	<i>Enterococcus lactis</i>	Solo	JU	Q
LC5-1	<i>Enterococcus lactis</i>	Leite	Z	R
LC13-1	<i>Enterococcus lactis</i>	Leite	Z	S
LC1	<i>Enterococcus lactis</i>	Leite	JS	T
LC1	<i>Enterococcus italicus</i>	Leite	AN	U
LC2	<i>Enterococcus italicus</i>	Leite	AN	V
LC5	<i>Enterococcus italicus</i>	Leite	AN	X

A cepa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, SO2J (Tabela 10), foi a única subespécie “cremoris” encontrada, provavelmente devido ao meio de cultura utilizado para isolamento não ser o indicado para esta espécie microbiana. Por isso a análise de PFGE foi realizada para esta cepa, mas ela não aparece no dendrograma (Figura 8).

Para a análise das cepas de *L. lactis*, a enzima de restrição *Sma*I (Figura 6) clivou com maior frequência o DNA cromossomal que a enzima

NotI, produzindo de 10 a 12 fragmentos cromossomais. Resultados semelhantes, onde a enzima *SmaI* foi mais eficiente que a *NotI* foram encontrados por Kahaka et al. (2008), em um estudo realizado com bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*. *SmaI* produziu de 10 a 20 fragmentos cromossomais enquanto que o número de fragmentos obtidos com *NotI* variou entre 3 e 10.

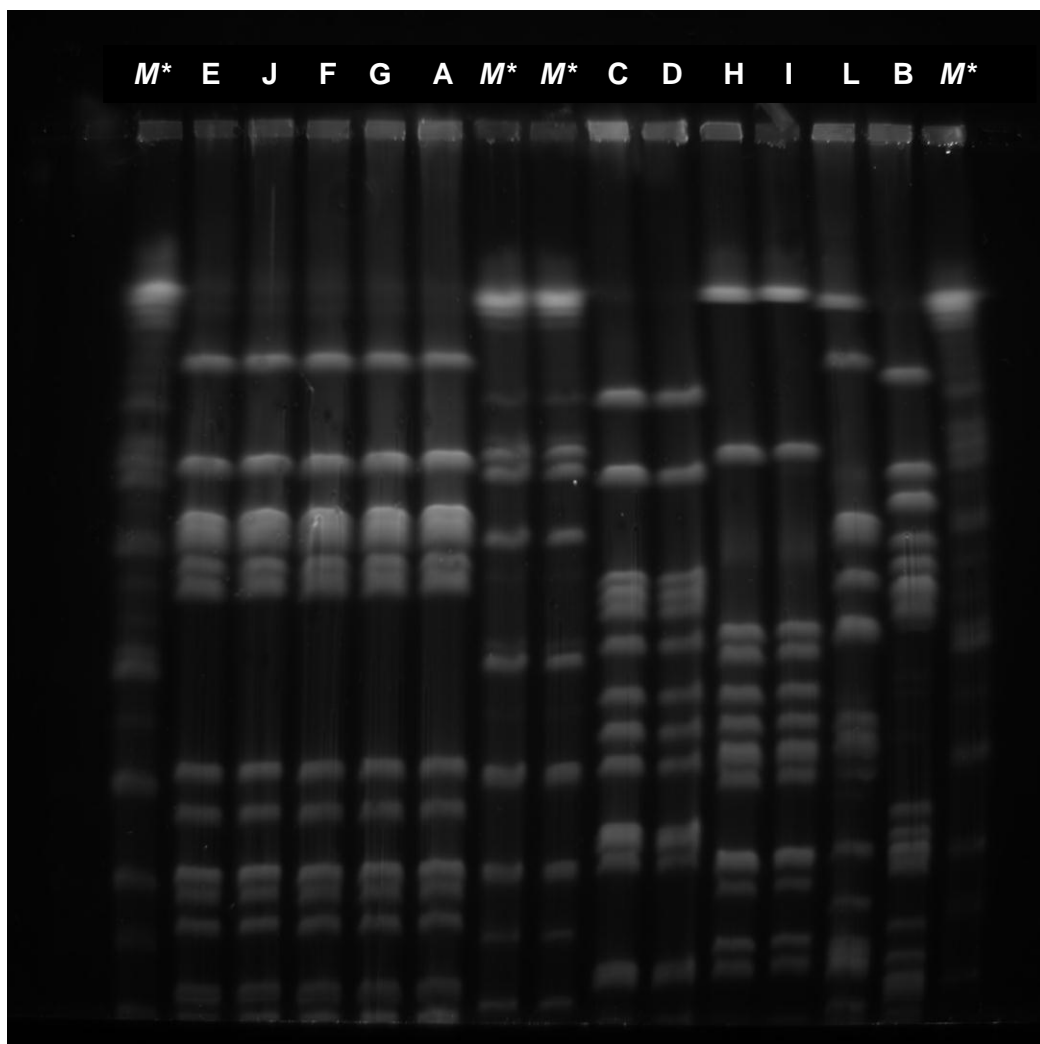


Figura 6: Gel de eletroforese dos produtos da PFGE dos isolados de *Lactococcus lactis* submetidos a restrição com a enzima *SmaI*.

M*: marcador

Para a análise das cepas de *Enterococcus* e *L. garvieae*, foram testadas ambas as enzimas, *SmaI* e *Apal*. *Apal* mostrou bom resultado para as cepas de *Enterococcus*, porém, para as cepas de *L. garvieae*, esta enzima não gerou fragmentos suficientes para comparação. Doulgeraki et al.

(2010) avaliaram a diversidade de BAL durante a estocagem de carne de boi fatiada por meio da técnica de PFGE utilizando as enzimas de restrição *SmaI* e *ApaI*. Os autores observaram que esta enzima promoveu melhor distribuição de bandas que *SmaI*. No entanto, os micro-organismos analisados pertenciam aos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Em ambas as análises de PFGE (Figuras 6 e 7), a enzima de restrição utilizada foi a enzima *SmaI*, que gerou resultados mais confiáveis para interpretação dos dados. Já para o marcador, a enzima utilizada foi a *XbaI*, que cliva melhor o DNA de bactérias do gênero *Propionibacterium*. O amplo uso da enzima *SmaI*, utilizada em análises de PFGE pode ser observado em outros trabalhos, com BAL e outros gêneros de bactérias (Bravo et al., 2010 ; Kahala et al., 2008 ; Leroy et al., 2007).

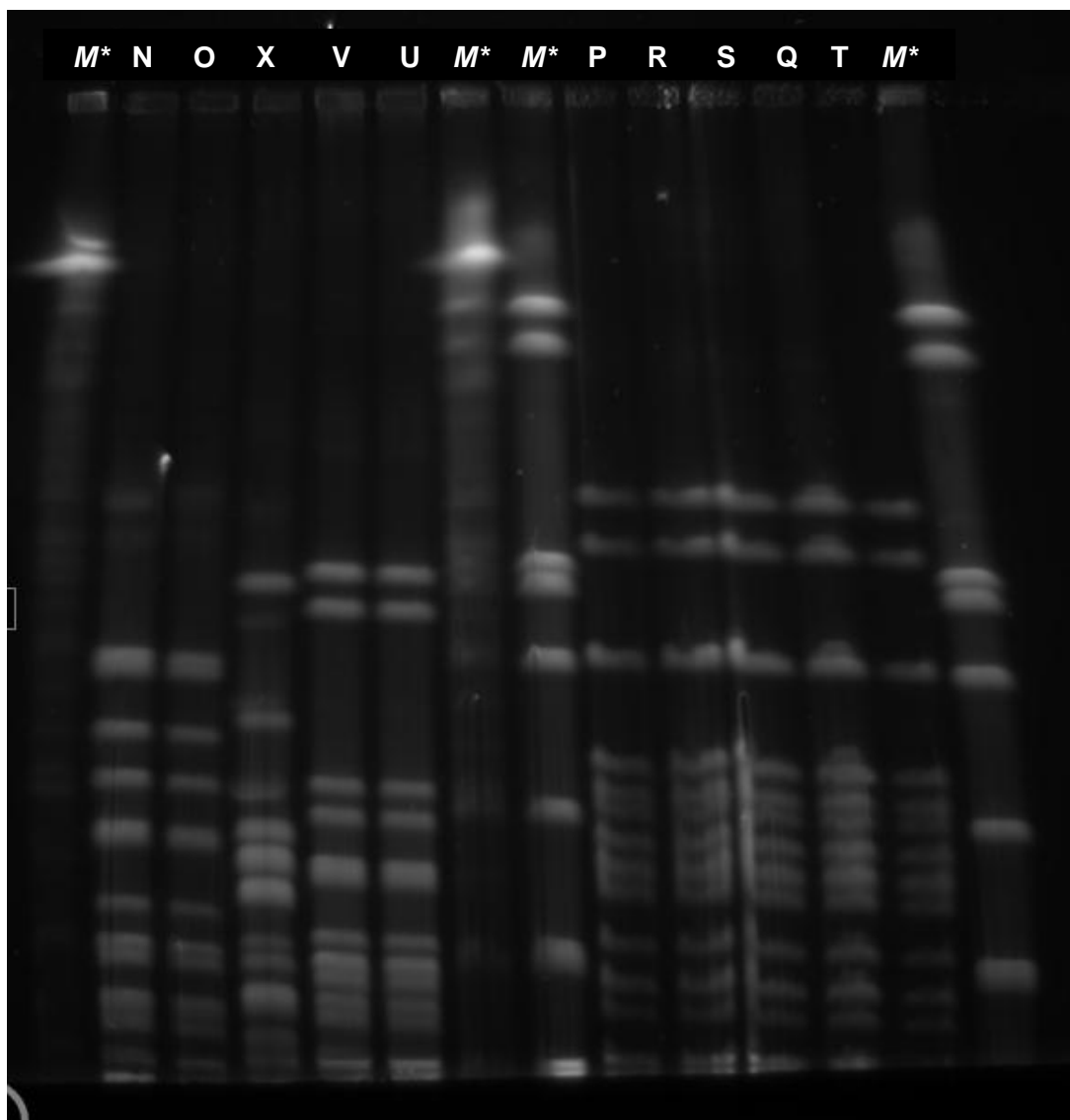
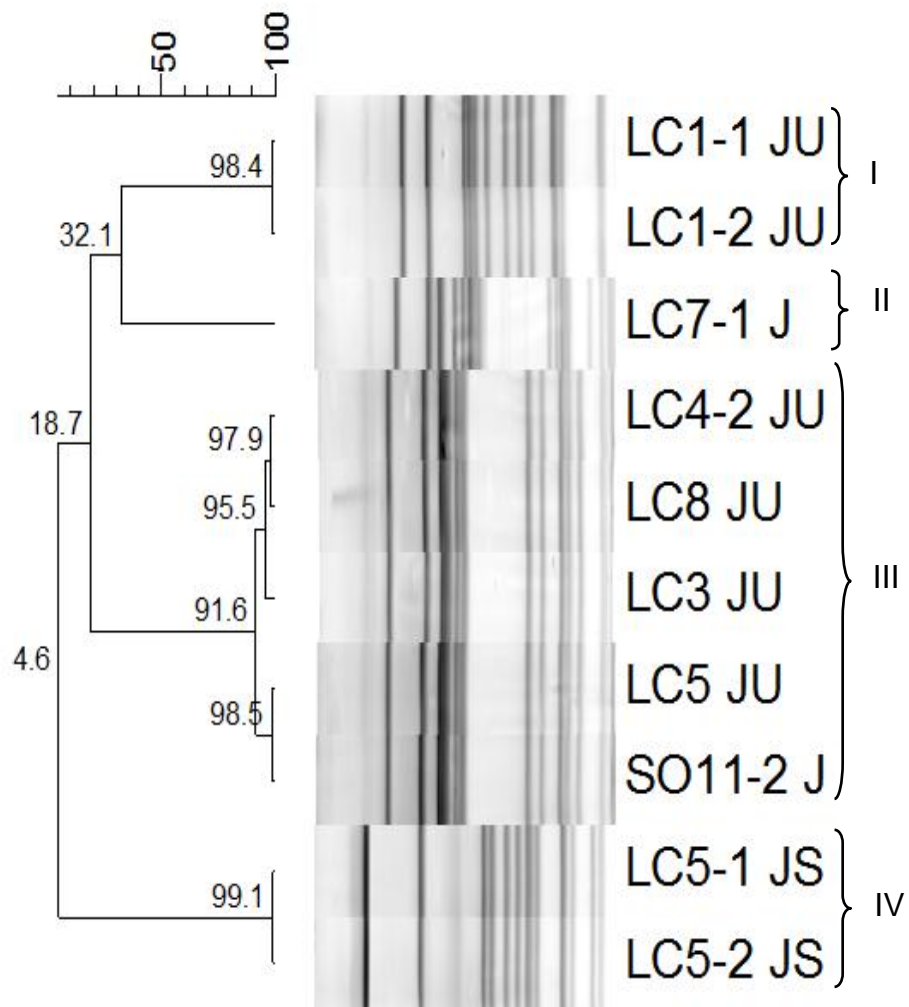


Figura 7: Gel de eletroforese dos produtos da PFGE dos isolados de *Lactococcus garvieae* e *Enterococcus* spp. submetidos a restrição com a enzima *SmaI*.

M*: marcador

Por meio das análises dos géis de PFGE de todas as amostras pelo logiciel Bionumeric (Applied Maths, Belgium), construiu-se um dendrograma de similaridade baseado no polimorfismo dos fragmentos de restrição. Os dendrogramas (Figuras 8a e 8b) permitiram verificar a similaridade e a variabilidade genética entre os isolados da mesma espécie; dos diferentes gêneros analisados. Similaridades foram calculadas como relação de Pearson e os agrupamentos dos perfis de restrição foram feitos utilizando o algoritmo UPGMA.



a

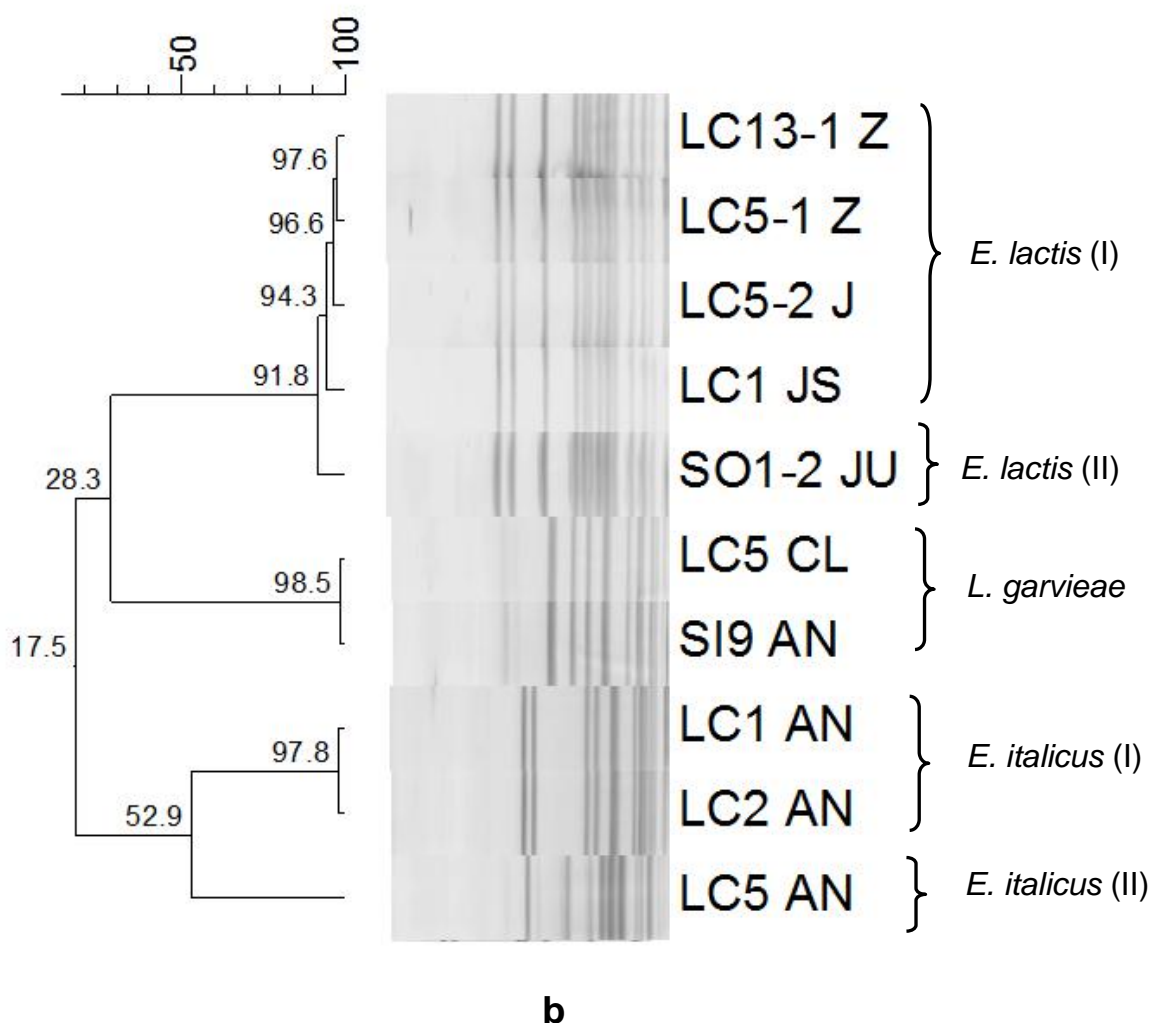


Figura 8: Diversidade genotípica entre os isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (a), *E. lactis*, *L. garvieae* e *E. italicus* (b). Os padrões foram gerados pela PFGE após digestão com as enzimas de restrição *SmaI* e *XbaI*.

Por meio das análises de PFGE para as cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* observou-se importante diversidade clonal, visto que as 10 cepas analisadas foram agrupadas em 4 diferentes *clusters*, com as diferenças segundo as fazendas de origem. Mesmo com um pequeno número de isolados, pode-se observar que a variabilidade ocorreu entre as diferentes propriedades, mostrando uma heterogeneidade dentro da subespécie *lactis*. Em um estudo feito por Delgado e Mayo (2004), com amostras coletadas de diferentes fazendas produtoras de queijo sem adição de cultura *starter*, 24 espécies de *L. lactis* foram encontradas, sendo distribuídas em 14 diferentes

clusters. Este estudo mostra a grande diversidade de lactococos selvagens encontrada em amostras como leite e queijo feito a partir de leite cru.

Esta ampla diversidade clonal de *L. lactis* é influenciada pela fonte de isolamento, e as características tecnológicas que estas espécies apresentam estão vinculadas ao ecossistema que habitam (Gutiérrez-Méndez et al., 2010). Novas perspectivas com os estudos de lactococos selvagens isolados de leite cru e vegetais estão sendo criadas, porque algumas cepas selvagens produzem *flavors* incomuns ou altas quantidades de componentes voláteis; em maior quantidade que aquelas cepas usadas comercialmente como culturas *starters* (Gutiérrez-Méndez et al., 2008). Esta diversidade clonal de *L. lactis*, já mostrada em vários trabalhos (Pogacic et al., 2011; Gutiérrez-Méndez et al., 2010; Passerini et al., 2010), aumenta o interesse em explorar novas cepas para o aperfeiçoamento de características sensoriais em produtos lácteos específicos (Torrez-Llanez, et al., 2006).

A análise da PFGE das cepas de *Enterococcus lactis* mostrou apenas uma diferença clonal, agrupando 4 isolados em um mesmo *cluster* (I) e 1 isolado o *cluster* II. O *cluster* I agrupou todos os isolados provenientes do leite cru, e a única cepa proveniente do solo mostrou um perfil de bandas diferenciado (*cluster* II). Nota-se que os isolados do leite cru são originários de três propriedades diferentes, e mesmo assim foram agrupadas em um mesmo *cluster*. Isto mostra que esta cepa é autóctone, e está distribuída em toda a região. O mesmo foi identificado para as cepas de *L. garvieae*, que se agruparam num mesmo *cluster*, mesmo pertencendo a fontes e fazendas diferentes. As 3 cepas de *E. italicus*, todas originárias do leite cru da mesma fazenda, foram agrupadas em 2 *clusters*.

Para as cepas de *E. lactis* e *L. garvieae*, uma proposição seria testar uma outra enzima de restrição, considerando que a enzima *SmaI* não tenha tido suficiente poder discriminatório para separar possíveis diferentes cepas.

4.2.4. Multilocus Sequence Typing

A técnica MLST foi realizada com um total de 20 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* oriundas do Brasil e da Coleção de Culturas do CIRM-BIA/França. Com auxílio das ferramentas disponíveis na Home Page MLST-*Lactococcus lactis* foi possível analisar as sequências de cada isolado para os 5 genes. Para cada isolado, um número correspondente (alelo tipo) para cada gene foi encontrado e, conseqüentemente, sua sequência tipo (Tabela 12).

Tabela 12: Número alelo de cada *loci* e sua sequência tipo para cada um dos isolados de *L. lactis* subsp. *lactis*

Cepa	AT					ST
	pgk	glyA	recN	bcaT	pdp	
LC1-1 JU	6	4	6	4	3	14
LC1-2 JU	6	4	6	4	3	14
LC3 JU	14	8	19	8	17	36
LC4-2 JU	14	8	19	8	17	36
LC5-1 JS	5	1	1	1	1	15
LC5-2 JS	5	1	1	1	1	15
LC5 JU	14	8	19	8	17	36
LC7-1 J	14	12	14	8	9	37
LC8 JU	14	8	19	8	17	36
SO11-2 J	14	8	19	8	17	36
235	10	14	20	1	6	38
237	3	15	2	2	2	39
243	3	2	2	2	2	40
44	3	15	2	2	2	39
47	1	1	1	1	1	6
633	3	1	1	1	1	41
644	14	16	21	8	3	42
646	17	1	1	11	1	43
648	3	17	3	2	18	44
88	5	1	1	1	1	15

Passerini et al. (2010) validaram um total de 35 ST na pesquisa realizada com 58 isolados de *L. lactis* subsp. *lactis*.

Neste trabalho, cada sequência de números foi comparada com a sequência já encontrada por Passerini et al. (2010) e quando as sequências foram as mesmas, elas receberam o número ST já existente. Porém, 14 cepas (6 cepas do Brasil/8 cepas da França) apresentaram sequências diferentes, então foram atribuídos novos números ST para essas cepas, o que gerou 9 novos STs (ST: 36 a 44). As cepas analisadas distribuíram-se em 12 STs. Oito dos 12 ST incluíram apenas uma única cepa e os outros 4 STs continham entre 2 e 5 cepas (Tabela 12), sendo o ST 36 o mais representativo, incluindo o maior número de cepas. Os 12 STs, foram distribuídos em 7 únicos ST (ST único) e 2 complexos clonais (Figura 9). O principal complexo clonal CC1 incluiu 3 STs (correspondente a 5 isolados) com o ST 15 identificado como o genótipo ancestral, de acordo com o estudo realizado por Passerini et al. (2010). Enquanto que o segundo complexo clonal CC2 incluiu apenas 2 STs (correspondente a 3 isolados). Na Figura 9 é possível observar o quão próximas ou distantes são as linhagens analisadas. As cepas pertencentes aos ST do CC1 (separadas por linhas contínuas) diferem-se em apenas 1 locus (Tabela 12), ocorrendo da mesma forma para o CC2. O ST 43 não faz parte do CC1, mas ele se difere em apenas 2 loci (linha pontilhada). Todos os STs restantes se diferem um dos outros por 3 a 5 loci, sugerindo um alto grau de diversidade genética entre os isolados correspondentes.

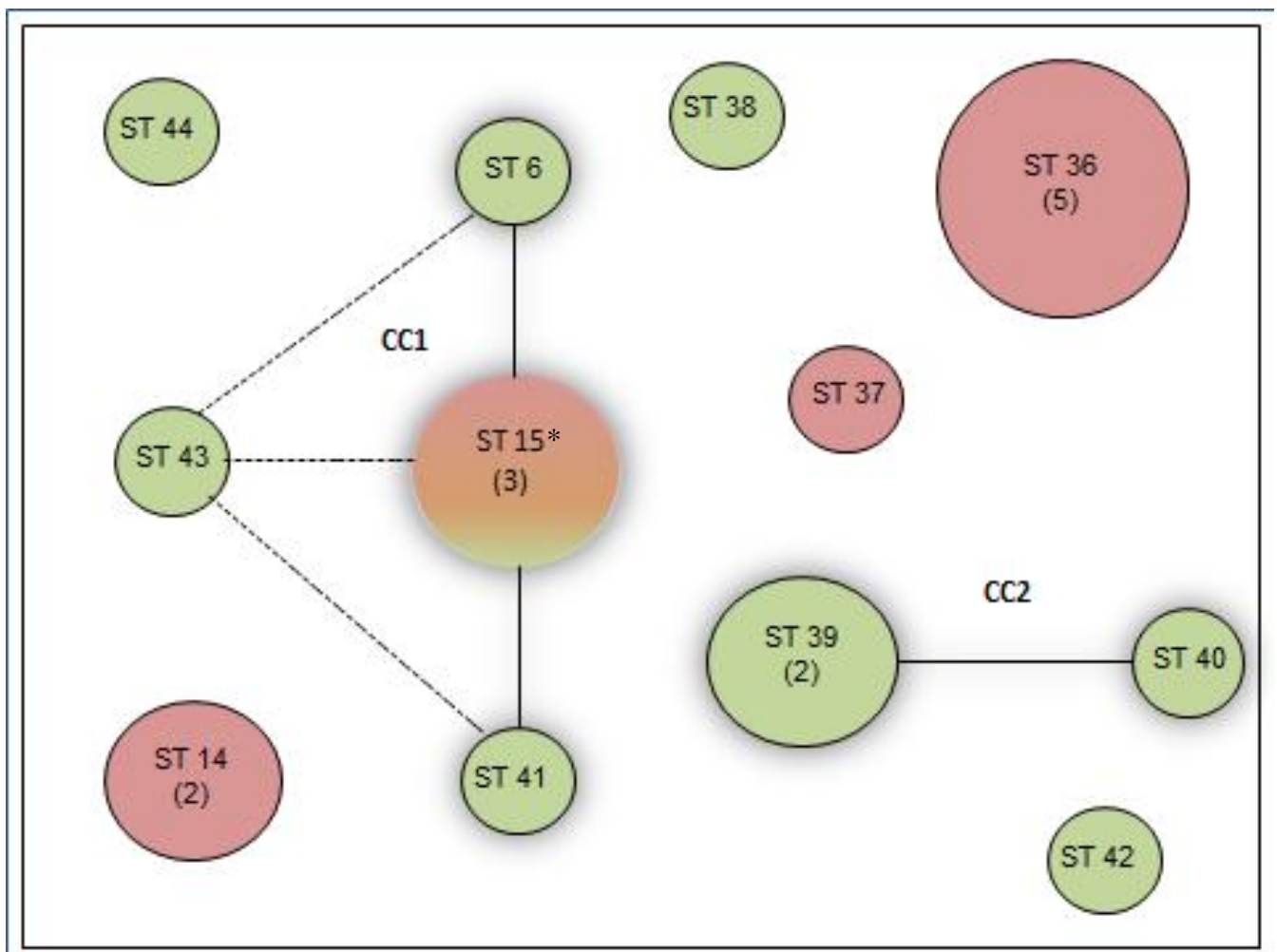


Figura 9: Análise eBurst das 20 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*.

Círculos rosas correspondem às espécies isoladas no Brasil. Círculos verdes correspondem às espécies da Coleção de Culturas CIRM-BIA/França.

*: Duas espécies oriundas do Brasil e uma espécie da Coleção CIRM-BIA.

Linhas sólidas entre cada círculo indicam que os STs compartilham 4 dos 5 loci. Linhas pontilhadas indicam que os STs compartilham 3 dos 5 loci.

Complexos clonais (CC) são indicados em cinza.

Neste estudo, apenas uma cepa foi isolada do solo (SO11-2J:ST 36). Todas as outras foram isoladas de leite cru ou de produtos lácteos. Mesmo que o ecossistema seja o mesmo, percebe-se que a diversidade entre os isolados é elevada, o que pode ser confirmado também pela técnica PFGE (Figuras 8a e 11). *L. lactis* subsp. *lactis* tem uma grande capacidade de colonizar diferentes ecossistemas, incluindo várias fontes ambientais. Esta elevada habilidade está associada a uma maior diversidade genômica dentro da subespécie *lactis*, como observado neste trabalho e em outros estudos (Fernandez et al., 2011; Nomura et al., 2006). Além disso, a subespécie

lactis produz a bacteriocina nisina (Pieper et al., 2010), que possui amplo espectro de ação principalmente contra Gram positivos (Kopermsub et al., 2012)

A técnica MLST possui o diferencial de permitir identificar a cepa ancestral (selvagem), que ainda não sofreu modificação ou adaptação aos ecossistemas. Duas cepas brasileiras (LC5-1 JS e LC5-2 JS) e uma cepa da Coleção CIRM-BIA (88: isolada de kefir, URSS) pertencem ao ST 15 reconhecido como o ancestral no trabalho de Passerini et al. (2010).

O poder discriminatório das técnicas MLST e PFGE foi comparado. A técnica PFGE agrupou as 20 cepas em 13 *clusters* (Figura 12). As cepas isoladas no Brasil foram agrupadas em 4 diferentes *clusters* (Figura 8a) e as cepas da Coleção CIRM em 9 *clusters* (Figura 11). A técnica MLST agrupou as 20 cepas em 12 ST. As cepas isoladas no Brasil foram distribuídas em 4 diferentes ST (14; 15; 36; 37). Porém, o ST 15, considerado o ancestral, agrupou também uma cepa da coleção CIRM-BIA. O esquema MLST permitiu agrupar em um mesmo ST (ST 39) 2 cepas CIRM: 44 e 237. Estes 2 agrupamentos não foram observados na PFGE. Todavia, diferente da análise MLST, a PFGE agrupou em um mesmo *cluster* as cepas 235 e 243, que pela MLST foram agrupadas nos ST 38 e 40, respectivamente.

A PFGE permitiu evidenciar maior variabilidade dentro da subespécie *lactis*. Porém, esta técnica é dependente da clivagem do DNA por uma enzima de restrição, e a escolha desta enzima é um ponto crítico desta análise. Muitas vezes é necessário repetir esta análise com mais uma ou mais enzimas para ter certeza do resultado. A MLST, por caracterizar os alelos presentes nos diferentes loci dos genes *housekeeping*, mostra-se altamente discriminatória e confiável. O esquema utilizado neste estudo foi validado com 6 loci uniformemente distribuídos ao longo do cromossomo da cepa de referência de *L. lactis subsp. lactis* (IL1403), estudada por Passerini et al. (2010). Estes genes, como não sofrem mutação ao longo da evolução ou da adaptação a novos ecossistemas, fornecem dados inequívocos para comparação de cepas bacterianas. É importante ressaltar que 2 dos loci estudados (*recN* e *glyA*) pertencem ao conjunto de genes identificados como os melhores preditores de parentesco do genoma total bacteriano (Zeigler, 2003).

É importante observar que a técnica MLST, além de ser útil para o estudo de identificação e caracterização microbiana, é uma poderosa ferramenta para o estudo filogenético (Figura 10).

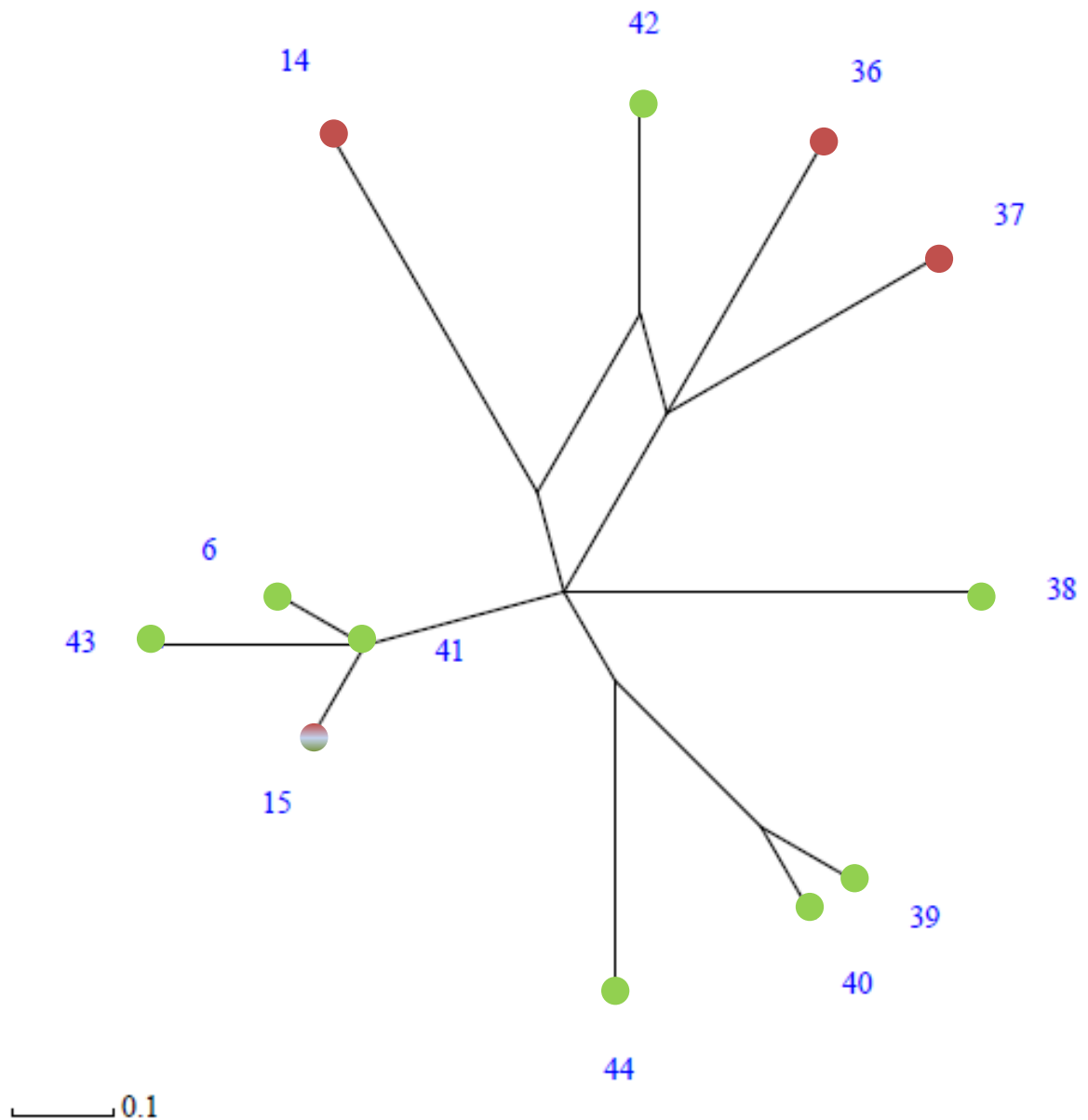


Figura 10: Relação filogenética entre as cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*

Esta técnica permite saber qual cepa está mais próxima da cepa ancestral e qual está mais evoluída. Para uso tecnológico, esta é uma

informação importante, pois permite a escolha de uso de cepas selvagens para própria adaptação ou de cepas já adaptadas a determinado ecossistema. Pode-se relacionar também cada ST como uma característica tecnológica específica, o que seria interessante para indústrias que trabalham com culturas *starters*.

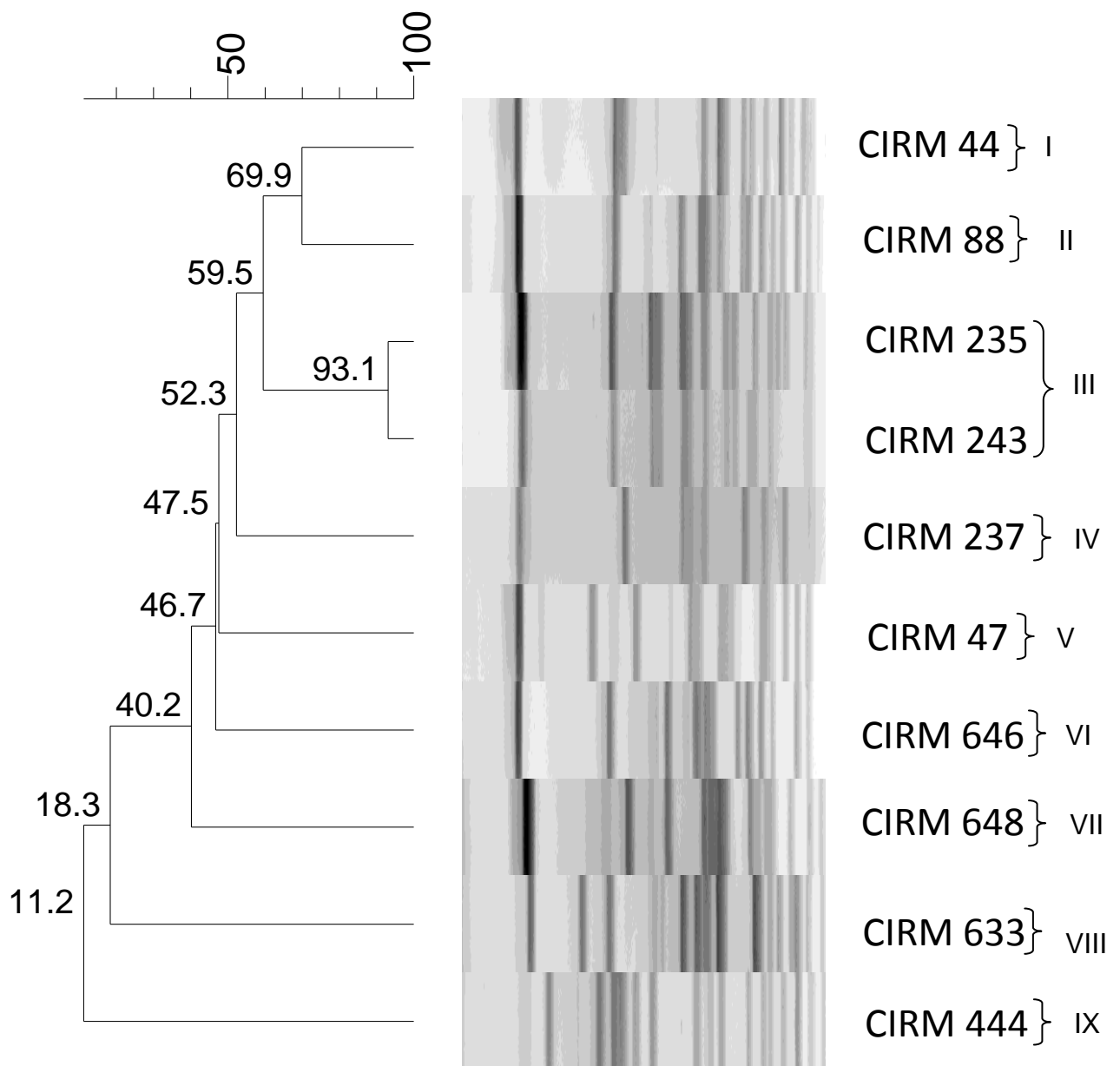


Figura 11: Diversidade genotípica entre os isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pertencentes a coleção CIRM/França. Os padrões foram gerados pela PFGE após digestão com as enzimas de restrição *SmaI* e *XbaI*.

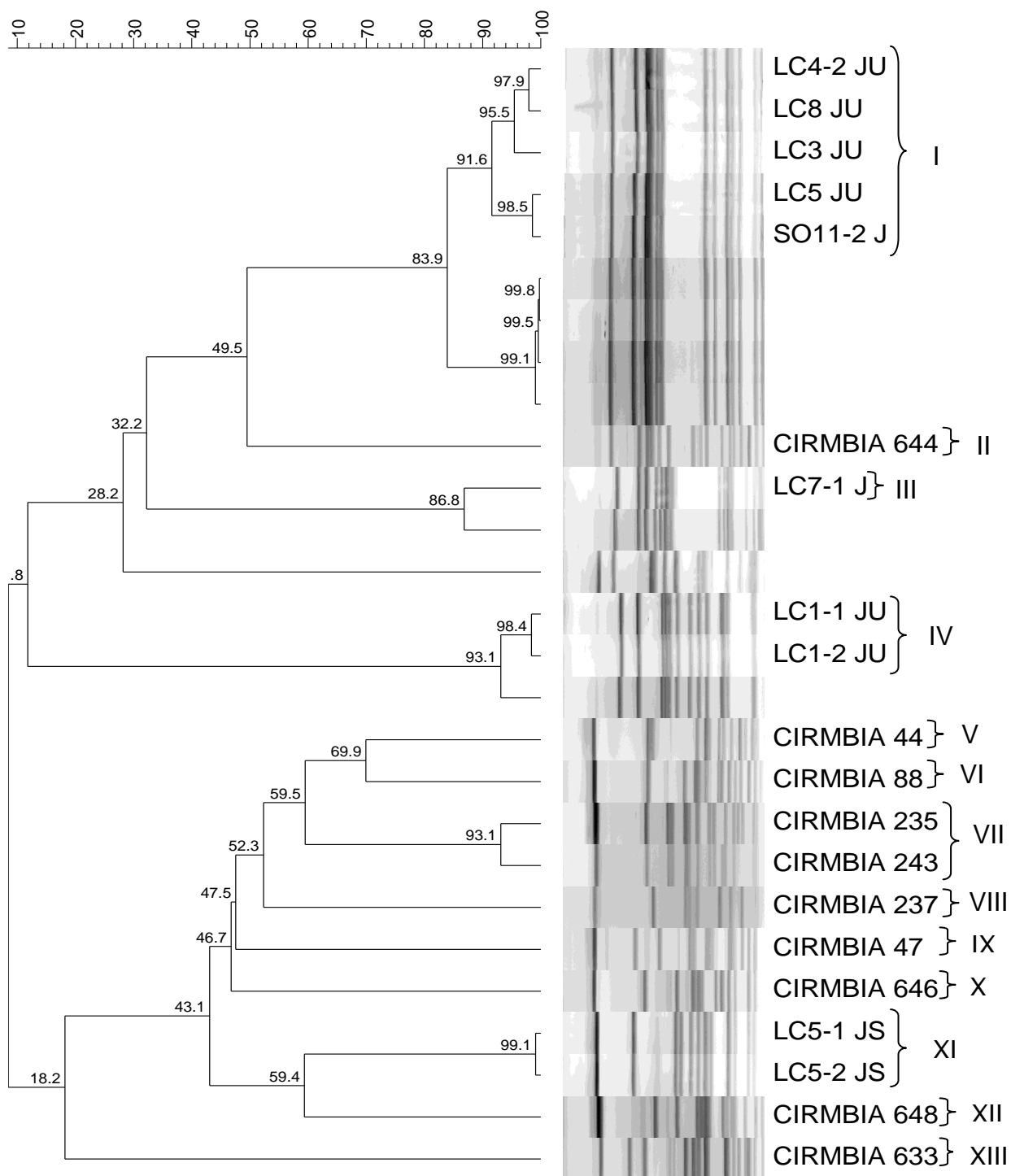


Figura 12: Diversidade genotípica entre os 20 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Os padrões foram gerados pela PFGE após digestão com as enzimas de restrição *Sma*I e *Xba*I

5. CONCLUSÕES

O objetivo inicial deste trabalho foi o de isolar bactérias propiônicas, por isso utilizou-se a técnica de cultura-dependente com meio de cultura específico para este grupo de micro-organismos. Porém, não foi possível isolar este grupo de bactérias, por isso trabalhamos com os isolados que representam uma parte da microbiota mesófila daquela região. Se técnicas de cultura-independente tivessem sido utilizadas, os grupos microbianos identificados seriam mais numerosos.

Este estudo permitiu o conhecimento da biodiversidade de alguns grupos pertencentes da microbiota bacteriana presente na região do Campo das Vertentes em Minas Gerais. Quatro gêneros de BAL foram encontrados distribuídos em 6 diferentes fazendas. A biodiversidade microbiana encontrada neste estudo está possivelmente relacionada com as características sensoriais dos queijos e produtos lácteos artesanais produzidos. Esses produtos lácteos podem ser uma fonte preciosa de cepas com propriedades tecnológicas interessantes, dando peculiaridade aos produtos provenientes desta região e agregando valor dos mesmos.

Neste trabalho, um total de 10 espécies foram identificadas por meio de diferentes técnicas moleculares. Foi possível verificar a diversidade clonal entre as cepas da espécie *Lactococcus lactis* e observar que os isolados do gênero *Enterococcus* são autóctones da região. Foi possível também utilizar de uma recente técnica molecular, a MLST, para caracterizar e estabelecer

as relações filogenéticas entre as cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*. Como esses isolados são largamente utilizados na indústria de alimentos como culturas *starters*, foi interessante conhecer a relação de parentesco entre as cepas analisadas, e as diferentes ST à que estas cepas pertencem. Esta técnica, além de se apresentar como um poderoso método no estudo da caracterização e estudos genéticos apresenta como vantagem a análise e comparação dos resultados *on line* gratuita.

Esquemas MLST propostos para diferentes espécies/subespécies de BAL são novas ferramentas para a caracterização precisa e não ambígua desses isolados. Com as novas técnicas moleculares tornou-se mais fácil identificar, caracterizar e quantificar confiavelmente isolados de BAL.

Uma boa perspectiva da técnica MLST integrada à indústria, seria a associação das cepas pertencentes aos diferentes ST encontrados com características tecnológicas industriais, para aplicação destas diferentes cepas como culturas *starters*. Uma outra proposta seria a de trabalhar características fenotípicas, como produção de aroma e *flavor*, dos isolados dentro dos mesmos grupos PFGE e MLST, para observação de maior ou menor capacidade destes compostos.

6. REFERENCIAS

Alves, A., Henriques, I., Santos, A., Tacão, M., Correia, A. (2003). Tipagem Genética de Micro-organismos. Aveiro, Portugal. **Mestrado em Microbiologia Molecular**, Universidade de Aveiro.

Andrade, N. J. (2008). Higiene da Indústria de Alimentos. Livraria Varela, São Paulo, 400p.

Araújo, E. A., Carvalho, A. F., Leandro, E. S., Furtado, M. M., Moraes, C. A. (2010). Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. **Journal of Functional Food**. V. 2, p. 85-89.

Arcuri, E. F., Silva, P. D. L., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Lange, C. C., Magalhães, M. M. A. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**. V. 38, p. 2250-2255.

Aslam, M., Diarra, M. S., Checkley, S., Bohauchuk, Masson, L. (2012). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in

Enterococcus spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. **International Journal of Food Microbiology**. V. 156, p. 222-230.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology in: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Third Edition, Revised and Expanded. 633 p.

Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. **FEMS Microbiology Reviews**. V.30, p. 487-513.

Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, D. D., Sorokin, A. (2012). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Research**. V. 11, p. 731-753.

Bonfoh, B., Wasem, A., Traore, A. N., Fane, A., Spillmann, H., Simbe, C. F., Alfaroukh, I. O., Nicolet, J., Farah, Z., Zinsstag, J. (2003). Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). **Food Control**. V. 14, p. 495-500.

BRASIL (2011). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011.

Bravo, D., Rodríguez, E., Medina, M. (2010). Nisin and lacticin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. **Journal of Dairy Science**. V. 92, p. 4805-4811.

Bruce, J. (1996) Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. **Food Technology**. V. 50, p. 77-81.

Butler, G., Nielsen, J. H., Larsen, M. K. Rehberger, B., Stergiadis, S., Canever, A., Leifert, C. (2011). The effects of dairy management and processing on quality characteristics of milk and dairy products. **Wageningen Journal of Life Sciences**. V. 58, p. 97-102.

Callon, C., Berdague, J. L., Dufour, E., Montel, M.C. (2005). The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses. **Journal of Dairy Science**. V. 88, p. 3840–3850.

Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. **Food Microbiology**. V. 30, p. 59-67.

Cerqueira, M. M. O. P; Souza, M. R.; Sena, M. J. (1999). Fatores determinantes na qualidade do leite – estudo de uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**. V. 54, n. 309, p. 241-245.

Chan, M. S., Maiden, M. C., Spratt, B. G. (2001). Database-driven multi locus sequencing typing (MLST) of bacterial pathogens. **Bioinformatics**. V. 17, p. 1077-1083.

Cibik, R., Lepage, E., Tailliez, P. (2000). Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. **Systematic and Applied Microbiology**, V. 23, p. 267-278.

Cousin, M.A. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**. V. 45, p.172–207.

Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**. V. 21, p. 370-380.

De Freitas, I., Pinon, N., Thierry, A., Lopez, C., Maubois, J. L., Lortal, S. (2007). In depth dynamic characterization of French PDO Cantal cheese made from raw milk. **Lait**. V. 87, p.97-117.

Delgado, S., Mayo, B. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. Strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. (2004). **International Journal of Food Microbiology**. V. 90, p. 309-319.

Dicks, L.M. T., Fantuzzi, L., Gonzales, F. C., du Toit, M., Dellaglio, F. (1993). *Leuconostoc argentinum* sp. Nov., isolated from Argentine raw milk. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 43, p. 347-351.

Dores, M. T. Implicações do processo de maturação à temperatura ambiente e sob refrigeração do queijo Minas artesanal da Canastra produzido na região de Medeiros, Minas Gerais. Viçosa: UFV. 2007. 101 p. **Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal de Viçosa

Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., Nychas, G. J. E. (2008). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. **Food Microbiology**. V. 27, p. 1028-1034.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Scheifer, K. H., Stacjebandt, E. (2006). **The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry**. V. 2, 3 ed. Springer.

Entin-Meer, M., Rephaeli, A., Yang, X., Nudelman, A., Vandenberg, S. R., Haas-Kogan, A. (2005). Nutryric acid prodrugs are histone deacetylase

inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. **Molecular Cancer Therapeutics**. V. 4, p. 1952-1961.

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. (2009). **Food Microbiology**. V. 26, p. 228-231.

Espirito Santo, A. P., Cartolando, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S. M., Gioiello, L. A., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M. N. (2011). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile increase CLA content in yoghurts. **International Journal of Food Microbiology**. V. 154, p.135-144.

Fernandez, E., Alegria, A., Delgado, S., Martin, M. C., Mayo, B. (2011). Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheese made of raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 77, p. 5324-5335.

Ferreira, C. L. L. F. (2012). **Prebióticos e Probióticos. Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro – RJ : editora Rubio Ltda.

Feutry F., Oneca, M., Berthier, F., Torre, P. (2012). Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. **Food Microbiology**. V. 29, p. 33-42.

FIL/IDF. (2011). Bulletin of the International Dairy Federation. The World Dairy Situation.

Fonollá, J., López-Huertas, E., Machado, F. J., Molina, D., Álvarez, I., Mármol, E., Navas, M., Palacín, E., García-Valls, M. J., Remón, B., Boza, J. J., Marti, J. L. M. (2009). Milk enriched with "healthy fatty acids" improves

cardiovascular risk markers and nutritional status in human volunteers. **Nutrition**. V. 25, p. 408-414.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini, P. L. (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**. V. 20, p. 397-404.

Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P. L. (2007). Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with *primers* targeted to 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology**, V. 44, p. 443-446.

Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P. L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M. Y., Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potencia and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. **International Journal of Food Microbiology**. V. 123, p. 204-211.

Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from cow's milk. **International Dairy Journal**. V.19, p.:3-11.

Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzappel, W. H. (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**. V. 88, p. 105-122.

Fungaro, M. H. P (2000). PCR na micologia. Biotecnologia- Ciência e Desenvolvimento. Diagnostico de analise e variabilidade.

Gay, M., Amgar, A., 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. **Lait**. V. 85, p. 153–170.

Gil-Campos, M. et al. (2012). *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age : A randomized controlled trial. **Pharmacological Research**. V. 65, p. 231-238.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, V. 88, p. 215-222.

Giraffa, G., Rossetti, L. (2004). Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**. V. 237, p. 133-138.

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. **Applied Environmental Microbiology**. V. 63, p.2802-2813.

Gomes, B. C., Franco, B. D. G. M., Martinis, E. C. P. (2010). Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. In foods. Current Research, Technology and Education Topics in **Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Méndez-Vilas (Ed.).

Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011). A microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**. V. 151, p. 284-288.

Gutiérrez-Méndes, N., Figueroa, J. C. R., Córdova, A. F. G., Moorillón, G. V. N., Chavira, B. R., Cordoba, B. V. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 56, p. 432-439.

Gutiérrez-Méndes, N., Cordoba, B. V., Córdova, A. F. G., Moorillón, G. V. N., Chavira, B. R. (2008). Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. **Journal of Dairy Science**. V. 91, p. 49-57.

Guyer, R. L., Koshland Jr., D. E. (1989). The molecule of the Year. **Science**. V. 246, p. 1543-1546.

Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Blay-Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., Chobert, J. M. (2012). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC 4.1 isolated from Mongol yogurt. **Food Control**. V. 22, p. 2020-2027.

Haug, A., Hostmark, A. T., Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in health and disease**. V. 6, p. 6-25.

Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., Shepherd. (2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. **International Journal of Food Microbiology**. V. 157, p. 305-308.

Hoang-Dung, T., Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3 ed, New York-Basel.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. Taxonomy an important features of probiotic microorganismos in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S-73S, 2001.

Incani, R. N., Hernández, M., Cortez, J., González, M. E., Salazar, Y. D. (2010). *Staphylococcus warneri* meningitis en a patient with *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and lymphoma. First report of a case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V. 52, p. 169-170.

Jamet, E., Akary, E., Poisson, M. A., Chamba, J. F., Bertrand, X., Serror, P. (2012). Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French. **Food Microbiology**. V. 31, p. 191-198.

Jan, G., Leverrier, P., Pichereau, V., Boyaval, P. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2029-2036, 2001.

Jatobá, A., Vieira, F. N., Neto, C. B., Silva, B. C., Mourino, L. P., Jerônimo, G. T., Dotta, G., Martins, M. L. (2008). Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 43, p. 1201-1207.

Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T. M. (2007). *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. **International Journal of Food Microbiology**. V. 114, p. 243-251.

Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C., Cogan, T. M. (2007). Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. **Journal of Applied Microbiology**, V. 103, p. 1393-1405.

Kahala, M., Maki, M., Lehtovaara, A., Tapanainen, J. M., Katiska, R., Juuruskorpi, M., Juhola, J., Joutsjoki, V. (2008). Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. **Journal of Applied Microbiology**. V. 105, p.1929-1938.

Kopermsub, P., Mayen, V., Warin, C. (2012). Nanoencapsulation of Nisin and Ethylenediaminetetraacetic acid in Niosomes and their antibacterial activity. **Journal of Science Research**. V. 4, p. 457-465.

Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Applied Environmental Microbiology**. V.70, p.5644-5650.

Lee, K. W., Lee, H. J., Kim, Y. J. (2005). Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. V. 45, p. 135-144.

Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O., Barbier, G. (2010). Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by realtime PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International Journal of Food Microbiology**, V. 138, p. 100-107.

Leroy, S., Lebert, I., Chacornac, J. P., Chevallier, I., Talon, R. (2007). Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique: Bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. **Viandes et Produits Carnés**. V. 25, p. 171-175.

Lieberman, S., Enig, M. G., Preuss, H. G. (2006). A review of monolaurum and lauric acid. **Alternative & Complementary Therapies**, December 2006.

Lortal, S., Rouault, A., Guezenc, S., Gautier, M. (1997). *Lactobacillus helveticus*: Strain typing and genome size estimation by Pulsed Field Gel Electrophoresis. **Current Microbiology**. V. 34, p.180-185.

Licitra G., Ogier J.C., Parayre S., Pediliggieri C. , Carnemolla T.M. , Falentin H., Madec M.N. , Carpino S., Lortal S. (2007). Variability of the bacterial biofilms of the "tina" wood vat used in the Ragusano cheese making process. **Applied Environmental Microbiology**. V.73, p.6980-6987.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Clark, D. P. (2010). **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed.

Magalhães, V. D., Ferreira, J. C., Barelli, C., Darini, A L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, V. 64, p. 155-161, 2005.

Magnusson, J. K., Strom, S., Roos, S., Sjogren, J., Schnurer. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. V. 219, p. 129-135.

Maiden, M. C. J. (2006). Multilocus Sequence Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, V. 60, p. 561-588.

Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., Desmasures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. **International Dairy Journal**. V. 27, p. 13-21.

Malik, A. C., Reinbold, G. W., Vedamuthu, E. R. (1968) Evaluation of the taxonomy of the *Propionibacterium*. **Canadian Journal. Microbiology**. V. 14, p.1185-1195.

Marino, M., Maifreni, M., Rondini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. V. 229, p. 133-140.

Marth, E. H., Steele, J. L. (2001). **Applied Dairy Microbiology** 2 edição, 744 p.

Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sorensen, S. J., Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* en Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. **International Journal of Food Microbiology**. V. 153, p. 192-202.

Minervini, F., Siragusa, S., Faccia, M., Dal Bello, F., Gobbetti, M., De Angelis. (2012). Manufacture of Fior li latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. **Journal of Dairy Science**. V. 95, p. 508-520.

Mohamed, J. A., Huang, B. (2007). Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**. V. 56, p. 1581-1588.

Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from Northwest Italian dairy products. **International Dairy Journal**. V.16, p.867-875.

Mullié C., Odou M. F., Singer E., Romond M. B., Izard D. (2003). Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted *primers* for the identification of bifidobacteria from human origin. **FEMS Microbiology Letters**. V. 222, p. 129–136.

Mullis, K., Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, V. 255, p. 335-350.

Ndoye, B., Rasolofo, E. A., LaPointe, G., Roy, D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. **Dairy Science and Technology**. V. 91, p. 495-524.

Neeley, E. T., Phister, T. G., Mills, D. A. (2005). Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria en wine. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 71, p. 8954-8957.

Nes, I. F., Diep, D. B., Holo, H. (2011). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Bacteriology**, V. 193, p. 1189-1198.

Ng, E. W., Yeung, M., Tong, P. S. (2010). Effects of yourt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**. V. 145, p. 169-175.

Nóbrega, J. E. Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da

Canastra e do Serro, Minas Gerais. Viçosa: UFV. 2012. 115 p. **Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal de Viçosa.

Nogueira, C. A. M., Momesso, C. A. S., Machado, R. L. D., Almeida, M. T. G., Rossit, A. R. B. (2004). Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectología**. V. 6, p. 35-38.

Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**. V. 101, p. 396-405.

Nornberg, M. F. B. L., Tondo, E. C., Brandelli, A. (2009). Bactérias psicrotólicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**. V. 37, p. 157-163.

Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., Saihi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**. V. 126, p. 286-290.

Otto, M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. **Frontiers in Bioscience**. V. 9, p. 841-863.

Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings, J., Amar, M. (2008). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'Iben'. **Journal of Applied Microbiology**. V. 106, p. 486-405.

Paiva, C. A. V., Cerqueira, M. M. O. P., Souza, M. R. S., Lana, A. M. Q. (2012). Evolução anual da qualidade do leite cru refrigerado processado em uma indústria de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 64, p. 471-479.

Pedroso, A. A., Oetting, L. L., Utiyama, C. E., Mentem, J. F. M., Lambais, M. R., Miyada, V. S. (2005). Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V. 34, p. 1225-1233.

Pfeiler, E. A., Klaenhammer, T. R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. **Trends Microbiology**. V. 12, p. 546-553.

Pinto, C. L., Martins, M. L., Vanetti, M. C. D. (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 26, p. 645-651.

Passerini, D., Beltramo, C., Coddeville, M., Quentin, Y., Ritzenthaler, P., Daveran-Mingot, M. L., Le Bourgeois, P. (2010). Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. **Plos One**. V.5:e15306.

Piper, C., Hill, C., Cotter, P. D., Ross, R. P. (2011). Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. **Microbial Biotechnology**. V. 4, p. 375-382.

Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P. S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**. V. 92, p. 141-151.

Pogacic, T., Kagli, D. M., Sikora, S., Kalit, S., Havranek, J., Samarzija, D. (2011). Experimental approaches for identification of indigenous lactococci isolated from traditional dairy products. **Mljekarstvo**. V. 1, p.3-14.

Pu, Z. Y., Dobos, M., Limsowtin, G. K. Y., Powell, I. B. (2002). Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. **Journal of Applied Microbiology**. V. 93, p. 353-361.

Quere, F., Deschamps, A., Urdaci, M. C. (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**. V. 82, p. 783-790.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw cheese. **International Journal of Food Microbiology**. V. 150, p. 81-94.

Ralyea, R., Wiedmann, M., Boor, K. J. (1998). Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. **Journal of Food Protection**. V. 61, p. 1336-1340.

Randazzo, C. L., Caggia, C., Neviani, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, V. 78, p. 1-9, 2009.

Rantsiou, K., Urso, R., Lacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., Cocolin, L. (2005). Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied Environmental Microbiology**, 71, p. 1977-1986.

Rasolofo, E. A., St-Gelais, D., LaPointe, G., Roy, D. (2010). 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

Raykova, D., Kalichuk, V., Chikov, G., Peykov, S., Dimov, S. G. (2009). Detection and preliminary characterization of a blis produced by *Enterococcus* strain isolated from cheese starter. **Biotechnology & Biotechnonology** EQ. 23/2009/SE.

Robinson, R. K. (2002). **Dairy Microbiology Handbook: A microbiology of milk and milk products**. Terceira ed. 737p.

Rosa, D. D. (2008). Método rápido para extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathology**. V. 34, p. 259-261.

Roissart, H., Luquet, F. M. (1994). **Bactéries Lactiques**. Volume 1. Lorica, Chemin de Saint Georges.

Ross, R. P., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. V. 79, p. 3-16.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Balz, R. K., Collins, M. D., Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. V. 6, p. 183-195

Schmidt, R. J., Emará, M. G., Kung Jr., L. (2008). The use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. **Journal of Applied Microbiology**, V. 105, p. 920-929, 2008.

Skřivanová, E., Worgan, H. J., Pinloche, E., Marounek, M., Newbold, C. J., McEwan, N. R. (2010). Changes in the bacterial population of the caecum and stomach of the rabbit in response to addition of dietary caprylic acid. **Veterinary Microbiology**. V. 144, p. 334-339.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (1986). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. V. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

Solieri, L., Giudici, P. (2010). Development of a sequence-characterization amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific

detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 76, p. 7765-7774.

Steins, J. M. (2008). Dairy products and health: Focus on their constituents on the matrix? **International Dairy Journal**. V. 18, p. 425-435.

Tanigawa, K. Watanabe, K. (2011). Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. **Microbiology**. V. 157, p. 727-738.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D. A., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 33, p. 2233-2239.

Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. **Bulletin of the International Dairy Federation**. V.120, p. 4–10.

Torres-Llenez, M., Cordoba, B. V., Cinco, M. D., Manzano, M. M., Córdova, A. F. G. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. **Food Control**. V. 17, p. 683-690.

Tulini, F., Gomes, B. C., De Martins, E. C. P. (2011). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 31, p. 155-150.

Vacheyrou, M., Normand, A. C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International Journal of Food Microbiology**. V. 146, p. 253-262.

Vancanneyt, M., Huys, G., Lefebvre, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Swings, J. (2006). Intraspecific genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strain intended for probiotic use and isolates of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 72, p. 5376-5383.

Van Hoorde, K., Vandame, P., Huys, G. (2008). Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. **Dairy Science Technology**. V. 88, p.445-455.

Vernile, A. Giammanco, G. Spano, G., Beresford, T. P., Fox, P. F., Massa, S. (2008). Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano cheese. **Dairy Science Technology**. V. 88, p. 619-629.

Wall, R., Fitzgerald, G., Hussey, S., Ryan, T. (2007). Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Ecology**. V. 59, p. 127-137.

Walker, N. J. (2002). A technique whose time has come. **Science**. V. 296, p. 557-559.

Walstra, P.; Geurts, T. J.; Wouters, J. T. M. (2006). **Dairy Science and Technonology** : principles of milk properties and processes. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 762 p.

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

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**. V. 29, p. 487-495.

Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 53, p. 1893-1900.

Anexo 1

Perfil alélico de todos os ST conhecidos, para os genes testados (dados de base para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*).

ST	bcat	glya	pdp	pepxp	pgk	recn
1	1	1	1	1	8	1
2	1	6	6	6	3	8
3	7	7	8	2	13	3
4	1	1	6	8	13	1
5	8	8	9	9	10	9
6	1	1	1	1	1	1
7	1	1	6	8	11	1
8	2	3	7	7	3	3
9	1	1	1	1	5	5
10	1	1	1	1	12	1
11	2	2	2	2	3	3
12	1	1	11	8	7	12
13	2	2	2	2	2	2
14	4	4	3	4	6	6
15	1	1	1	1	5	1
16	1	1	1	1	7	1
17	6	3	5	5	3	7
18	1	1	1	1	5	11
19	2	11	13	2	3	3
20	2	10	12	11	3	13
21	5	5	4	1	9	3
22	3	1	1	1	5	1
23	10	1	1	1	5	1
24	2	3	2	3	4	4
25	9	9	10	10	10	10
26	8	12	14	12	14	14
27	11	6	15	13	15	15
28	11	6	16	13	15	15
29	2	13	2	3	4	4
30	2	13	2	3	4	16
31	4	4	3	4	16	17
32	11	6	15	13	14	15
33	2	13	2	3	3	4
34	1	1	1	1	5	18
35	12	9	10	10	10	10

Anexo 2

Soluções utilizadas para efetuar a extração do DNA genômico

Tris HCl 20 mM, pH 8,0

EDTA 2mM

Triton X100 1 %

TE: Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0

Tampão de lise: TE + triton + lisozima + mutanolisina