

**JOÃO MARCOS MAIA SILVA**

**MICROBIOTA CORE DE QUEIJOS DE LEITE CRU PRODUZIDOS NA  
REGIÃO DA SERRA DA CANASTRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: José Guilherme Prado Martin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa**

T

S586m  
2020  
Silva, João Marcos Maia, 1996-  
Micobiota core de queijos de leite cru produzidos na região  
da Serra da Canastra / João Marcos Maia Silva. – Viçosa, MG,  
2020.  
63 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Guilherme Prado Martin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 50-61.

1. Queijo - Microbiologia. 2. Metagenômica. 3. Fungos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 637.35

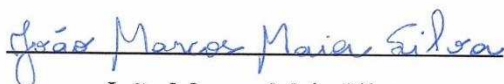
JOÃO MARCOS MAIA SILVA

MICROBIOTA CORE DE QUEIJOS DE LEITE CRU PRODUZIDOS NA REGIÃO DA  
SERRA DA CANASTRA

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

APROVADA: 31 de julho de 2020.

Assentimento:



João Marcos Maia Silva  
Autor



José Guilherme Prado Martin  
Orientador

Dedico

A todos que acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por me dar forças para nunca desistir da minha missão de ser educador e fazer a diferença no mundo acadêmico. Foi graças a Ele que eu pude aproveitar como lições positivas diversos momentos de adversidade. Por isso, o valor da empatia jamais deixará de existir em mim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Guilherme Prado Martin. Sem ele, eu não estaria escrevendo este texto hoje. Obrigado pelos anos de amizade, e por todo o conhecimento transmitido.

Agradeço à Meiriele, pela disponibilidade de me co-orientar, e ao doutorando Tomás Gomes Reis Veloso, que colaborou de forma grandiosa para realização deste trabalho. Obrigado por me ensinar tanto em tão pouco tempo!

Agradeço ao Prof. Jonas Guimarães Silva (IFMG Campus Bambuí) e à Profa. Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira (UFV), pela parceria; aos produtores de QMA da Serra da Canastra, pela acolhida e disponibilidade.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto (Processo APQ-04407-17).

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados – FERMICRO, que me receberam de braços abertos e proporcionaram momentos de muita leveza, amizade e memes.

Agradeço à professora Poliane Alfenas, que foi muito mais que uma educadora, mas uma verdadeira amiga.

Agradeço aos meus pais, Jucivanda e Marcos, que nunca mediram esforços para que seus filhos conseguissem lutar por aquilo que acreditam.

Agradeço à minha avó, que sempre cuidou de mim quando meus pais não podiam. Agradeço à minha irmã, Renata, que foi minha companheira por muitos anos. Ela me ensinou muito mais que imagina.

Agradeço imensamente aos meus melhores amigos da vida: Lucas Eusébio, Luan Souza, Vitor Moreira, José Matheus. Como sempre, vocês participaram de mais uma etapa em minha vida,

e não permitiram que a mesma fosse privada de muita risada, gritaria e jogatinas pelas madrugadas.

Agradeço à minha turma do mestrado, com pessoas de caráter ímpar e que levarei para sempre no peito: Everaldo, Maurício, Letícia, Dâmaris, Thamylles e Yan, muito obrigado.

Agradeço ao pessoal do Bioagro, em especial ao pessoal da genética, por toda a amizade, cafés da tarde e conselhos dados.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela formação proporcionada, conhecimento transmitido e oportunidades de crescimento concedidas.

Agradeço ao meu ídolo, professor Dr. Alexandre Braoios, da Universidade Federal de Jataí, por despertar em mim o amor à docência. Obrigado pelos conselhos dados nesta etapa.

Enfim, agradeço à todas as pessoas que fizeram parte da minha rotina em Viçosa. Estar longe de casa não é nada fácil, e todos os envolvidos permitiram, de alguma forma, que fosse possível estar aqui. Obrigado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – pela bolsa concedida (Código de Financiamento 001).

## RESUMO

SILVA, João Marcos Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2020. **Micobiota core de queijos de leite cru produzidos na região da Serra da Canastra.** Orientador: José Guilherme Prado Martin.

O Queijo Minas Artesanal (QMA) da Canastra apresenta relevância histórica, sócio-cultural e econômica para o Estado de Minas Gerais. Além de ser caracterizado por uma produção exclusivamente artesanal, que tem perdurado ao longo dos últimos dois séculos, o processo de produção do QMA da Canastra também é um dos principais responsáveis por sua assinatura organoléptica, principalmente decorrente da ação de microrganismos presentes na matéria-prima e no ambiente de produção, caracterizando o terroir do QMA da Canastra. A identificação dessa comunidade microbiana, portanto, é um desafio complexo, tendo em vista a grande variedade de microrganismos presentes, bem como a não culturabilidade de grande parte da microbiota. Dessa forma, a abordagem por metagenômica se mostra uma importante ferramenta na compreensão da estrutura e função da microbiota do QMA. Este estudo teve como objetivo comparar a micobiota de queijos artesanais de leite cru produzidos nos 9 municípios que compreendem a região da Serra da Canastra, bem como identificar a existência de uma micobiota core. Para obtenção dos dados de metagenômica, foi realizada a extração de DNA total dos queijos e sequenciamento da região ITS1 pela plataforma Illumina, USA. Foram analisadas 585.614 sequências, agrupadas em 211 OTUs. Um padrão de aumento dos índices de diversidade alfa em relação à altitude das propriedades produtoras foi detectado. Os gêneros *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Fusarium* e *Candida* foram os prevalentes nas amostras analisadas. A estrutura das comunidades microbianas dos queijos artesanais foi diversificada em todas as amostras. Foram revelados diversos padrões de co-exclusão e co-ocorrência importantes para o equilíbrio da micobiota dos queijos, além de vias metabólicas responsáveis por produzirem compostos voláteis que estão relacionados às características organolépticas previamente descritas nos queijos da Canastra. A partir desses resultados, foi possível caracterizar a micobiota core dos queijos artesanais da Canastra, além de relacionar os potenciais papéis desses microrganismos na construção da identidade organoléptica do produto.

Palavras-chave: Queijos. Metagenômica. Fungos.

## ABSTRACT

SILVA, João Marcos Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2020. **Mycobiota core of raw milk cheeses produced in Serra da Canastra region.** Adviser: José Guilherme Prado Martin.

The Artisanal Minas Cheese (QMA) produced in Canastra region has historical, socio-cultural and economic relevance for Minas Gerais State. Besides its exclusively artisanal production, which has survived for almost two centuries, the production process of Canastra cheese is also the main responsible for the organoleptic signature of the product, mainly due to the action of microorganisms from raw material and environment, featuring the terroir of Canastra QMA. The identification of its microbial community, therefore, is a complex challenge, considering the great diversity of microorganisms, as well as the non-culturability of part of the microbiota. Thus, the metagenomics approach proves to be an important tool to understand the microbiota structure and function in QMA. This study aimed to compare the mycobiota of artisanal cheeses produced in Serra da Canastra region in 9 different cities, as well as to verify the presence of a core mycobiota. For the metagenomics analysis, the total DNA in cheeses was extracted and the ITS1 region was sequenced by the Illumina. 585,614 sequences were analyzed, grouped into 211 OTUs. A pattern of increased alpha diversity indexes was detected considering the altitude of the properties. *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Fusarium* and *Candida* were the most prevalent genera in the cheeses. The structure of the microbial communities in cheese samples was diversified across all samples. Several co-exclusion and co-occurrence patterns important for the balance of cheese mycobiota were revealed, as well as metabolic pathways responsible for volatile compounds production related to sensorial characteristics previously described in Canastra cheese. From these results, it was possible to characterize the core mycobiota of Canastra cheeses and propose the potential roles of these microorganisms in quality attributes of the product.

Keywords: Cheeses. Metagenomics. Fungi.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 QMA da Serra da Canastra.....	11
2.2 Microbiota em queijos artesanais .....	14
2.3 Metagenômica em pesquisas com produtos lácteos .....	16
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Isolamento dos fungos dos queijos artesanais da Canastra .....	24
4.2 Manutenção dos isolados .....	25
4.3 Extração de DNA para metagenômica .....	25
4.4 Construção e sequenciamento da biblioteca de amplicons.....	25
4.5 Análise dos dados.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1 Análise de diversidade alfa .....	27
5.2 Análise da diversidade Beta .....	39
5.3 Padrões de interação fúngica.....	43
5.4 Potencial gênico funcional da comunidade fúngica .....	46
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS .....	50
APÊNDICE A - GÊNEROS FÚNGICOS IDENTIFICADOS POR METAGENÔMICA.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos do país; registros históricos de sua produção datam do século XVIII, durante a exploração e colonização do interior do Brasil pelos portugueses (MACHADO et al., 2004). É caracterizado pela produção manual, em pequenas quantidades, com mecanização limitada e por técnicas específicas de cada região no qual é produzido (KAMIMURA et al., 2019). Além disso, a produção de QMA é reconhecida como um patrimônio cultural brasileiro (IPHAN, 2008).

Além da relevância para a cultura e história mineiras, o QMA representa importante fonte de renda para o agricultor familiar. Em muitos casos, a atividade queijeira é sua principal fonte de renda. Portanto, a fabricação de um produto de qualidade é fundamental para a produção agropecuária do Estado de Minas Gerais. Dentre as diversas regiões produtoras, a Serra da Canastra é uma das mais tradicionais, sendo, hoje, amplamente reconhecida quanto à produção de queijos no país (SOBRAL et al., 2017).

Dentre os fatores que influenciam as características de cada tipo de QMA, destacam-se condições de clima, umidade, altitude, tipo de pastagem consumida pelo rebanho leiteiro, bem como o sistema produtivo, que deve sempre estar em concordância com as Boas Práticas de Fabricação. Por ser artesanal, o processo de produção do QMA resulta em produtos com diferenças significativas, observadas não apenas entre as regiões, mas também dentre produtores de uma mesma região (PINTO et al., 2009).

Geralmente, ao término do processo de fabricação do queijo da Canastra, as peças são lavadas em água corrente e secadas para a remoção de fungos que eventualmente surgem durante a maturação. Esporos produzidos por fungos presentes no ambiente das queijarias eventualmente depositam-se sobre os queijos e ali diversos fungos se desenvolvem. Após alguns dias, as estruturas vegetativas/reprodutivas ficam evidentes pela formação de colônias de fungos filamentosos e leveduras na superfície dos queijos (SARAIVA et al., 2012).

Durante a maturação do QMA, os produtores realizam a raspagem da casca dos queijos visando à remoção de fungos crescidos na superfície dos mesmos. Esse processo é popularmente conhecido como “toalete do queijo” e influencia diretamente na diversidade microbiológica e na caracterização do produto como um autêntico QMA (ROCHA, 2004).

Alguns produtores, interessados nas características sensoriais atribuídas a fungos presentes no ambiente de produção, têm adotado a prática de se preservarem esses microrganismos sobre os queijos, uma vez que têm importante participação na maturação do produto (SANT’ANNA et al., 2019). Esses fungos, que possuem intensa atividade bioquímica,

realizam processos de lipólise e proteólise na massa dos queijos, o que resulta em aspectos organolépticos distintos, sendo de interesse de alguns produtores que vislumbram nesse tipo de produto um nicho de mercado a ser explorado. Os queijos artesanais de casca florida têm ganhado, nos últimos anos, cada vez mais espaço no mercado brasileiro, com maior valor agregado em relação aos demais queijos, sendo, inclusive, reconhecido nacional (PEREIRA et al., 2014; KAMIMURA et al., 2020) e internacionalmente (MONDIAL DU FROMAGE ET DES PRODUITS LAITIERS, 2019).

Tendo em vista o potencial econômico de queijos artesanais maturados por fungos naturais, a prática de se preservá-los na superfície da casca do queijo ao longo do processo de maturação, quando da não realização da etapa de raspagem, resulta em um produto final diferenciado, que não cumpre estritamente os requisitos básicos necessários para sua classificação como um legítimo QMA da Canastra. Acredita-se, portanto, que em um futuro breve uma nova categoria de queijo poderá ser criada, de maneira a atender esses produtores que suprimem uma das etapas de produção do QMA para o desenvolvimento de características sensoriais de interesse, cada vez mais valorizadas e que agregam valor ao produto final.

Durante o processo de fabricação de queijos, ocorre o fenômeno de dinâmica populacional, que pode variar de acordo com as condições de umidade, altitude, pH, tempo de maturação e pressão atmosférica (CALZADA et al., 2014). Dessa forma, é esperado que tal dinâmica influencie diretamente nas características dos queijos, a depender de suas condições de produção, visto que cada queijo possui uma assinatura geográfica e microbiana única (SANT'ANNA et al., 2019). Portanto, a elucidação do papel da microbiota do ambiente de produção (equipamentos e câmaras de maturação), matéria-prima e produto final é crucial para o fortalecimento da identidade de cada queijo artesanal (CARPINO et al., 2017).

Estudos envolvendo metagenômica têm ganhado destaque nos últimos anos por permitir a identificação dos microrganismos do diverso ecossistema dos queijos artesanais, independentemente de sua culturabilidade (GEUGNIEZ et al., 2017). Uma vez que esse tipo de estudo se baseia na análise do DNA total extraído, os limites dos métodos tradicionais de cultura podem ser evitados, abrangendo, portanto, toda a microbiota da amostra, mesmo aquela viável mas não cultivável (UNTERSEHER et al., 2011).

Dessa forma, a abordagem com ferramentas ômicas é de importante valia, uma vez que se mostra rápida, sensível e reprodutível, garantindo que haja a compreensão das relações microbianas com aspectos de interesse em alimentos, como segurança microbiológica e garantia da qualidade. Além disso, é possível identificar a assinatura microbiana de cada queijo

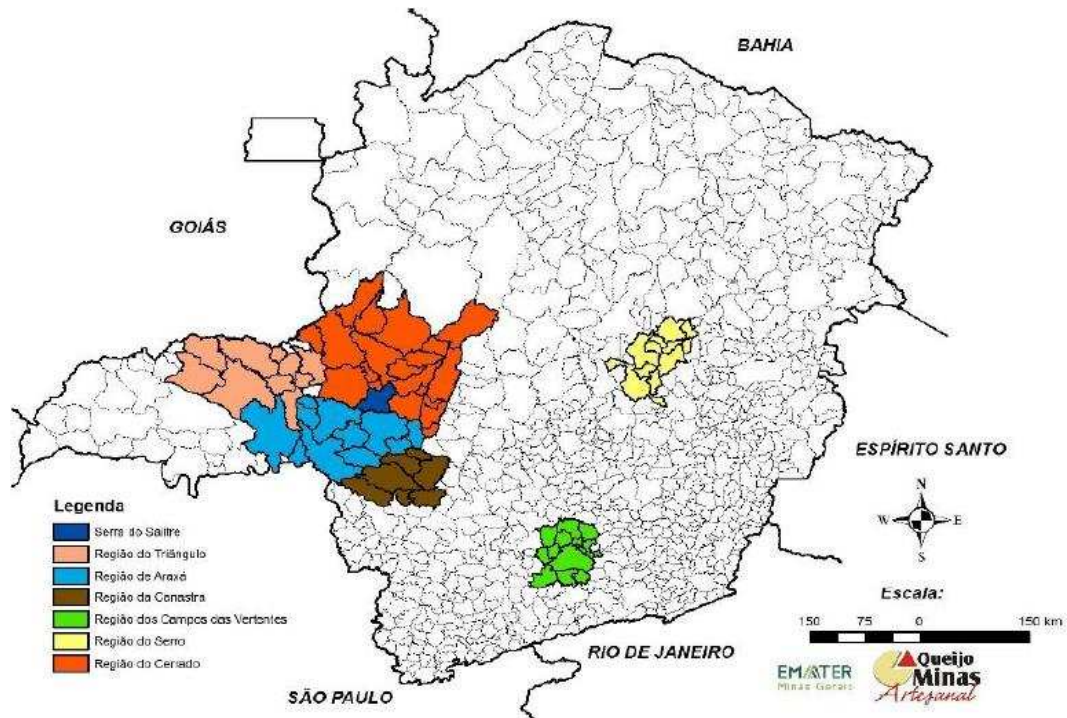
e associá-la a metadados relativos às características geográficas das propriedades produtoras, bem como aos procedimentos adotados pelos produtores de queijos artesanais.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 QMA da Serra da Canastra**

O QMA é um dos produtos mais antigos e tradicionais produzidos no Brasil (DAS DORES & FERREIRA, 2012). Originou-se em pequenas fazendas em Minas Gerais, ainda no século XVIII, sendo um dos queijos mais produzidos e comercializados no país (AGÊNCIA MINAS, 2019). É um produto com aproximadamente 42% de umidade (JÚNIOR et al., 2009), de aspecto semi-duro, coloração amarelo-pálida e discreta acidez (BOTELHO et al., 2013). Atualmente, o Estado de Minas Gerais é reconhecido como um dos maiores produtores de queijos artesanais. Além de sua relevância sociocultural, o QMA é também a única fonte de renda de muitas famílias de pequenos produtores que vivem desta centenária tradição (KAMIMURA et al., 2020).

Cada produto assume características próprias, decorrentes das peculiaridades de produção e de fatores edafoclimáticos presentes em cada uma das regiões produtoras no Estado (LIMA et al., 2009). Atualmente, o QMA é produzido em 7 diferentes microrregiões: Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Serro, Triângulo Mineiro, Serra do Salitre e Serra da Canastra (Figura 1). De acordo com a Portaria nº 1.687 de 23 de dezembro de 2016, a produção de queijos da Canastra é realizada nos municípios de Bambuí, Delfinópolis, Piumhi, São Roque de Minas, Medeiros, São Batista da Glória, Vargem Bonita, Córrego D'Anta e Tapiraí (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2016). Em todos esses municípios, a atividade queijeira é forte, além de ser considerada um patrimônio cultural mineiro (SILVA et al., 2011).



**Figura 1** – Microrregiões produtoras do Queijo Minas Artesanal. Fonte: IMA (2014).

De acordo com a Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, o QMA é caracterizado por sua elaboração na própria fazenda de onde se obtém o leite cru, matéria-prima acrescida unicamente de “pingo”, coalho e sal (MINAS GERAIS, 2002). Além disso, o processo de fabricação do queijo a partir da coleta do leite é totalmente manual (RESENDE et al., 2011). O pingo consiste em uma cultura endógena proveniente do processo de dessoragem e salga de queijos produzidos ao final da tarde do dia anterior. Devido à sua alta concentração de sal, o pingo age como um inibidor de bactérias e outros microrganismos indesejáveis ao longo da cadeia produtiva (LIMA et al., 2009).

Durante a fabricação do QMA, não há a adição de quaisquer fermentos comerciais (culturas iniciadoras do processo de fermentação do leite). Dessa forma, essa função fica sob responsabilidade da microbiota natural do leite cru – bem como do pingo – composta majoritariamente por bactérias acidoláticas (BAL) que irão atuar na transformação do alimento, gerando as características físico-químicas e sensoriais desejáveis do produto (COSTA et al., 2014). Além de importantes na promoção de características organolépticas que agregam valor aos queijos, as BAL conferem efeito protetivo contra potenciais patógenos contaminantes (AMORIM et al., 2014).

De acordo com o Decreto nº 44.864, de 1º de agosto de 2008, o queijo da Canastra é fabricado por produtores de maneira artesanal, a partir do leite cru de vacas sadias, tendo o início da produção em até 90 minutos após a ordenha (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2008). Inicialmente, a obtenção da matéria-prima pode ser realizada através de ordenha manual ou mecânica, desde que seja feita na propriedade na qual o produto será fabricado. Após o leite ser coado para remoção dos detritos macroscópicos, é feita a adição do pingo e do coalho. Depois de 40 minutos, a massa obtida é cortada e submetida ao processo de mexedura, de modo a separar parcialmente o soro da massa, que é, então, transferida para formas de 15-17 centímetros de diâmetro e prensada manualmente com o auxílio de tecido sintético devidamente higienizado. O processo de salga é feito a cada 6-12 horas, em cada lado do queijo, e após 24 horas o mesmo é desenformado, iniciando-se o processo de maturação (JÚNIOR et al., 2009; JÚNIOR et al., 2014).

Assim como outros tipos de QMA, o queijo da Canastra passa por uma etapa de raspagem durante a maturação. Essa raspagem é adotada pela maioria dos produtores com o objetivo de remover os fungos da superfície dos queijos, evitando-se, assim, eventos anormais de fermentação (NETTO, 2011). Alguns produtores, entretanto, têm seguido por um caminho menos tradicional e não executam essa etapa, denominada popularmente como “toalete” do queijo. Uma vez que o QMA da Canastra é caracterizado por ser isento de colonização por fungos filamentosos, isso pode ser sugestivo dos primeiros passos para o surgimento de um novo tipo de queijo artesanal de Minas (QAM) ou até mesmo uma variante do Canastra tradicional.

Segundo a Portaria de nº 1.736 de 27 de julho de 2017, o QMA só pode ser comercializado após atender a prazos mínimos de maturação (14 dias para a região de Araxá; 17 dias para o Serro e 22 dias para a Canastra, Cerrado, Campo das Vertentes, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro). Durante esse período, os queijos ficam acondicionados em prateleiras de madeira, instaladas dentro da própria queijaria (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2017). Esse período favorece a ocorrência de variações na dinâmica populacional dos microrganismos, imprescindíveis para a correta maturação do produto, até que se atinjam suas características finais (GEUGNIEZ et al., 2017).

Em 18 de julho de 2019, o Decreto nº 9.918 regulamentou a comercialização de produtos artesanais de origem animal em todo o território nacional, dentre eles queijos artesanais, a partir da implementação do selo ARTE. O produto pode, então, ser comercializado sem atender necessariamente aos períodos mínimos de maturação supracitados, desde que se respeitem

critérios de controle sanitário e microbiológico, a fim de se preservarem as características originais do produto através das Boas Práticas de Fabricação. (BRASIL, 2019).

Nos últimos anos, houve uma busca crescente por formas de se melhorarem a produção e a qualidade do QMA, envolvendo questões regulamentares, treinamento contínuo de produtores, aprimoramento de instalações para fabricação de queijos, maior exigência de mercado, além de um maior investimento em pesquisas relacionadas ao tema. Além disso, a prevenção e a correção de defeitos em produtos artesanais se mostram mais difíceis em comparação aos queijos industrializados, visto que a matéria-prima é tratada de forma diferente no modelo tradicional e industrial (SOBRAL et al., 2017). O Programa Queijo Minas Artesanal, da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER - MG), tem orientado os produtores na adoção de boas práticas de produção, legalização de queijarias, definição de cadeias produtivas adequadas, além da certificação de origem e qualidade para valorização do produto (EMATER, 2018).

Um fator que diferencia o QMA da Canastra daqueles de outras regiões produtoras, como o Serro, é a etapa de prensagem para remoção do excesso de soro da massa do queijo. Tal etapa, que precede a salga seca, é realizada com o auxílio de um tecido sintético (voal) conhecido como “volta ao mundo”. Na Canastra, o queijo é envolto no tecido que é, então, espremido para remover o excesso de umidade da massa (CUNHA, 2016). Devido ao uso do voal durante a prensagem, o resultado é um queijo com uma massa uniforme, característica que não pode ser observada nos queijos produzidos na região do Serro, por exemplo, cuja prensagem é feita utilizando-se apenas as mãos (DO VALE, 2018).

## **2.2 Microbiota em queijos artesanais**

Assim como outros produtos lácteos, queijos artesanais são considerados substratos suscetíveis para a proliferação de microrganismos (HYMERY et al., 2014). O desenvolvimento de fungos em queijos pode ser um problema devido à alteração das características próprias do produto, além do potencial risco de produção de toxinas (DOBSON, 2017). Entretanto, uma grande diversidade de fungos é empregada na produção de alimentos fermentados. Isso se deve à intensa atividade bioquímica de algumas espécies, a exemplo de *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti*, utilizados na elaboração dos queijos Roquefort e Camembert, respectivamente. Ademais, a grande variedade de queijos ao redor do mundo é um indicativo de como a diversidade de fungos presentes no ambiente gera produtos com características singulares (BAS et al., 2019).

O que difere um fungo de interesse dos demais para a atividade queijeira são suas propriedades enzimáticas, em especial lipólise e proteólise, que conferem sabor e aroma agradáveis, agregando valor ao produto final; além disso, é imprescindível que não confirmem riscos à saúde do consumidor (PEREIRA et al., 2014). Cabe ressaltar que a presença de fungos benéficos em queijos artesanais também confere atividade inibitória sobre outros fungos contaminantes (AFSHARI et al., 2020; GEUGNIEZ et al., 2017). Estudos têm demonstrado que a atividade inibitória de espécies do gênero *Penicillium* se mostrou forte o suficiente para impedir o desenvolvimento de *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus flavus*, potentes produtores de esterigmatocistina e aflatoxinas, respectivamente (ENGELHART et al., 2002; NIELSEN et al., 1998).

Estudos visando à identificação e catalogação de microrganismos constituintes da microbiota de queijos artesanais vem crescendo, à medida que alguns produtores têm adotado a comercialização de queijos com fungos filamentosos e leveduras na superfície (FIGUEIREDO, 2016). *Geotrichum*, *Aspergillus* e *Penicillium* são gêneros frequentemente relatados em queijos artesanais, como queijo de manteiga, Serrano e QMA da Serra da Canastra (SILVA, 2012; PEREIRA et al., 2019; CÉSAR, 2019), a partir de estudos que empregam métodos de isolamento e identificação com base em características morfológicas e bioquímicas dos isolados fúngicos.

Em trabalho realizado por César (2019), utilizando como objeto de estudo queijos artesanais da Canastra, foi detectada uma diversa microbiota de fungos filamentosos, envolvendo predominantemente os gêneros *Fusarium*, *Geotrichum*, *Aspergillus* e *Penicillium*, resultados de acordo com estudo realizado por Montagna et al. (2004), que detectou uma microbiota semelhante em queijos artesanais produzidos com leite de ovelhas. Já Murliki (2017) relata a presença de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Fusarium* em queijo Colonial. Fungos filamentosos e leveduras foram detectados em elevadas quantidades em queijo coalho produzidos com leite de Cabra no Nordeste brasileiro (QUEIROGA et al., 2009).

Em relação às leveduras, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e *Torulaspora* constituem os gêneros mais representativos em queijos artesanais (SANTOS, 2013; BORELLI et al., 2006). *Saccharomyces* e *Yarrowia* também foram detectados em queijo coalho (ALMEIDA, 2011). *Candida* parece amplamente distribuída em queijos brasileiros, como por exemplo queijo Colonial (MURLIKI, 2017), queijo coalho (ALMEIDA, 2011) e queijo da Canastra (CÉSAR, 2019). Pimentel (2019) detectou uma elevada contagem de leveduras e fungos filamentosos em queijos do tipo coalho na região Norte do Brasil. Entretanto, ainda que a contagem estivesse elevada, a autora não destaca riscos à saúde dos consumidores.

Além da matéria-prima, o ambiente de produção também contribui para a microbiota do produto final; microrganismos provenientes da pele do rebanho leiteiro, do solo, dos tanques de armazenamento de leite, bem como das câmaras de maturação, aumentam a diversidade microbiana dos queijos (GONTIJO et al., 2020). César (2019) identificou os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* e *Cladosporium* em câmaras de maturação de queijarias da Serra da Canastra, provenientes do ar e das prateleiras.

Cabe ressaltar que a prevalência de gêneros fúngicos é distinta em cada tipo de queijo, corroborando a premissa de que não apenas a presença de determinados fungos, mas também sua predominância em relação às outras espécies é fundamental para a identidade de cada produto (DUGAT-BONY et al., 2016). Métodos de detecção que dependem de cultivo acabam não elucidando toda a microbiota dos queijos, causando uma subestimação quanto às espécies ali de fato presentes. Nesse sentido, a metagenômica, por apresentar alta sensibilidade quando comparada aos métodos dependentes de cultura, permite a identificação da microbiota não cultivável e, por conseguinte, a obtenção de resultados mais fidedignos (KAMIMURA et al., 2020).

### **2.3 Metagenômica em pesquisas com produtos lácteos**

O advento de técnicas de sequenciamento de segunda geração permitiram avanço de destaque no estudo de comunidades microbianas nos mais diversos nichos ecológicos, promovendo importantes descobertas acerca de populações dominantes e subdominantes e a dinâmica das mesmas em diferentes ecossistemas, como solos, oceanos, produtos lácteos e até mesmo seres humanos (O’SULLIVAN et al., 2015).

Na última década, houve uma expansão na aplicação de técnicas que dispensam métodos tradicionais de cultura de microrganismos. Essas técnicas, denominadas CIDTs (Culture-independent diagnostic tests), se mostram mais sensíveis, rápidas, reprodutíveis e relativamente mais simples em comparação às técnicas de cultura tradicionais, consideradas laboriosas, sujeitas a contaminantes e relativamente demoradas; permitem, ainda, a identificação de cepas diferentes em uma mesma espécie (FORBES et al., 2017). Já foi relatado que 99% dos microrganismos naturalmente observáveis na natureza não são cultiváveis por técnicas tradicionais em microbiologia (SU et al., 2012).

Estudos com metagenômica buscam identificar microrganismos com ancestrais em comum, unidades taxonômicas operacionais (OTU’s) que são usadas para classificar grupos de microrganismos ou indivíduos relacionados entre si, além de vias metabólicas cuja abundância

difere entre dois ou mais grupos amostrais (SEGATA et al., 2011). Tais estudos ganharam força nos últimos 40 anos, quando Xu et al. (1982) descreveram pela primeira vez um estado fisiológico no qual microrganismos perdem a capacidade de serem cultiváveis *in vitro*, mas sem perder sua viabilidade (*viable but nonculturable microorganisms*).

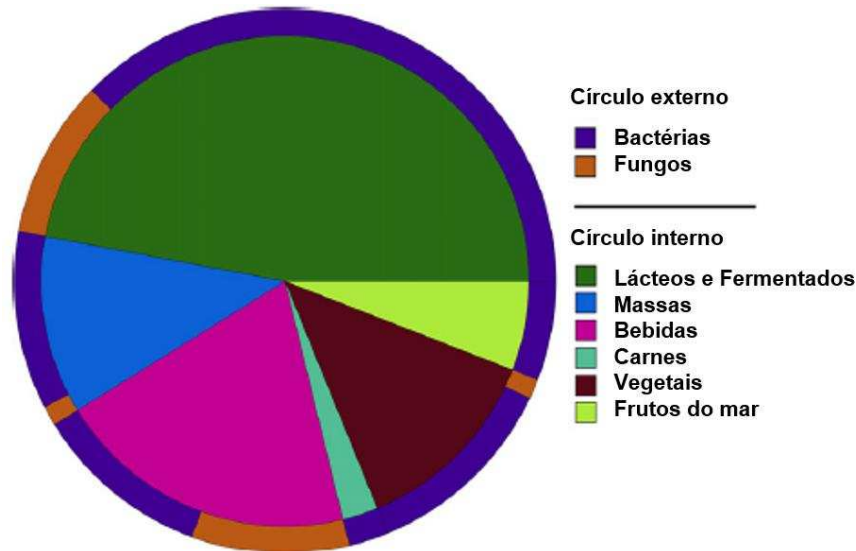
Assim, por muitos anos, a diversidade microbiana nos ecossistemas foi subestimada devido à existência de microrganismos viáveis não cultiváveis (MVNC), fato evidenciado pela discrepância quanto ao número de sequências de DNA presentes em amostras em comparação a técnicas de detecção de microrganismos por culturas tradicionais, que acabam não revelando a presença de MVNC (COWAN et al., 2005). Nesse contexto, uma das maiores alternativas para a pesquisa envolvendo tais microrganismos consiste no uso de ferramentas como a metagenômica (DONG et al., 2020).

Quigley et al. (2013) ressaltam que seu uso reduz a limitação seletiva de microrganismos quando estes são submetidos aos métodos tradicionais de cultivo. Além disso, vários autores promoveram melhorias nas técnicas de metagenômica para estudos envolvendo produtos lácteos ao utilizar substratos na extração de DNA que permitem a separação de DNA de células vivas e mortas, como por exemplo, a aplicação de monoazidas de propídio e etídeo (PAN & BREIDT, 2007; PORCELLATO & SKEIE, 2016; ERIKUS et al., 2016).

Essa ferramenta, além de conferir maior sensibilidade que os métodos de detecção de microrganismos dependentes de cultura, considera o DNA total das amostras analisadas, o que dispensa a necessidade de ampliações por PCR. Com isso, é possível obter não apenas a composição taxonômica dos microrganismos presentes nas amostras, mas também quantificar a abundância de genes microbianos (DE FILIPPIS et al., 2016). Em trabalho realizado por Delcenserie et al. (2014), foi possível identificar 207 filotipos bacterianos diferentes em amostras de queijo Herve, produzido a partir de leite cru. Tal estudo proporcionou um melhor entendimento acerca da participação das bactérias na construção das características deste queijo.

Análises de metagenômica permitem uma abordagem baseada em sequências ou em funcionalidade (seja de vias ou de genes), para estudar comunidades microbianas complexas em determinadas amostras. Para isso, inicialmente é necessário o isolamento do DNA de alguma fonte ou do ambiente de interesse a ser estudado (CULLIGAN et al., 2014). Derivados lácteos, com destaque para queijos, são comumente estudados para determinação da diversidade e dinâmica populacional de microrganismos, sejam procariotos ou eucariotos (Figura 2). Na maioria dos casos, é possível estabelecer uma relação entre a dinâmica populacional dos microrganismos no alimento e suas características organolépticas, o que pode ser de extrema

valia para o produtor, à medida que permite entender como a microbiota do seu ambiente de produção interfere na qualidade do produto final (DE FILIPPIS, et al., 2016).



**Figura 2** – Abundância dos estudos envolvendo metagenômica, conforme a matriz estudada, e o tipo de microrganismo analisado. Adaptado de De Filippis et al. (2016).

Durante o processo de maturação dos queijos artesanais, ocorrem importantes mudanças em termos de dinâmica populacional. Diversos estudos metagenômicos já foram realizados com a finalidade de caracterizar a diversidade microbiológica dos queijos, bem como elucidar qual seria o efeito prático das flutuações na proporção de cada grupo microbiano (SESSOU et al., 2019; GEUGNIEZ et al., 2017; WOLFE et al., 2014).

De acordo como Beresford et al. (2001), o conhecimento acerca das comunidades microbianas no leite cru e na matriz dos queijos durante o processo de fabricação e maturação permite a compreensão acerca de como as características dos queijos variam conforme a atividade e crescimento microbianos. Além disso, a riqueza sensorial e a variedade dos queijos artesanais estão intimamente relacionadas com a microbiota residente, e seu monitoramento lança luz sobre novas abordagens para otimização na produção desses queijos (DOLCI et al., 2010).

Conhecer quais microrganismos estão presentes nos queijos também permite a otimização da cadeia produtiva e maturação de queijos. Estudo realizado por Chombo-Morales et al. (2016) demonstrou a maneira pela qual variáveis como pH, umidade e temperatura permitem o desenvolvimento de BAL, leveduras e fungos filamentosos responsáveis pela produção de

compostos voláteis de maior apreciação em queijo mexicano Cotija. Estudos semelhantes também têm demonstrado essa relação entre microbiota predominante e características desejáveis em queijos artesanais (IRLINGER & MONIER, 2009; TILOCCA et al., 2020).

Almeida et al. (2014) realizaram estudos de metagenômica a fim de sequenciar e catalogar mais de 140 cepas diferentes de bactérias cuja origem parte de produtos lácteos. Com o estudo, foi possível a criação de um banco de dados genômicos de referência para microrganismos frequentemente associados a produtos lácteos, sendo que cerca de 20% das sequências ainda não se mostravam presentes em outras bases de dados. Estudos utilizando sequenciamento de DNA e metagenômica estão evoluindo rapidamente e já são utilizados rotineiramente para caracterização da microbiota de alimentos.

Comunidades microbianas constituídas durante a fabricação e maturação de produtos fermentados representam um conjunto de potenciais ecossistemas que podem ser reproduzidos em estudos com o objetivo de compreender seus complexos processos de formação e, conseqüentemente, seus impactos para a qualidade do produto final (WOLFE et al., 2014). Essas informações podem ser relevantes para produtores de queijos artesanais, sendo importantes para o estabelecimento de um melhor controle de qualidade, algo que vem sendo cada vez mais requisitado por parte de órgãos de controle sanitário e também pelos consumidores (SOBRAL et al., 2017; QUIGLEY et al., 2013).

Além disso, a identificação dos microrganismos-chave na comunidade microbiana pode ajudar a estabelecer quais são os responsáveis pela produção de atributos relacionados ao sabor, à deterioração do alimento, bem como quais as relações de dominância e sub-dominância existentes entre os membros do ecossistema (CASALTA et al., 2009; ZHENG et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, além de BAL, fungos filamentosos e leveduriformes também são encontrados em queijos, sendo responsáveis pela intensa atividade bioquímica em processos de lipólise e proteólise que resultam em características de interesse (GEUGNIEZ et al., 2017; BERESFORD et al., 2001). No entanto, apesar de microrganismos benéficos, há uma parcela de microrganismos que causa efeitos indesejáveis no produto, bem como prejuízos à saúde do consumidor. Além de atividade toxigênica, estudos recentes relataram atividades carcinogênicas e mutagênicas de micotoxinas, principalmente aquelas relacionadas aos gêneros *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (HERNANDEZ-CAMARILLO et al., 2016). Nesse contexto, a metagenômica se apresenta como uma ferramenta mais rápida para detecção de patógenos deterioradores e/ou toxigênicos.

A organização das comunidades microbianas pode ser analisada em um nível local (dentro de uma única comunidade) ou regional (entre diferentes comunidades de

microrganismos). Para que as análises metagenômicas relacionadas à ecologia microbiana possam ser interpretadas de maneira adequada, é necessário aplicar os resultados das análises em métricas específicas de diversidade (FELFILI & FELFILI, 2011; PREHN-KRISTENSEN et al., 2018). O índice de diversidade alfa é responsável por descrever a diversidade de microrganismos a partir da riqueza de sequências de DNA em uma determinada amostra. Em termos práticos, está intimamente relacionada à abundância de microrganismos em amostras de interesse (PREHN-KRISTENSEN et al., 2018). Outra característica inerente à diversidade alfa é o uso do índice Shannon para determinação do número de OTU's (Operation Taxonomic Units) dentro de uma mesma comunidade microbiana, a fim de complementar os dados de riqueza e permitir uma quantificação mais precisa da abundância de indivíduos que compõem um ecossistema (FALENTIN et al., 2016).

Quando é de interesse da pesquisa, é possível realizar a análise da estrutura da comunidade microbiana, destacando as diferenças em sua composição de indivíduos e suas abundâncias entre diferentes comunidades de microrganismos. Para isso, é aplicada a métrica de diversidade beta (FELFILI & FELFILI, 2011). A diversidade beta também pode ser utilizada para avaliar diferenças estruturais de comunidades microbianas ao longo de um gradiente ambiental, ou seja, entre diferentes amostras (NOGUEIRA et al., 2008). Para realizar avaliações de diversidade beta, são utilizados gráficos de coordenadas principais (PCoA) contendo 4 quadrantes separados pelos eixos centrais X e Y, que representam a cobertura da análise (DE MORAES, 2008). Ao longo dos quadrantes, são plotados spots que representam as estruturas de comunidades microbianas. Spots próximos uns dos outros representam comunidades com estruturas de composição semelhantes (TORRES et al., 2018).

De acordo com o exposto, a metagenômica demonstra notável potencial para múltiplas análises de composição microbiana em diversas amostras, incluindo produtos lácteos, com destaque para queijos artesanais. Sendo assim, é possível realizar uma eficiente caracterização da microbiota de queijos artesanais, uma vez que a literatura e bases de dados ainda se mostram escassos quantitativamente para genomas fúngicos, microrganismos relevantes para a formação das características sensoriais do produto.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

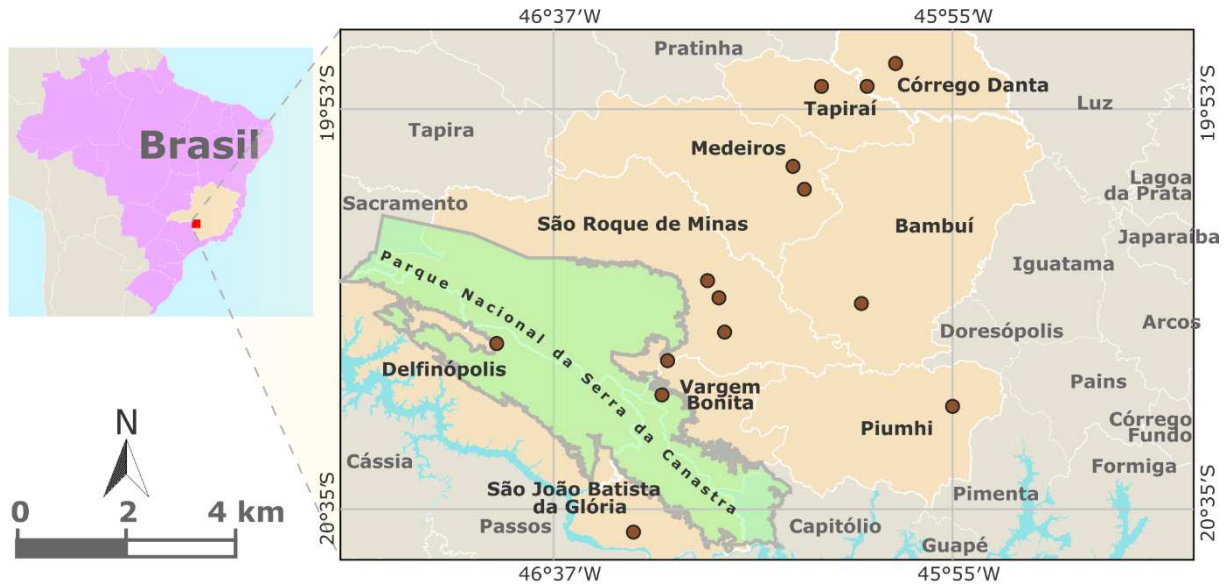
Comparar a microbiota dos queijos artesanais produzidos na Serra da Canastra em diferentes municípios, bem como verificar a presença de uma microbiota core.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

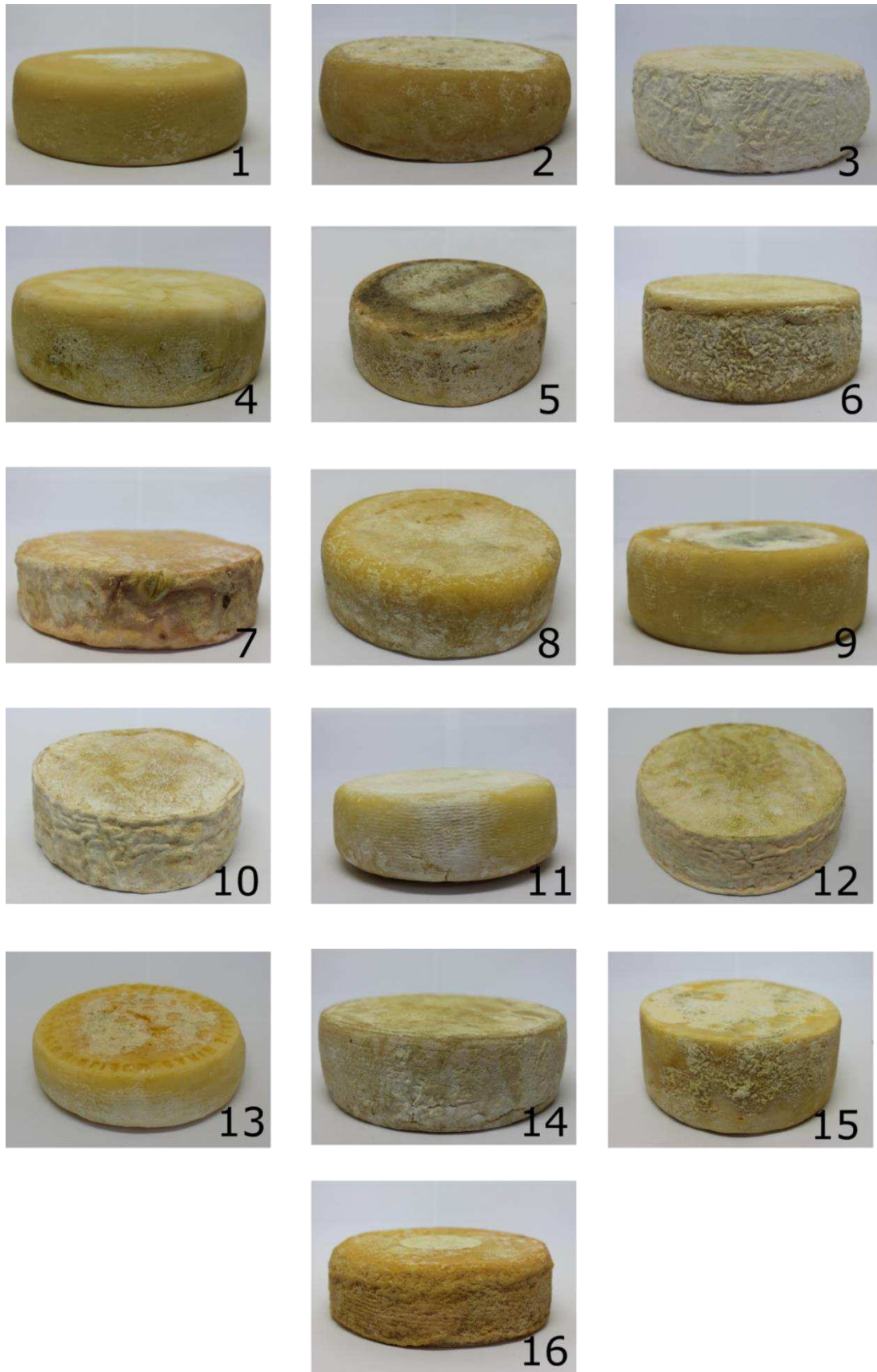
- Avaliar as diferenças populacionais dos fungos de queijos da Canastra por análise metabarcoding da região ITS1;
- Realizar a análise de diversidade fúngica;
- Predizer padrões de interação da comunidade fúngica;
- Predizer o potencial gênico funcional da comunidade.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras de DNA para análise metagenômica foram extraídas de queijos coletados em período chuvoso (novembro de 2018) em dezesseis propriedades produtoras e representativas dos nove municípios da Serra da Canastra, Minas Gerais, distribuídas da seguinte maneira: 4 propriedades no município de São Roque de Minas, 3 em Medeiros, 2 em Vargem Bonita e Tapiraí e 1 em Piumhi, Córrego D'anta, São João Batista da Glória, Delfinópolis e Bambuí (Figuras 3 e 4). Dados acerca das propriedades produtoras incluídas neste trabalho se encontram na Tabela 1. Para efeitos de classificação, queijos submetidos à etapa de raspagem foram considerados como QMA; queijos contendo fungos em sua superfície, que não passaram pelo processo de toalete, foram aqui referenciados como queijos artesanais de Minas (QAM).



**Figura 3** – Municípios que compreendem a região da Serra da Canastra, MG (em negrito). Pontos em marrom indicam as propriedades produtoras de queijos artesanais nas quais realizou-se a coleta das amostras.



**Figura 4** – Amostras de queijos artesanais coletadas em: São Roque de Minas (1, 2, 5 e 6); Vargem Bonita (3 e 4); Piumhi (7); Medeiros (8, 9 e 12); Córrego D'anta (10); Tapiraí (11 e 13); Bambuí (14); São João Batista da Glória (15) e Delfinópolis (16).

**Tabela 1** – Informações acerca das propriedades produtoras dos queijos Minas artesanais (QMA) e dos queijos artesanais de Minas (QAM) analisados.

PROPRIEDADE	MUNICÍPIO	COORDENADAS	ELEVAÇÃO	QMA	QAM
1	São Roque de Minas	S20 11 09.1 W46 21	716 m	X	
2	São Roque de Minas	S20 13 18.7 W46 20	826 m	X	
3	Vargem Bonita	S20 20 05.3 W46 25	814 m		X
4	Vargem Bonita	S20 23 36.6 W46 26	1136 m	X	
5	São Roque de Minas	S20 17 02.9 W46 19	864 m		X
6	São Roque de Minas	S20 17 02.9 W46 19	870 m		X
7	Piumhi	S20 24 36.6 W45 55	784 m		X
8	Medeiros	S20 02 03.9 W46 11	824 m	X	
9	Medeiros	S19 59 41.3 W46 12	840 m	X	
10	Córrego D'anta	S19 48 26.5 W46 01	713 m		X
11	Tapiraí	S19 50 56.7 W46 09	950 m	X	
12	Medeiros	S19 50 56.8 W46 09	1131 m	X	
13	Tapiraí	S19 54 04.8 W46 04	724 m	X	
14	Bambuí	S20 37 50.9 W46 29	741 m		X
15	S. João Batista do Glória	S20 17 42.2 W46 43	797 m		X
16	Delfinópolis	S20 13 59.0 W46 05	808 m	X	

#### 4.1 Isolamento dos fungos dos queijos artesanais da Canastra

Para isolamento dos fungos a partir dos queijos, foram utilizadas duas técnicas: a técnica do suabe e o isolamento direto. Na primeira, a coleta do material utilizando-se suabe foi realizada em toda a superfície do queijo. O suabe foi, então, transferido para tubos contendo 10 mL de água salina 0,85%, de onde foram realizadas 5 diluições seriadas. Posteriormente, foram pipetados 100 µL das três últimas diluições e transferidos para placas de MEA, no qual as amostras foram espalhadas na superfície do meio utilizando a técnica de spread plate. As placas foram incubadas a 25° C durante 7 dias. No isolamento direto, pequenos fragmentos dos queijos foram selecionados a partir de regiões com colorações diferenciadas. Posteriormente, com o auxílio de uma lupa, foi observado se os fragmentos escolhidos apresentavam estruturas vegetativas ou reprodutivas dos fungos. As respectivas estruturas foram transferidas com o auxílio de uma alça de repicagem estéril para placas contendo MEA. A partir de cada fragmento

de queijo, três repiques foram feitos em meio MEA em pontos equidistantes da placa. As 26 placas foram incubadas a 25° C durante 7 dias. As colônias obtidas utilizando ambas as técnicas foram repicadas para meio MEA visando à obtenção de culturas puras.

#### **4.2 Manutenção dos isolados**

Após a obtenção das culturas puras em meio MEA, os isolados foram repicados de placas para tubos, no intuito de construir um banco de culturas fúngicas típicas associadas ao queijo artesanal da Canastra, que foram mantidas sob refrigeração. Os fungos foram repicados periodicamente para se evitar o ressecamento.

#### **4.3 Extração de DNA para metagenômica**

No intuito de identificar os fungos presentes nos queijos coletados, 400 mg de cada amostra foram transferidos para tubos contendo 700 µl de tampão de lise SL1 e pérolas de cerâmica, seguido de extração utilizando-se kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Alemanha). A lise foi realizada utilizando homogeneizador de tecidos (Precellys®, Maryland, USA) durante 50 segundos a 4.000 rpm. As etapas posteriores de purificação foram realizadas conforme as recomendações do fabricante. Após extração do DNA metagenômico, a integridade do mesmo foi avaliada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo revelado em fotodocumentador Locus®. A concentração de DNA (ng/µl) e as relações A260/A230 e A260/A280 foram avaliadas em nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop®, USA).

#### **4.4 Construção e sequenciamento da biblioteca de amplicons**

A região ITS1 foi amplificada utilizando os primers ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'). Adaptadores universais Illumina e barcodes foram ligados às extremidades 5' de cada primer. As condições de amplificação e a construção da biblioteca seguiram os protocolos estabelecidos por Smith & Peay (2014). A quantificação dos produtos de PCR foi realizada por fluorimetria no equipamento Qubit 4.0 (Invitrogen). A montagem do pool contendo todos os produtos de PCR foi realizada de modo que a concentração final da biblioteca fosse de 2 nM. O

sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina MiSeq 2x250 pb, totalizando 250 ciclos de reação para cada fita.

#### **4.5 Análise dos dados**

As reads obtidas a partir do sequenciador foram inicialmente demultiplexadas, aparadas nas extremidades para remoção dos primers usando o software QIIME2 (BOYLEN et al., 2019). As regiões flangeadoras 18S e 5.8S foram removidas utilizando o ITSx (BENGTSSON-PALME et al., 2013). A remoção de singletons, quimeras, determinação de ASVs (Amplicon Sequence Variance) e a anotação taxonômica foram realizadas usando o QIIME2 (BOYLEN et al., 2019).

A avaliação da riqueza, equitabilidade e diversidade alfa foi realizada utilizando o pacote Phyloseq no software R (v. 3.5.3). A diversidade beta foi avaliada via análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na matriz de distâncias de Bray-Curtis através da biblioteca Vegan 2.5.6 (OKSANEN et al., 2019).

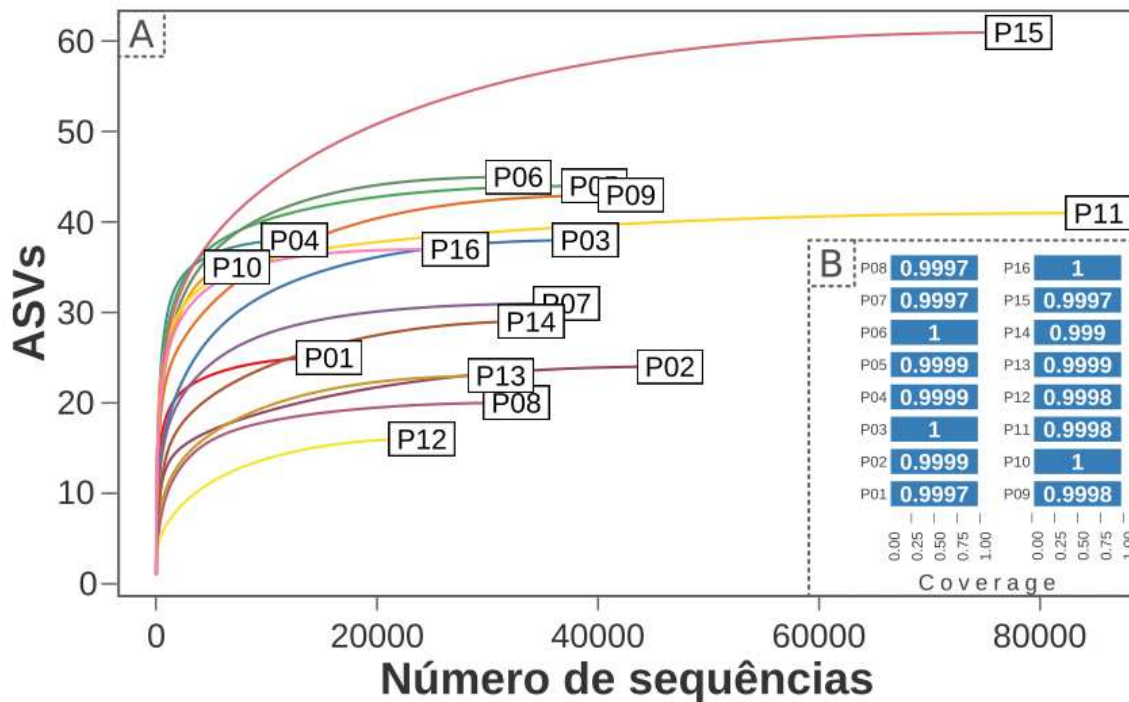
A predição das possíveis interações fúngicas foi realizada através do cálculo de correlações do tipo SparCC (FRIEDMAN & ALM, 2012). A significância de cada correlação foi realizada através de 1000 reamostragens da matriz de dados. Somente relações significativas ( $p\text{-value} < 0.01$ ) foram utilizadas para montagem da rede. Todos os cálculos foram realizados pelo programa FastSpar (WATTS et al., 2019) e a plotagem da rede no pacote Igraph (CSARDI & NEPUSZ, 2006).

Para obtenção de maiores informações sobre o potencial gênico funcional de fungos presentes nas amostras analisadas, foi realizada predição funcional através da reconstrução filogenética do estado não observado da comunidade fúngica pelo programa PICRUSt 2.1.2 (DOUGLAS et al., 2019). Todas as predições com NSTI maior que 2.0 foram excluídas para maior robustez da análise.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No total, 2.267.262 sequências foram obtidas, com média de aproximadamente 47.235 sequências por amostra. Após remoção de sequências de baixa qualidade (maximum expected error = 0.5) e quiméricas, as 585.614 sequências remanescentes foram agrupadas em 211 Amplicon Variance Sequences (ASVs).

A Figura 5 representa as Curvas de Rarefação para cada uma das propriedades avaliadas. Os dados de sequenciamento foram adequados para a realização de análises subsequentes, uma vez que para todas as propriedades o número de ASVs tendeu a atingir um platô, indicativo de que a amostragem foi suficiente para estimar a diversidade de cada propriedade.



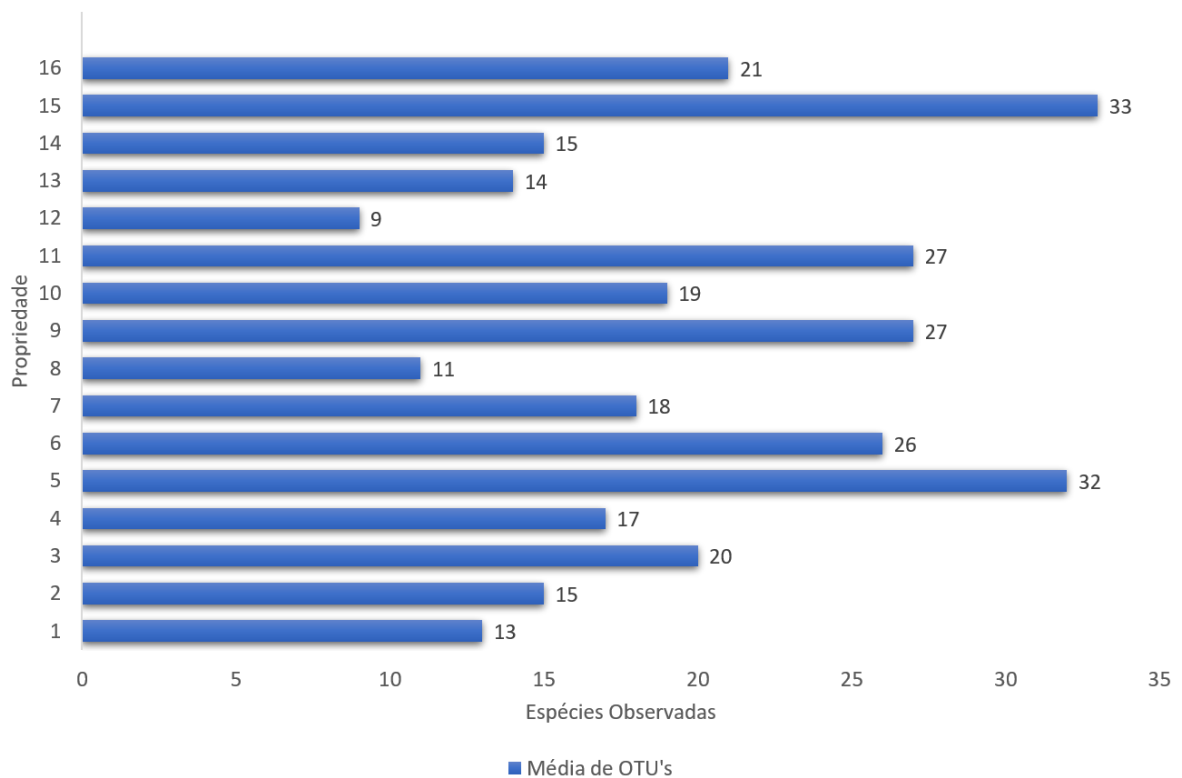
**Figura 5** - (A) Curvas de rarefação do número de ASVs em função do número de seqüências obtidas no sequenciamento para cada propriedade. Curvas que tendem ao platô indicam bom esforço amostral. (B) Índice de esforço amostral para cada propriedade. Valores acima de 0.95 representam esforço amostral suficiente para descrever a diversidade das amostras.

### 5.1 Análise de diversidade alfa

Os procedimentos adotados para a análise de diversidade revelaram um padrão de aumento de riqueza, diversidade e equitabilidade das amostras conforme as mesmas estavam situadas em propriedades distintas, sendo que quanto mais elevada se encontrava a propriedade, maiores foram os índices de diversidade alfa. Este padrão também se mostrou intrinsecamente relacionado ao modo de produção do queijo, sendo que os valores dos índices de diversidade alfa se mostraram mais elevados em propriedades nas quais não era feita a raspagem dos queijos para remoção dos fungos em sua superfície.

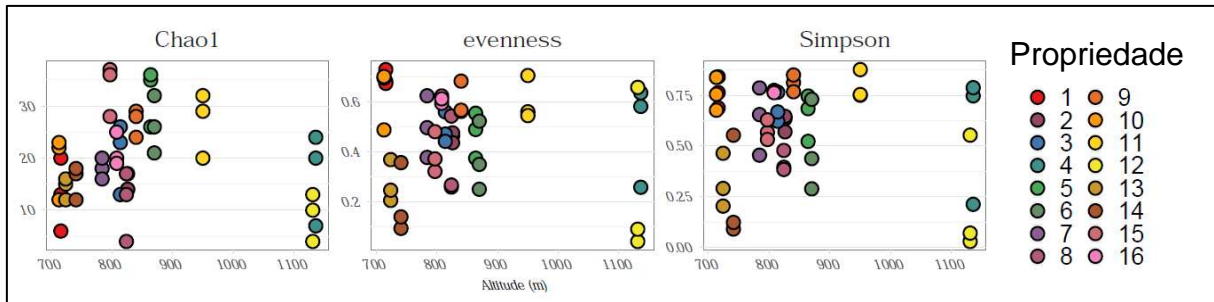
O índice Chao 1, relacionado à riqueza de OTU's presentes em cada amostra, ou seja, ao número de espécies identificadas com base no sequenciamento, revelou uma variada riqueza de

fungos em determinados queijos. Por conta de características do processo artesanal de fabricação dos queijos, como fermento endógeno não padronizado, bem como ambiente do processamento, pode-se sugerir a ocorrência de diferenças quanto à riqueza de espécies em queijos produzidos em diferentes localidades (Figura 6).



**Figura 6** – Média de Unidades Taxonômicas Operacionais obtidas por propriedade.

Os resultados mostram uma concentração no aumento da riqueza de OTUs – ou riqueza de espécies – nos queijos produzidos entre 800 e 1.000 metros de altitude (Figuras 6 e 7). Nessas propriedades, alguns dos produtores de queijos artesanais não realizavam a raspagem dos seus produtos, dada uma nova tendência de mercado que valoriza queijos contendo fungos em sua superfície. Trabalhos acerca da diversidade fúngica em queijos artesanais produzidos em diferentes altitudes são escassos. Entretanto, há vários estudos com essa abordagem envolvendo bactérias. Para estes, variação semelhante de diversidade foi observada em diferentes altitudes para queijos Feta, Darfiyeh e Qula (BOZOUDI et al., 2016; SERHAN et al., 2009; DUAN et al., 2008).



**Figura 7** – Análise de Riqueza, Equitabilidade e Diversidade das amostras de QMA.

Esse padrão de aumento de riqueza de espécies fúngicas já foi relatado em ambientes de diferentes altitudes, como florestas na Malásia, nas quais a umidade, a movimentação do ar e a pressão atmosférica mostraram-se distintos e influenciaram na ocorrência de uma maior variedade de fungos (GEML et al., 2017). Velázquez et al. (2016) identificaram diferenças significativas na composição de riqueza micorrízica em elevações de 800 metros até 2005 metros acima do nível do mar, em um parque nacional da Argentina. Observou-se também aumento na precipitação anual em regiões de maior altitude, corroborando a hipótese de que a umidade maior em ambientes mais elevados favorece o desenvolvimento de uma diversidade maior de fungos (DEVI et al., 2012). Dessa forma, é possível sugerir que a altitude seja um fator que potencialize a capacidade de colonização e consequente dispersão de fungos em queijos que não passam pelo processo de raspagem. Ainda segundo Velázquez et al., (2016), não houve uma relação entre os filos dos fungos e a altitude das propriedades, estando presentes tanto o filo Basidiomycota quanto Ascomycota de maneira indiscriminada, independente da altitude, o que também foi observado no presente estudo.

Além da altitude e método de produção, fatores como composição do solo e de pastagem também influenciam significativamente na riqueza de espécies fúngicas. Panelli et al. (2013) detectaram maior riqueza de OTUs em leite fresco produzido em propriedades produtoras de queijos artesanais situadas em maior altitude. Os queijos analisados nessas propriedades, consequentemente, apresentaram maior riqueza e diversidade.

QMA com baixa riqueza de espécies, como aqueles produzidos nas propriedades 1, 2, 4, 8, 9, 11, 12, 13 e 16, não apresentavam grande número de colônias visíveis na superfície, conforme pode ser observado na Figura 4. Alguns produtores tradicionais lavam ou escovam os queijos com frequência para impedir o desenvolvimento de fungos, o que resulta em uma alteração da composição microbiana final do queijo. Sendo assim, mesmo estando localizadas em altitudes intermediárias, o queijo ainda pode apresentar índices de diversidade alfa

inferiores. Portanto, é importante ressaltar que a queda dos índices nesses casos não decorre unicamente do fator altitude em si, como evidenciado por vários estudos (GEMPL et al., 2017; VELÁZQUEZ et al., 2016; PANELLI et al., 2013), mas também à ação desses produtores em específico, uma vez que preferem, pelo perfil dos seus consumidores, comercializar os queijos sem grande quantidade de fungos na casca.

Queijos que apresentaram um maior número de espécies pela análise metagenômica (propriedades 15, 6 e 9) apresentavam colônias de colorações diversificadas em sua superfície, com uma grande diversidade visual de fungos. O modelo tradicional de fabricação não apenas do QMA, mas de todos os queijos artesanais que não se utilizam de culturas iniciadoras comerciais, é caracterizado por uma elevada manipulação por parte dos produtores. Além disso, a exposição ao ambiente interno das câmaras de maturação é o cenário ideal para a deposição de esporos fúngicos e bacterianos nas matrizes dos queijos, permitindo, assim, o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas em queijos distintos, como os fabricados por diferentes produtores e em diferentes localidades. (DIAS et al., 2019).

O índice de equitabilidade assume um valor entre 0 e 1, sendo 0 uma amostra com uma baixa homogeneidade na distribuição de espécies e 1 para uma proporção igual de espécies dentro de uma mesma amostra, apresentando uma comunidade homogênea. Dentre as amostras de queijo analisadas, as fornecidas pelas propriedades 1 e 10 apresentaram os mais altos índices de equitabilidade, atingindo a marca de 0,73 e 0,70, respectivamente, apresentando também um número de espécies relativamente próximo quando comparado às outras amostras, levando em conta a anotação do número de OTU's presentes.

Nenhuma amostra forneceu um índice de equitabilidade nulo. Entretanto, foi detectada uma baixa equitabilidade na propriedade 12, em Medeiros, localizada a 1131 metros de altitude, que também não apresentou uma elevada média de OTUs observáveis. A equitabilidade, assim como o índice Chao 1 de riqueza, parece estar relacionado com o modo de produção dos queijos, sugerindo também participação da altitude como fator secundário, concentrando os valores em uma média de aproximadamente 0,5, podendo ser elevados até a marca de 0,6 para propriedades localizadas entre 800 e 1000 metros de altitude (Figura 7).

Ao analisar comparativamente a riqueza individual de cada amostra de QMA com sua respectiva equitabilidade, foi constatado que as amostras com maior riqueza de espécies também apresentaram uma alta equitabilidade, sendo indicativo da presença de uma complexa comunidade microbiana, e que os integrantes da mesma interagem entre si, o que não permite uma dominância de determinadas espécies do conjunto. Além disso, é razoável sugerir que a

comunidade presente em tais queijos possua vias metabólicas que se complementam, contribuindo para sua estrutura.

Em queijos com baixa riqueza, a equitabilidade apresentou valores mais discretos, o que é sugestivo de um cenário de dominância de algumas espécies sobre outras, como por exemplo na relação de co-exclusão entre *Debaryomyces* e *Trichosporon* (Figura 9). Além disso, amostras com uma baixa equitabilidade podem ser sugestivas de microrganismos que se desenvolvem sem competição pelo mesmo substrato. Situações de dominância de algumas espécies sobre outras é algo comum em praticamente todo ecossistema de microrganismos, sejam eles procariotos ou eucariotos, sendo que para queijos artesanais, há predominância de determinadas leveduras e bactérias que direcionam o queijo para uma correta maturação (ŠURANSKÁ et al., 2016).

O índice Simpson (D) mede a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente em uma amostragem serem pertencentes à mesma espécie (ou outra categoria que não seja espécie). Como a medida é probabilística, valores próximos à zero indicam uma elevada diversidade, tendendo ao infinito quando a mesma é igual à zero. Por outro lado, valores próximos à 1 representam uma baixa diversidade. Para ser mais intuitivo, o valor do índice Simpson foi subtraído de uma unidade ( $1 - D$ ) para gerar o Índice de Diversidade Simpson. Neste caso, os valores de zero e um representam o oposto, uma vez que agora os valores dizem respeito a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente na amostragem pertencerem a espécies distintas.

Os valores obtidos da análise de diversidade dos queijos artesanais revelaram a mesma relação intrínseca com o modo de produção – com ou sem raspagem da casca dos queijos – além de sugestiva influência da altitude das propriedades, previamente mencionado para as métricas supracitadas. Majoritariamente, os valores concentrados acima de 0,5 foram obtidos de queijos de propriedades em altitudes intermediárias, onde também se localizavam as propriedades nas quais os produtores tendiam a fugir do tradicionalismo e comercializar os queijos com casca florida (Figura 7).

As propriedades 12 e 14, situadas em Medeiros e Bambuí, respectivamente, apresentaram os menores índices de diversidade Simpson de todas as amostras. Em Medeiros, dois dos três queijos coletados apresentaram valores de diversidade de 0,03 (3%) e 0,07 (7%). A terceira amostra apresentou uma diversidade mais significativa, de 0,55, sendo condizente com uma equitabilidade de 0,66. Apesar de divergência entre amostras dessa mesma propriedade, César (2019) não observou colonização aparente na superfície dessas amostras.

Nos queijos produzidos em Bambuí, a ausência de colônias de colorações variadas na superfície foi condizente com seus baixos valores de diversidade. É importante ressaltar que a maioria das amostras apresentou valores de diversidade, riqueza e equitabilidade razoavelmente próximos entre diferentes amostras de uma mesma propriedade. Notavelmente, para todos os índices de diversidade alfa, os valores ficaram próximos uns dos outros em elevações que variam entre 800 e 1.000 metros conforme exposto na Figura 7, e também na análise de coordenadas principais (Figura 11). Isso reforça a hipótese de que em altitudes intermediárias há um maior controle de dispersão dos fungos no ambiente das queijarias e entre as amostras, uma vez que correntes de ar e umidade relativa também podem favorecer a proliferação dos fungos.

Ao cruzar os dados de Equitabilidade com os dados gerados pelo Índice de Diversidade Simpson, foi constatada uma relação diretamente proporcional entre ambos, sendo, portanto, sugestivo de que quanto mais espécies estão presentes em uma determinada amostra, maior será também o equilíbrio na distribuição dos indivíduos na comunidade. Dados obtidos por Zheng et al. (2018) também revelaram altos índices Simpson e de equitabilidade durante a maturação de queijos artesanais chineses do tipo Kazak. Tal equilíbrio na comunidade foi fundamental para atingir as características de aroma e sabor que tornam esse queijo artesanal tão peculiar.

Outros estudos também reforçam a composição da microbiota como fator fundamental para uma boa maturação de queijos artesanais, seja por conta das propriedades proteolíticas e lipolíticas das enzimas produzidas pelos fungos, seja pela proteção que os mesmos conferem na superfície dos queijos, impedindo o desenvolvimento de espécies deteriorantes. Ter essa microbiota em equilíbrio é fundamental para que a qualidade e segurança microbiológica sejam alcançadas (LEGGIERI et al., 2020; IRLINGER & MOUNIER, 2009).

Os principais gêneros fúngicos identificados pela análise metagenômica são apresentados na Figura 9. O gênero *Debaryomyces* foi o mais prevalente dentre todos os fungos identificados, seguido de *Trichosporon*, *Fusarium*, *Candida*, *Diutina*, *Aspergillus* e *Sarocladium*. Fungos cujos gêneros não foram identificados através do alinhamento das sequências com os bancos de dados foram detectados nas propriedades 1, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 16.

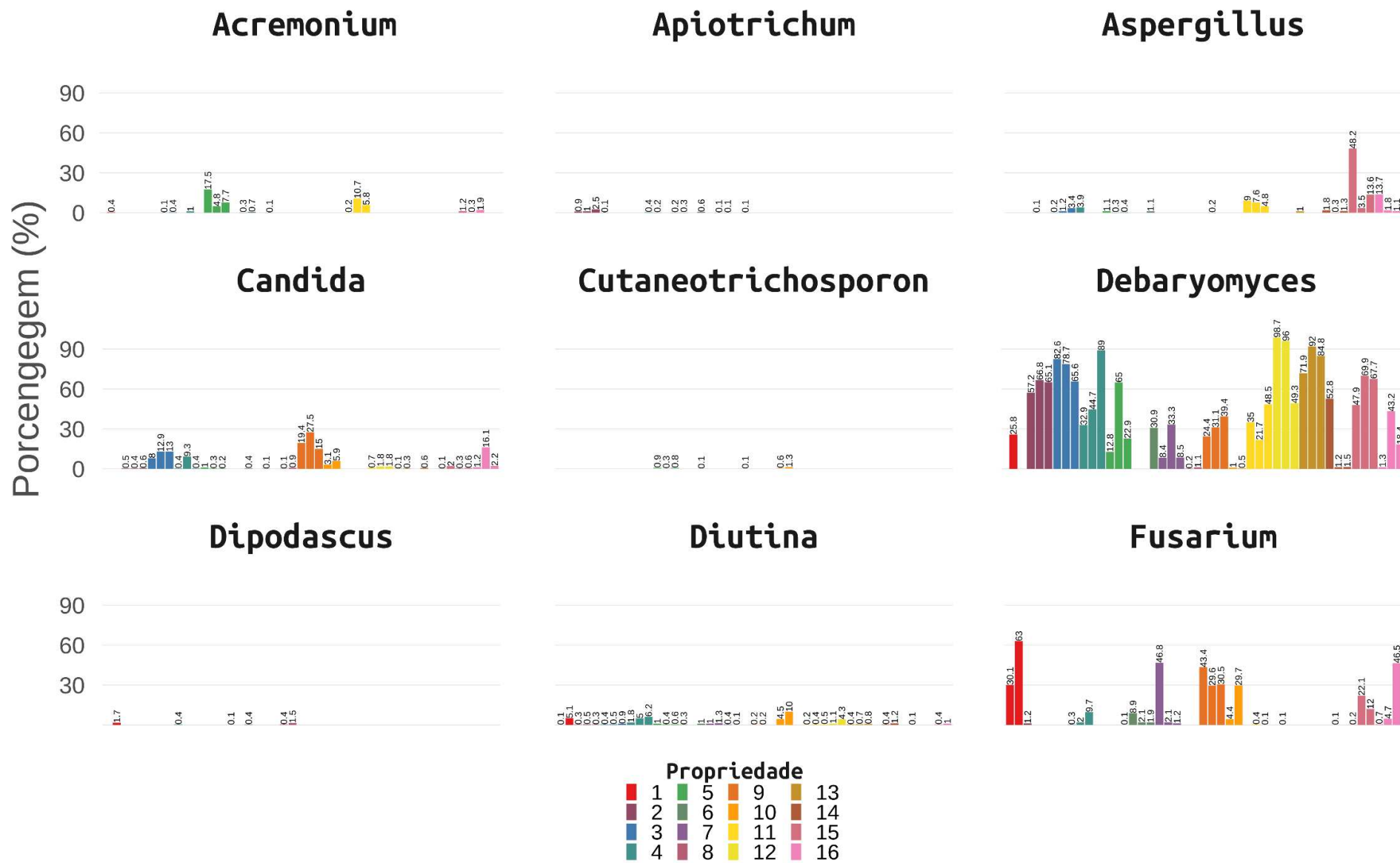
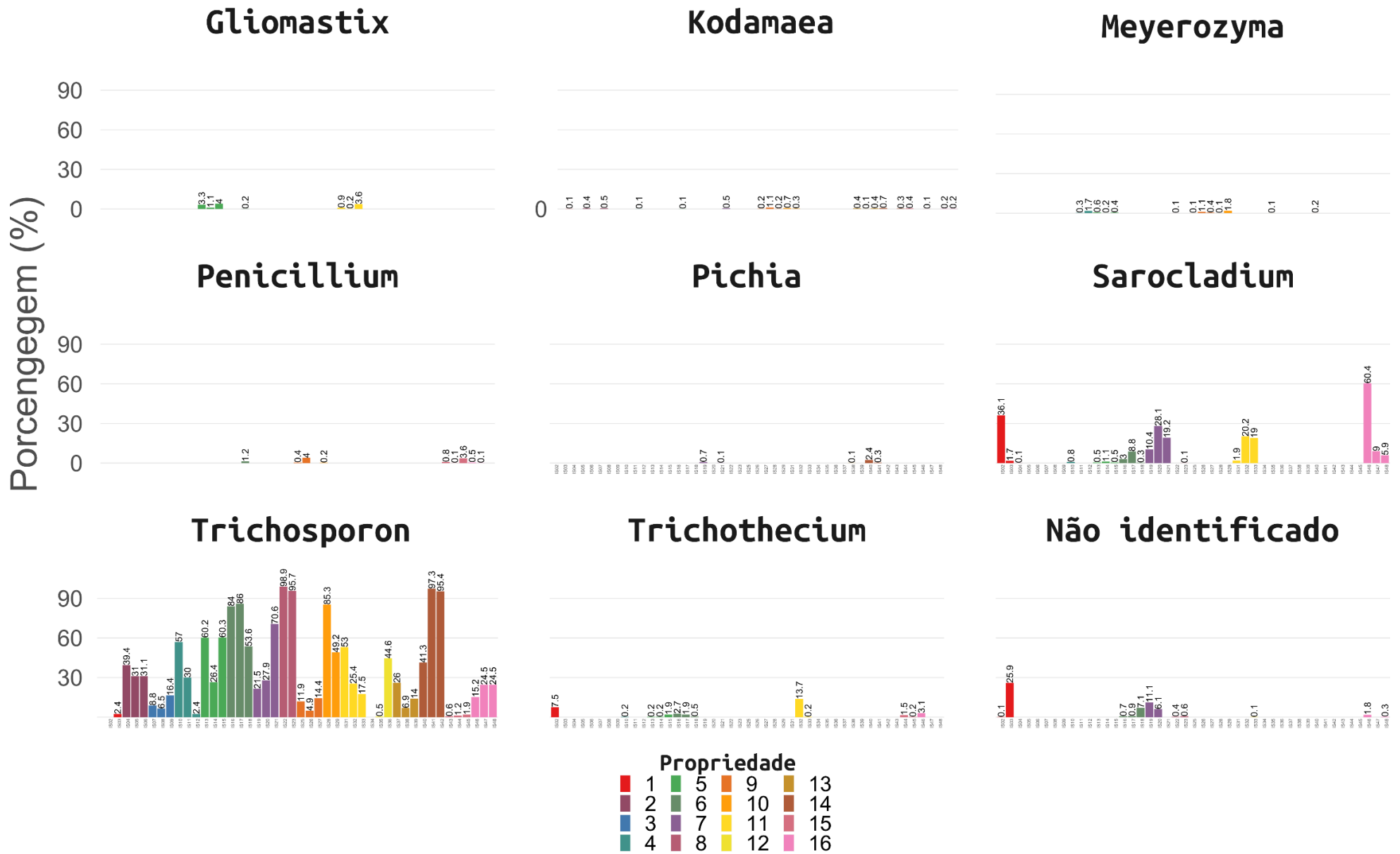
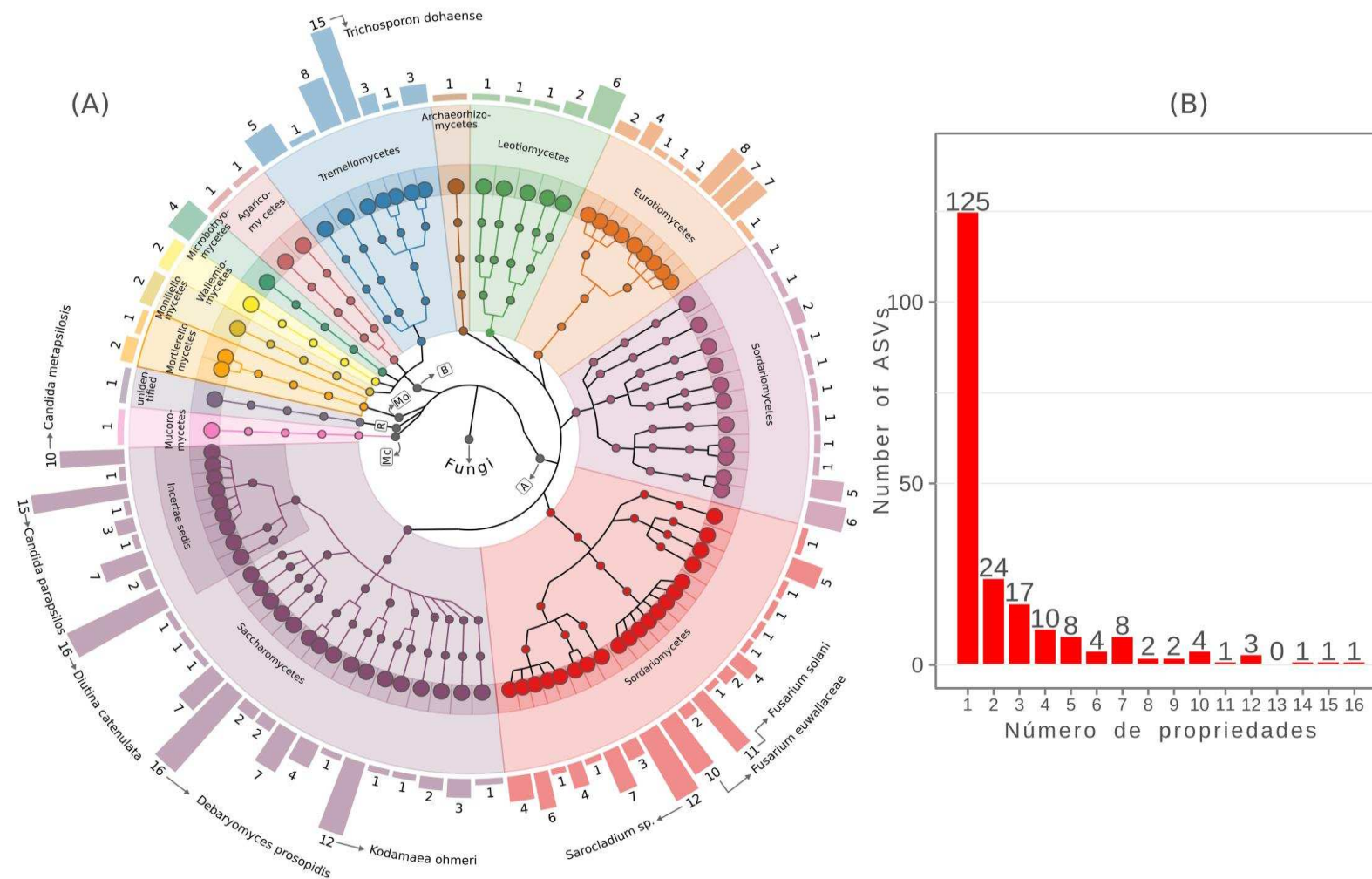


Figura 9 – Distribuição dos gêneros fúngicos mais prevalentes dentre as 16 propriedades da Canastra produtoras de queijos artesanais (continua).



Os gêneros *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Candida* e *Diutina* estão presentes em todas as propriedades produtoras de QMA, podendo, portanto, ser considerados como uma microbiota core do QMA da Canastra; assim, sua presença em todas as amostras de queijos provenientes das cidades que compõem a microrregião da Canastra sugere que estes gêneros fúngicos desempenham algum papel fundamental na identidade desses queijos (Figura 10).



**Figura 10** - Dendrograma com as principais espécies fúngicas identificadas nas 16 propriedades (A). Setores com cores distintas representam diferentes classes de fungos. Barras externas ao cladograma representam o número de propriedades em que a espécie fúngica foi detectada. Apenas as espécies que ocorrem em 10 ou mais propriedades são apresentadas. (B) Número de ASVs detectadas por número de propriedades. A = Ascomycota; B = Basidiomycota; Mo = Mortierellomycota; Mc = Mucoromycota; R = Rozellomycota.

Leveduras são comumente detectadas ao longo de toda a cadeia produtiva dos queijos artesanais, tanto na massa quanto nas culturas endógenas utilizadas na fabricação (NÓBREGA, 2007). Tais leveduras podem ter múltiplas origens, como leite, contato com os produtores, e até mesmo como parte da microbiota das instalações nas quais o queijo é fabricado. Lima et al. (2009) detectaram uma elevada prevalência de leveduras do gênero *Candida* e *Debaryomyces* em QMA da microrregião da Serra do Salitre, cuja presença está de acordo com o presente estudo, mesmo que para regiões geográficas distintas.

O gênero *Debaryomyces* é um dos principais fungos integrantes da microbiota das mamas das vacas (ANDREWS et al., 2019), o que pode estar relacionado à alta prevalência em todos os queijos analisados entre as propriedades. Apesar disso, o gênero não parece estar relacionado com casos de mastite bovina, o que não representa um risco para os animais e para a qualidade da matéria-prima utilizada na fabricação do QMA (SUZUKI et al., 2011; ANDREWS et al., 2019).

A produção de voláteis também é característica do gênero *Debaryomyces*, tendo sido detectados 5 compostos voláteis produzidos por *Debaryomyces hansenii*, como ácido octanoico e ácido hexanoico, oriundos da atividade lipolítica desta levedura, além de 2-metil-ácido butanoico, 3-metil-1-butanol e 2-heptanol, possivelmente oriundos da atividade proteolítica e da oxidação de ácidos graxos. A levedura é uma das primeiras a se desenvolver em queijos artesanais, logo no início do período de maturação, substituindo as bactérias acidoláticas previamente dominantes (Bertuzzi et al., 2018).

*Debaryomyces* também é descrito como um dos principais constituintes da microbiota da casca de queijos maturados. Isso se dá pelo fato de que essa levedura obtém vantagem sobre outros microrganismos, uma vez que tolera altas concentrações de NaCl, baixo pH, além de utilizar lactato como uma das principais fontes de carbono (GORI et al., 2012), sendo compatível com o ambiente recém formado por bactérias acidoláticas presentes na microbiota do leite utilizado na fabricação do queijo (LECLERCQ-PERLAT et al., 2004). Também há a descrição da produção de compostos capazes de inibir o crescimento de diversos outros fungos, incluindo gêneros de relevância para a saúde (GORDIAN et al., 2013), reduzindo também a proliferação de patógenos alimentares e deteriorantes.

O gênero *Trichosporon* também se mostra um importante integrante do consórcio de microrganismos responsáveis pelos processos fermentativos. Além de queijos artesanais, como mostram os resultados deste estudo, há relatos de diversas espécies envolvidas na fermentação de tempeh (um fermentado indonésio à base de soja), como *T. asahii*, *T. gracile* e *T. ovoides*

(MOUNIER et al., 2017; PANGASTUTI et al., 2019). Por compartilhar de um fenótipo halotolerante, similar ao gênero *Debaryomyces*, *Trichosporon* também foi encontrado em salmouras oriundas da produção de queijos artesanais (VERMOTE et al., 2018). Características do próprio QMA da Canastra também favorecem o desenvolvimento de *Trichosporon*, como umidade de aproximadamente 40% e pH ligeiramente ácido – entre 5 e 6 (RESENDE et al., 2011).

Além do queijo da Canastra, *Trichosporon* já foi descrito em queijos dinamarqueses, como o Blue Veined, desde os primeiros dias de maturação, tanto na casca quanto no interior, prevalecendo até o final da maturação, em torno de 28 dias. Este fungo também parece desempenhar funções relevantes na degradação de compostos orgânicos para assimilação de diversas fontes de carbono, como glicose, sacarose, lactose, maltose, lactato, entre outros (TEMPEL & JAKOBSEN, 1998). Por usar lactato como uma de suas fontes de carbono, assim como o gênero *Debaryomyces* previamente descrito, sugere-se que estes dois fungos estejam em uma relação de equilíbrio, ao mesmo tempo em que dificultam a proliferação de outros gêneros fúngicos.

O gênero *Candida* foi encontrado nos queijos de todas as propriedades, porém, em uma menor proporção quando comparado aos demais gêneros. De fato, espécies como *C. catenulata* e *C. intermedia* foram relatadas como “encontradas ocasionalmente” em queijos de casca florida, oriundas comumente do ar das câmaras de maturação e da pele de produtores de queijos (MOUNIER et al., 2006). Por conta de sua baixa frequência entre os queijos das diferentes propriedades, sugere-se que *Candida* não desempenhe um papel fundamental para a maturação do queijo em si, mas possivelmente para manter o equilíbrio entre os demais integrantes da comunidade, como já foi relatado em estudo realizado por Tilocca et al. (2020). *Candida* também foi identificado em leite cru de diferentes animais, como cabras, vacas e búfalos (MONTEL et al., 2014); os autores apontaram uma elevada riqueza de OTU's para o gênero nas amostras avaliadas. Já em estudo realizado na Serra da Canastra, a riqueza de *Candida* foi mais discreta, estando sempre associada à alta riqueza de *Debaryomyces* e *Trichosporon* (SOBRAL et al., 2017).

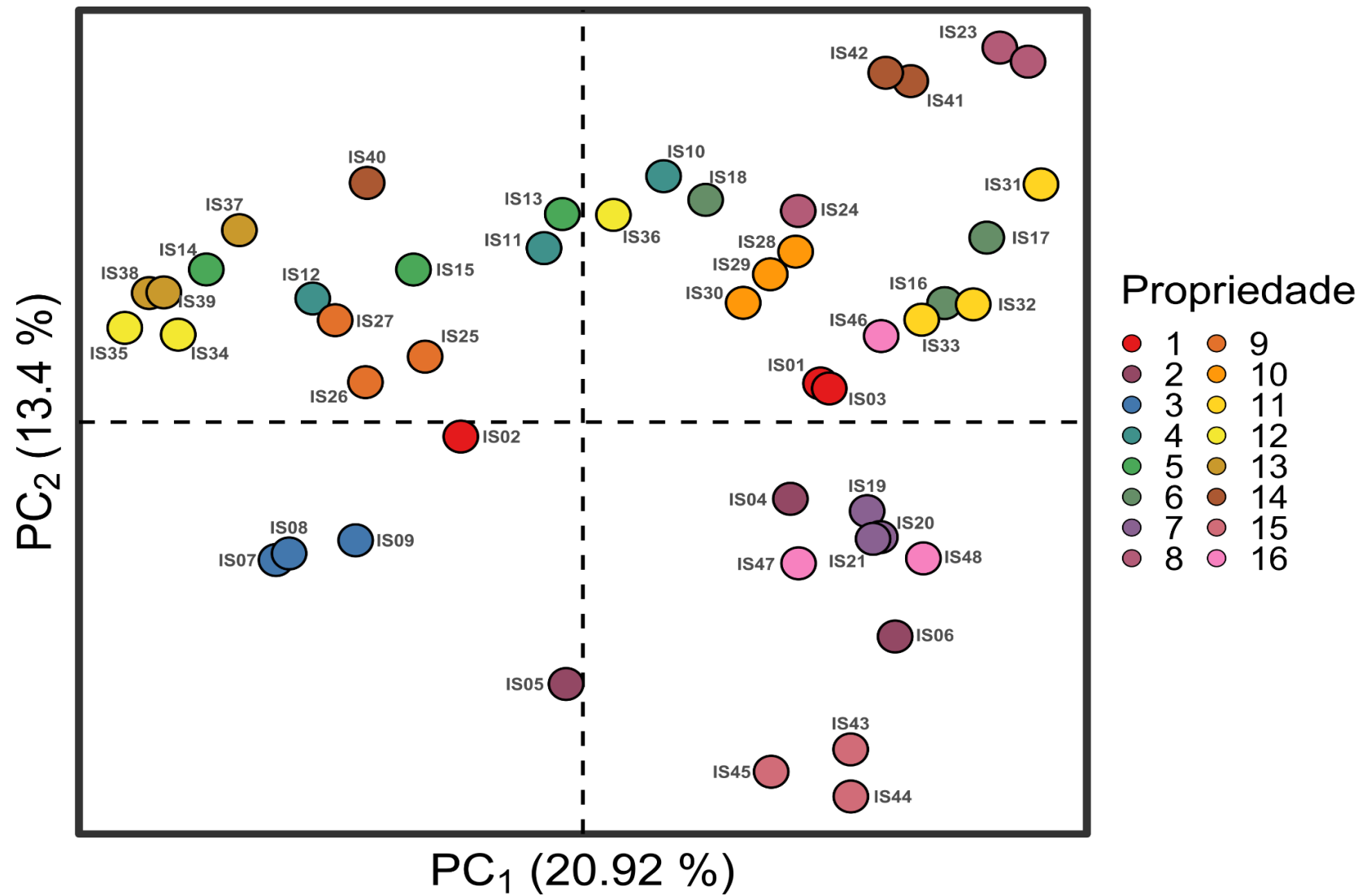
O gênero *Diutina* também foi identificado; a única espécie presente nos queijos foi *Diutina catenulata*, também catalogada como *Candida catenulata*, sendo descrita por alguns autores como um contaminante de produtos lácteos (NAHIDUL-ISLAM et al., 2018; O'BRIEN et al., 2018). Entretanto, segundo os autores, esta levedura é comumente encontrada no leite, apesar de relatos de infecções superficiais e profundas serem eventualmente causadas por este

microrganismo. Apesar dos queijos da Canastra apresentarem *D. catenulata* em todas as propriedades, isso não representa, necessariamente, uma ameaça à qualidade do queijo artesanal e riscos ao consumidor, uma vez que é notável a baixa frequência dessa levedura entre os queijos, possivelmente devido à elevada prevalência de *Debaryomyces* e *Trichosporon*, que resulta em uma competição por nutrientes, na qual *Diutina* não consegue prevalecer.

Outros gêneros fúngicos detectados, como *Acremonium*, *Apiotrichum*, *Cutaneotrichosporon*, *Dipodascus*, *Gliomastrix*, *Kodamaea*, *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Pichia* e *Trichothecium* apresentaram uma porcentagem de prevalência baixa, indicando uma forte relação de competição entre estes e os gêneros prevalentes. Além disso, um fungo não identificado pelas análises de metagenômica, cuja sequência de DNA não foi compatível com as armazenadas em bancos de dados de genomas, foi detectado em amostras provenientes de várias propriedades, inclusive com uma riqueza maior que alguns dos gêneros supracitados. Estudos futuros devem ser realizados com o objetivo de se isolar e caracterizar morfológicamente esse fungo, para posterior descrição na literatura especializada.

## **5.2 Análise da diversidade Beta**

Para análise da diversidade beta, os dados obtidos a partir do sequenciamento foram construídos com base em uma matriz de Bray-Curtis no software R com o pacote Vegan. A partir dessa abordagem, foi construído o gráfico de coordenadas principais (PCoA), que avalia e representa a estrutura da comunidade contrastando essa métrica com a similaridade de resultados entre as amostras (Figura 11). Os eixos PC1 e PC2 representam, respectivamente, 20,92% e 13,4% da variância total das amostras.



**Figura 11** – Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada em uma matriz de Bray-Curtis das seqüências obtidas por propriedade.

Para as propriedades 1, 2, 4, 5, 6, 12, 14 e 16, a distância entre os plots revela uma diferença marcante entre as amostras, relacionada à composição fúngica, mesmo estando em uma mesma propriedade. Devido ao processo manual de fabricação do queijo artesanal, diferenças como essas são esperadas. Além disso, a escolha aleatória de queijos para análise metagenômica acaba selecionando amostras com dias de maturação distintos.

Para queijos que se encontram no início do período de maturação, é natural que bactérias iniciadoras do processo fermentativo sejam prevalentes no produto (COTTER & BERESFORD, 2017). Associando este fato à coleta aleatória dos queijos, é plausível que alguns apresentem não apenas tais diferenças estruturais na comunidade, reveladas pela diversidade beta, mas também nos índices de diversidade alfa citados anteriormente. À medida que os dias de maturação prosseguem, esporos fúngicos presentes no ar, nas paredes e prateleiras das câmaras de maturação se depositam sobre os queijos e ali se desenvolvem, alterando constante e progressivamente a microbiota do alimento. Além disso, fungos que já se fazem presentes desde o início do processo de maturação começam a se desenvolver de maneira progressiva (JONALLA et al., 2018).

Queijos de outras propriedades, dentre as 3, 7, 8, 9, 10, 11, 13 e 15, apresentaram uma estrutura ecológica menos variável. Todas as propriedades com essa característica estão localizadas entre 713 e 950 metros de altitude, fortalecendo a hipótese de que a elevação influencia – juntamente com os modos de produção dos queijos – na composição da micobiota do queijo da Canastra. A análise dos queijos da propriedade 15, em particular, revelou que estes apresentam uma micobiota que segue um mesmo padrão de similaridade. Entretanto, essa comunidade é estruturalmente distante de todas as outras propriedades, sugerindo que microrganismos presentes na mesma são específicos daquela região, cercada pelo Parque Nacional da Serra da Canastra (Figura 12); essa barreira geográfica pode estar relacionada à dificuldade de dispersão desses fungos para as demais localidades avaliadas neste estudo.



**Figura 12** – São João Batista da Glória, localizada entre a Serra da Canastra e o Rio Grande.

Em estudo realizado por Li et al. (2017), queijos coletados em diferentes países, como Itália, Bélgica e Cazaquistão, apresentaram diferenças na estrutura da comunidade microbiana através da mesma análise de PCoA; características edafoclimáticas, correspondentes a regiões geográficas distintas, favoreceram o desenvolvimento de diferentes espécies de microrganismos, o que está de acordo com o presente estudo. Entretanto, mesmo em casos nos quais apenas um tipo de queijo é analisado, essa mesma diferença em composição e estrutura pode ser identificada (QUIJADA et al., 2018).

Estudo de Sant’Anna (2019) demonstrou que a variação na comunidade de microrganismos associados à maturação de queijos artesanais da região do Serro foi influenciada por fatores abióticos, como localização geográfica, condições de umidade e sazonalidade. A microbiota presente nos queijos também sofreu significativa alteração estrutural conforme o avanço dos dias de maturação. Perda da umidade do produto, alterações de pH e concentração de sais também foram fatores determinantes para uma mudança estrutural da comunidade microbiana.

Liu et al. (2015) analisaram leite cru fermentado na região da Rússia utilizando técnicas de pirosequenciamento, cujos resultados revelaram um padrão no qual a distribuição de

espécies fúngicas em queijos artesanais também apresentou especificidade para regiões geográficas distintas. Tal característica é inerente aos queijos artesanais, e é por causa dela que os mesmos apresentam propriedades organolépticas tão distintas, que confirmam sua identidade. A estrutura das comunidades de amostras obtidas em Delfinópolis (propriedade 16) se mostra relativamente próxima da observada nas amostras de São João Batista da Glória.

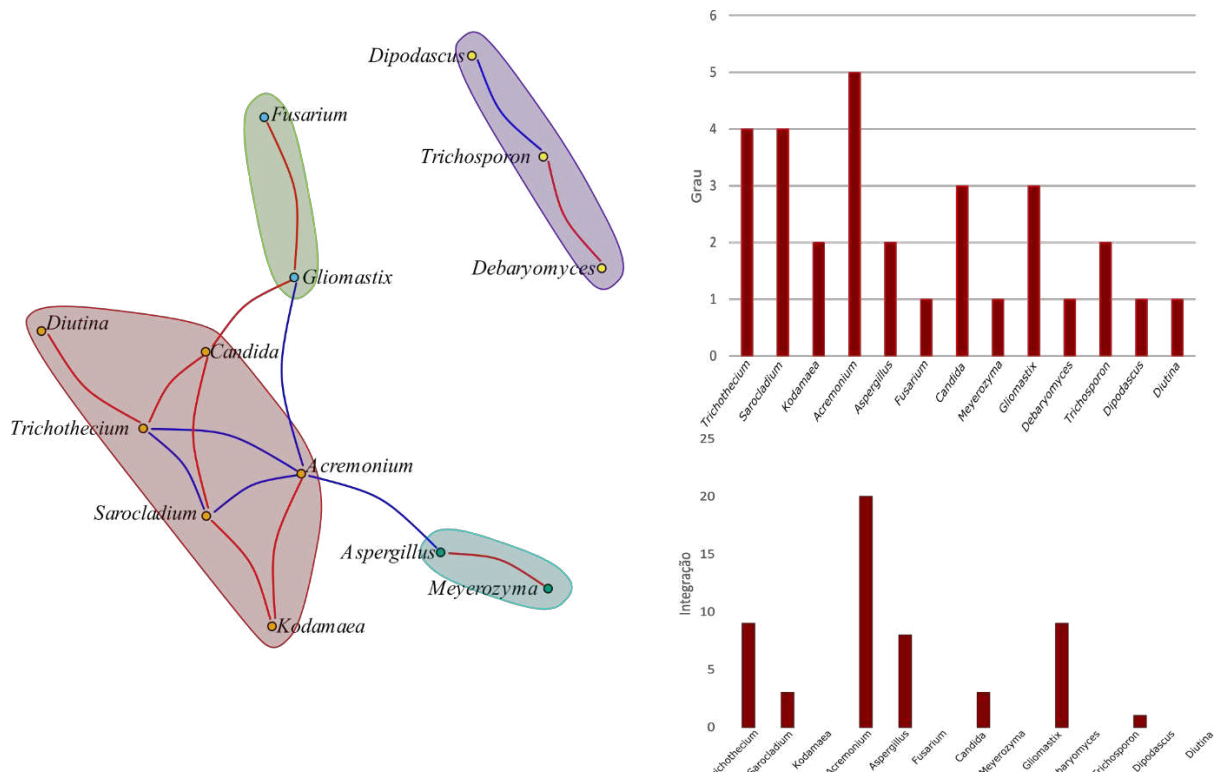
Metadados levantados neste estudo revelaram que queijos das propriedades 1 e 2 foram premiados nacional e internacionalmente por conta da qualidade do produto e características organolépticas de excelência, assim como queijos das propriedades 6, 7, 8 e 11, reconhecidos nacionalmente pelo mesmo padrão de qualidade. É interessante notar que as comunidades fúngicas de todas essas propriedades, cujos queijos foram premiados (PRÊMIO QUEIJO BRASIL, 2019), estão relativamente próximas umas das outras em termos de similaridade, sendo sugestivo de um padrão estrutural com papel relevante no desenvolvimento de características tão apreciáveis nestes queijos.

Propriedades cuja microbiota apresenta semelhança estrutural de comunidade, como aquelas produtoras de queijos premiados (9, 10, 14 e 16) possuem potencial de produzirem queijos de referência, uma vez que a microbiota, juntamente com fatores abióticos, desempenham relevante impacto na qualidade e correta maturação do produto. Todos os queijos premiados foram produzidos em propriedades localizadas entre 716 e 950 metros de altitude, locais cujos índices de diversidade alfa analisados foram os mais marcantes; alguns deles são de propriedades adeptas à produção de queijos com fungos, permitindo seu crescimento superficial. Isso pode sugerir que a microbiota típica da região da Canastra favorece a construção de características sensoriais agradáveis nos queijos, o que aumenta o estímulo para o estabelecimento de uma nova variante do queijo Canastra.

### **5.3 Padrões de interação fúngica**

A rede de interação fúngica, bem como seu grau e integração entre gêneros nas amostras de queijos artesanais da Canastra, podem ser visualizados na Figura 13. O grau é definido como o número de conexões realizado por cada nó na rede, enquanto que a intermediação (betweenness) corresponde à importância de cada fungo na conexão com indivíduos na mesma sub-comunidade e outras. O padrão de co-ocorrência revela que o gênero *Acremonium* apresentou o maior grau de intermediação entre os integrantes da comunidade, uma vez que este fungo se conecta com outras duas sub-comunidades, interagindo positivamente com os

gêneros *Gliomastix* e *Aspergillus*. *Acremonium* ainda co-ocorre com os gêneros *Sarocladium* e *Trichothecium*, enquanto adota um comportamento de co-exclusão com *Kodamaea*.



**Figura 13** – Rede de co-ocorrência dos gêneros fúngicos nas amostras de queijos artesanais da Canastra em diferentes nichos (à esquerda). Grau das interações (acima e à direita) e integração dos fungos (abaixo). Linhas vermelhas representam interações negativas; as azuis, interações positivas.

*Acremonium* também apresentou a maior integratividade dentre os fungos analisados. Com isso, é possível sugerir que este fungo desempenhe algum papel relevante na manutenção da microbiota dos queijos artesanais da Canastra. É necessário destacar que *Acremonium* não se mostrou como um dos fungos mais predominantes nas análises de diversidade alfa, tendo destaque os gêneros *Debaryomyces* e *Trichosporon*. Entretanto, mesmo sendo mais abundantes, não são os fungos com maior grau de conectividade. Ao analisar com maior detalhe a interação entre estes dois fungos, nota-se um padrão de co-exclusão, que pode ser verificado na Figura 8. É possível notar que nas amostras onde um desses fungos é mais presente, o outro acaba estando ausente ou com uma prevalência muito baixa, sugestivo de alguma competição entre ambos.

O gênero *Acremonium* já foi isolado com uma elevada prevalência em amostras de queijos na Turquia (HAYALOGLU & KIRBAG, 2006) e Espanha (ARIZCUN et al., 1996). Luz et al.

(2006) constataram considerável produção de lipases e proteases por diversos fungos endofíticos, incluindo o gênero *Acremonium*. Há um crescente interesse na produção de enzimas com potencial de aplicação pela indústria de alimentos na última década (ORLANDELLI et al., 2012), sendo *Acremonium* um gênero de destaque na produção dessas enzimas, que podem ser utilizadas para otimização do processo de maturação em alimentos fermentados.

Estudo realizado por Zheng et al. (2018) revelou o papel de diversos fungos na produção e composição de sabores e aromas em queijos chineses. Dentre os mais relevantes para esse fim estava o gênero *Dipodascus*. Esse fungo apresentou um padrão de co-ocorrência com *Trichosporon*, também conhecido por sua produção de compostos voláteis (TEMPEL & JAKOBSEN, 1998). Além disso, ambos possuem marcante atividade proteolítica e lipolítica, sendo esta última ainda mais evidente para *Dipodascus*, que possui função importante na geração de ácidos graxos livres durante o processo de maturação (ZHENG et al., 2018). Tais informações sugerem um papel importante de ambos na maturação do queijo da Canastra; no entanto, mais estudos acerca de seus papéis na maturação do produto são necessários.

De acordo com a análise metagenômica, o gênero *Kodamaea* foi inibido por dois fungos diferentes, *Acremonium* e *Sarocladium*, refletindo em uma baixa prevalência, uma vez que estes se fazem presentes em um mesmo nicho, exercendo um comportamento de co-exclusão. Cardoso et al. (2015) também detectaram uma baixa prevalência de *Kodamaea* em queijos artesanais da região do Serro nos primeiros dias de maturação. Entretanto, sua porcentagem na comunidade não aumentou de forma significativa até o 60º dia de maturação, reforçando a baixa prevalência indicada neste estudo.

*Sarocladium*, *Acremonium* e *Trichothecium* formaram um padrão de co-ocorrência que interage com outros fungos da comunidade. Recentemente, *Sarocladium* e *Acremonium* foram relatados como presentes em alimentos com baixo teor de umidade na Nigéria, incluindo queijos (EZEKIEL et al., 2020). *Trichothecium* já foi descrito como um potente produtor de compostos voláteis que podem proporcionar aromas agradáveis em alimentos (VANHAELEN et al., 1978). *Candida*, *Diutina* e *Kodamaea* sofreram atividade inibitória dos três fungos supracitados. Nestes cenários, é possível sugerir que haja a produção de algum metabólito secundário que iniba o desenvolvimento destes três fungos. Entretanto, análises *in vitro* são necessárias para corroborar esta hipótese.

*Candida*, por sua vez, é comumente descrita em queijos e produtos lácteos, com uma elevada prevalência (MONTEL et al., 2014; CHEN et al., 2017). O resultado do presente estudo

revela que essa levedura é pouco abundante no queijo da Canastra, interagindo exclusivamente por padrões de co-exclusão na comunidade fúngica. Apesar de não ter realizado análises de co-ocorrência, Zheng et al. (2018) também detectaram *Candida* com uma baixa frequência durante a maturação de queijos, sendo esta responsável por relevante produção de compostos voláteis, como ácido propanoico e hexanoico, importantes para a formação de características sensoriais de vários queijos (CURIONI & BOSSET, 2002), além da liberação de ácidos graxos e aminoácidos livres que podem servir de substrato para bactérias presentes na comunidade. Baixas concentrações de ácidos graxos livres são essenciais para a formação de sabores e aromas agradáveis em queijos (HASSAN et al., 2012; RICHLIK et al., 1997), enquanto que aminoácidos livres são precursores de diversos compostos, como álcoois, aldeídos, compostos sulfurosos, aminas e ácidos carboxílicos (BERTUZZI et al., 2018).

O gênero *Gliomastix* apresentou um comportamento de co-exclusão com *Fusarium*, conhecido por ser um relevante fitopatógeno, além de contaminante de alimentos (SESSOU et al., 2019). Esse resultado indica que padrões de co-ocorrência em comunidades de microrganismos são fundamentais na inibição de potenciais patógenos alimentares nos queijos (SESSOU et al., 2019). Em relação à *Meyerozyma*, essa levedura já foi isolada em diversos tipos de ambientes, incluindo alimentos, ambientes externos e instalações hospitalares. Apesar de alguns estudos sugerirem o uso de *Meyerozyma* para aplicações alimentícias (CORTE et al., 2015), há relatos de seu envolvimento em infecções nosocomiais, sendo uma das principais leveduras isoladas de ambientes hospitalares (PFALLER et al., 2006), responsável por aproximadamente 10% dos casos de fungemia (GIRMENIA et al., 2006). Nota-se, contudo, que este gênero foi reprimido por *Aspergillus*, reforçando a ideia de que a interação com outros microrganismos na comunidade presente nos queijos é de suma importância para impedir o desenvolvimento de características desagradáveis nos produtos, como odor de ranço e presença de potenciais patógenos.

#### **5.4 Potencial gênico funcional da comunidade fúngica**

Um panorama acerca do potencial gênico funcional da microbiota dos queijos artesanais da Canastra é apresentado na Figura 14.



**Figura 14** - Análise de componentes principais baseado na predição funcional pelo programa PICRUS<sub>t</sub>. Os pontos representam as amostras e as setas os vetores relacionados às vias metabólicas presentes em cada amostra. Pontos em diferentes grupos (azul ou laranja) representam fungos em queijos com diferentes abundâncias de vias metabólicas.

A partir das análises no software PICRUS<sub>t</sub>, foram detectados dois grupos de queijos nos quais determinadas vias metabólicas foram mais expressas. Vias metabólicas centrais, entre outras essenciais para o funcionamento e manutenção da estrutura celular e de ácidos nucleicos, foram detectadas em ambos os grupos. Excepcionalmente, uma via para a degradação de quitina e conversão de N-acetil-D-Glicosamina (GlcNAc) em etanol foi detectada nos fungos pertencentes ao grupo azul (Figura 14). Além de apresentarem funções de regulação estrutural da parede celular fúngica, quitinasases também são descritas por regularem o crescimento do

fungo (FLACH et al., 1992). Diversos microrganismos, procariotos e eucariotos, já foram relatados como responsáveis pela biorefinaria de quitina, como *Escherichia coli*, fungos dimórficos, e microrganismos oleaginosos, como leveduras responsáveis pela maturação de queijos artesanais (RODRIGUEZ & DOMINGUEZ, 1984; INOKUMA et al., 2016). Compostos alcoólicos e subprodutos oriundos deste grupo são frequentemente relatados como presentes em queijos artesanais (ROGER et al., 1988; XU et al., 2020; VAN MASTRIGT et al., 2018). A produção destes compostos voláteis parece fundamental para formação de flavor dos queijos artesanais. Em trabalho realizado por Andrade et al. (2017), foram detectados 12 compostos alcoólicos produzidos por leveduras durante a maturação de queijos artesanais da Serra da Canastra; ainda que a composição química das amostras analisadas no presente estudo não tenha sido realizada, o estudo das vias metabólicas permite sugerir a presença de tais compostos nas mesmas, corroborando as informações apresentadas pelos pesquisadores supracitados.

Outra via de relevância para as características sensoriais dos queijos é a de biossíntese de octanoil associada à uma proteína carreadora de acil (octanoil-ACP), presente no grupo laranja (Figura 13). Este composto é um intermediário para a biossíntese do complexo da piruvato desidrogenase, responsável pela obtenção de energia nos processos metabólicos oxidativos (MILLER et al., 2000). Apesar de apresentar uma função energética relevante para a célula, a presença de uma via responsável pela produção de seu precursor, o ácido octanoico, é evidência direta da sua produção por leveduras durante o processo de maturação do queijo da Canastra. Dentre diversos ácidos descritos durante a fase de maturação, o ácido octanoico é um dos mais produzidos (relacionado à formação de aroma característico nos queijos) (CURIONI & BOSSET, 2002), juntamente com os ácidos hexanoico e decanoico (ANDRADE et al., 2017). A identificação de vias geradoras ou indicativas de compostos voláteis (álcoois e ácidos) em ambos os grupos de queijos é um resultado relevante, visto que estes componentes são os principais a serem produzidos por leveduras durante o processo de maturação do queijo da Canastra (ANDRADE et al., 2017).

## 6. CONCLUSÕES

- A riqueza, a diversidade e a equitabilidade de espécies fúngicas associadas ao queijo artesanal da Canastra pode estar associada ao modo de produção dos queijos; sugere-se, ainda, uma influência secundária da altitude nesses índices;
- *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Diutina* e *Candida* foram os gêneros prevalentes nas amostras, fato decorrente de fortes interações dentre os gêneros;
- Vias relacionadas à formação de compostos voláteis de relevância para a construção de aromas e sabores em queijos artesanais foram identificadas nas amostras analisadas;
- A microbiota core característica dos queijos artesanais produzidos na Serra da Canastra avaliados no presente estudo é composta pelos gêneros *Candida*, *Trichosporon*, *Diutina*, *Kodamaea*, *Debaryomyces*, *Fusarium* e *Sarocladium*.

## REFERÊNCIAS

AFSHARI, R.; PILLIDGE, C. J.; DIAS, D. A.; OSBORN, A. M.; GILL, H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 60, n. 1, p. 33-47, 2020.

AGÊNCIA MINAS. Produtores de queijo Minas Artesanal comemoram selo que permite venda em todo o país. **Secretaria de Estado de Governo de Minas Gerais**. Disponível em: <http://agenciaminas.mg.gov.br/noticia/produtores-de-queijo-minas-artesanal-comemoram-selo-que-permite-venda-em-todo-o-pais>. Acesso em 01 de março de 2020.

ALMEIDA, A. C. Caracterização de leveduras isoladas de queijo coalho. Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade federal de Pernambuco, Recife, 28 de janeiro de 2011.

ALMEIDA, M.; HÉBERT, A.; ABRAHAM, A.; RASMUSSEN, S.; MONNET, C.; PONS, N.; DELBES, C.; LOUX, V.; BATTO, J.; LEONARD, P.; KENNEDY, S.; ERHLICH, S. D.; POP, M.; MONTEL, M.; IRLINGER, F.; RENAULT, P. RESEARCH ARTICLE Open Access Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. **BMC Genomics**. 2011.

AMORIM, A. L. B. C.; COUTO, E. P.; SANTANA, A. P.; RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas Padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 73, n. 4, 2014.

ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCWAN, R. F.; DUARTE W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**. v. 91, p. 72-79, 2017.

ANDREWS, T.; NEHER, D. A.; WEICHT, T. R.; BARLOW, J. W. Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. **Plos One**. v. 14, n. 11, 2019.

ARIZCUN, C.; ITULAIN, M.; SALMERON, J.; TORRE, P. Study of cheeses with designation of origin "Roncal" and "Idiazabal" made in Navarra – Spain. **Alimentaria**. n. 274, p.69-71, 1996.

BAS, D.; KENDIRCI, P.; SALUM, P.; GOVCE, G.; ERBAY, Z. Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: I-effects of proteolytic enzymes and determination of their appropriate combination. **Food and Bioproducts Processing**. v. 117, p. 287-301, 2019.

BENGTSSON-PALME, J.; VELDRE, V.; RYBERG, M.; HARTMAN, M.; BRANCO, S.; WANG, Z. et al. ITSx: Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for use in environmental sequencing. **Methods in Ecology and Evolution**. v. 4, 2013.

- BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, n. 6, 2001.
- BERTUZZI, A. S.; MCSWEENEY, P. L. H.; REA, M. C.; KILCAWLEY, K. N. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 17, 2018.
- BIOLCATI, F.; ANDRIGHETTO, C.; BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Microbial characterization of an artisanal production of Robiola di Roccaverano cheese. **Journal of Dairy Sciences**. 2020.
- BOYLEN E., et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data Science. **PeerJ**. 2019.
- BOCKULICH, N. A.; MILLS, D. A. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, n.7, 2013.
- BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, 2006
- BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada. **Química Nova**. v. 36, n. 9, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto nº 9.918 que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Brasília, 18 de julho de 2019.
- CALZADA, J.; DEL OLMO, A.; PICON, A.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. Effect of high-pressure-processing on the microbiology, proteolysis, texture and flavour of Brie cheese during ripening and refrigerated storage. **International Dairy Journal**. v. 37, p. 64-73, 2014.
- CARDOSO, V. M.; BORELLI, B. M.; LARA, C. A.; SOARES, M. A.; PATARO, C.; BODEVAN, E. C.; ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**. v. 69, p. 331-340, 2015.
- CARPINO, S.; RANDAZZO, C. L.; PINO, A.; RUSSO, N.; RAPISARDA, T.; BELVEDERE, G.; CAGGIA, C. Influence of PDO Ragusano cheese biofilm microbiota on flavour compounds formation. **Food Microbiology**. v. 61, 2017.
- CASALTA, E.; SORBA J.; AIGLE, M.; OGIER, J. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 133, 2009.
- CÉSAR, I. C. R. **Caracterização de fungos filamentosos do Queijo Minas Artesanal da região da Canastra**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

CHEN, G.; CHEN, C.; LEI, Z. Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 65, p. 23-31, 2017.

CHOMBO-MORALEZ, P.; KIRCHMAYR, M.; GSCHAELEDER, A.; LUGO-CERVANTES, E.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. Effects of controlling the ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artesanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. **LWT – Food Science and Technology**. v. 65, p. 1153-1161, 2016.

CORTE, L.; DI CAGNO, R.; GROENEWALD, M.; ROSCINI, L.; COLABELLA, C.; GOBETTI, M.; CARDINALI, G. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. **Food Microbiology**. v. 48, p. 206-215, 2015.

COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACURCIO, L. B. SANT'ANA F. M.; CASTRO R. D.; OLIVEIRA D. L. S. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de minas artesanal da Serra da Canastra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 5, 2014.

COTTER, P. D.; BERESFORD, T. P. Chapter 15: Microbiome Changes During Ripening. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **Elsevier**. 2017.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEWER, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**. v. 23, n. 6, 2005.

CSARDI, G.; NEPUZ, T. The igraph software package for complex network research. **InterJournal**. 2006.

CULLIGAN, E. P.; SLEATOR, R. D.; MARCHESI, J. R.; HILL, C. Metagenomics and novel gene discovery. **Virulence**. v. 5, n. 3, 2014.

CUNHA, S. D. **Aspectos físicos, químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal de Monte Carmelo – MG**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2016.

CURIONI, P. M. G.; BOSSET, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 12, 2002.

DAS DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas Artesanal, Tradição Centenária: Ameaças e Desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. v. 2, n. 2, p. 26-34, 2012.

DAL BELLO, G.; MÓNACO, C.; ROLLAN, M. C.; LAMPUGNANI, G.; ARTETA, N.; ABRAMOFF, C.; RONCO, L.; STOCCO, M. Biocontrol of Postharvest Grey Mould on Tomato by Yeasts. **Journal of Phytopathology**. v. 156, n. 5, 2008.

DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Metagenomics insights into food fermentations. **Microbial Biotechnology**. v. 10, n. 1, 2016.

DE MORAES, L. F. P. **Diversidade beta em comunidades de lagartos em duas ecorregiões distintas na Amazônia**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

DELCENSERIE, V.; TIMINIAU, B.; DELHALLE, L.; NEZER, C.; DOYEN, P.; CREVECOEUR, S.; ROUSSEY, D.; NORSAK, N.; DAUBE, G. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. **Journal of Dairy Sciences**. v. 97, 2014.

DEVI, L. S.; KHAUND, P.; NONGKHLAWF, M. W.; JOSHI, S. R. Diversity of Culturable Soil Micro-fungi along Altitudinal Gradients of Eastern Himalayas. **Mycobiology**. v. 40, n. 3, 2012.

DIAS, A. K. C.; SILVA, W. S. L.; PAULA, J. S.; RIGOTI, O.; NUNES, M. A. D. C.; ABREU, J. C.; REZENDE, B. A.; SILVA, D. R.; BARBIERI, R. S.; VALENTE, L. L.; PICOLLI, R. H. Assessment of Potential Antifungal of new Synthetic Compounds Organotin on *Penicillium* Fungi Growing on Cheese Ripening Chambers. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**. v. 6, n. 4, 2019.

DOBSON, A. D. W. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **Elsevier**. p. 595-600, 2017.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU, K.; BERTOLINO, M.; COCOLIN, L. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 143, p. 71-75, 2010.

DONG, K.; PAN, H.; YANG, D.; RAO, L.; ZHAO, L.; WANG, Y.; LIAO, X. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. v. 19, 2020.

DOUGLAS, G. M.; MAFFEI, V. J.; ZANEVELD, J.; YURGEL, S. N.; BROWN, J. R.; TAYLOR, C. M.; HUTTENHOWER, C.; LANGILLE, M. G. I. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. **bioRxiv**. 2019.

DO VALE, R. C. **Influência do Tipo de Fermento nas Características de Queijo Minas Artesanal do Serro –MG Maturado em Condições Controladas**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2018.

DUGAT-BONY, E.; GARNIER, L.; DENONFOUX, J.; FERREIRA, S.; SARTHOU, A.; BONNARME, P.; IRLINGER, F. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**. v. 238, 2016.

ENGELHART, S.; LOOCK, A.; SKUTLAREK, D.; SAGUNSKI, H.; LOMMEL, A.; FÄRBER, H.; EXNER, M. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and Sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 3886-3890, 2002.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL – EMATER. Relatório de atividades de 2018. Belo Horizonte, 2018.

ERKUS, O.; DE JAGER, V.; SPUS, M. et al. Multifactorial diversity sustains microbial community stability. **ISME**, v. 7, 2013.

EZEKIEL, C. N.; OYEDELE, O. A.; KRAAK, B.; AYENI, K. I.; SULYOK, M.; HOUBRAKEN, J.; KRŠKA, R. Fungal diversity and mycotoxins in low moisture content ready-to-eat foods in Nigeria. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, n. 615, 2020.

FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; BOUCHARD, D. S.; LASSALAS, J.; LAMBERTON, P.; AUBRY, J.; MARNET, P.; LOIR, Y. L.; EVEN, S. Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**. 2016.

FELFILI, M. C.; FELFILI, J. M. Diversidade alfa e beta no cerrado sensu stricto da Chapada Pratinha, Brasil. **Acta Botânica Brasil**. v. 15, n. 2, 2001.

FIGUEIREDO, R. C. **Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização do queijo minas artesanal de serra do salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 25 de janeiro de 2018.

FITZGERALD, C.; PATRICK, M.; GONZALEZ, A.; et al. Multicenter Evaluation of Clinical Diagnostic Methods for Detection and Isolation of *Campylobacter* Spp. From Stool. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 54, n. 5, 2016.

FLACH, J.; PILET, P. E.; JOLLÈS, P. What's new in chitinase research?. **Experientia**. v. 48, 1992.

FLEET, G. H.; MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**.

FORBES, J. D.; KNOX, N. C.; RONHOLM, J.; PAGOTTO, F.; REIMER, A. Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, 2017.

FRIEDMAN L.; ALM, E. J. Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. **Computational Biology**. v. 8, n. 9, 2012.

GEML, J.; MORGADO, L. N.; SEMENOVA-NELSEN, T. A.; SCHILTHUIZEN, M. Changes in richness and community composition of ectomycorrhizal fungi among altitudinal vegetation types on Mount Kinabalu in Borneo. **New Phytologist**. v. 215, 2017.

GEUGNIEZ, A.; TAMINIAU, B.; COUCHENEY, F.; JACQUES, P.; DELCENSERIE, V.; DAUBE, G.; DRIDER, D. Fungal diversity of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. **International Journal of Food Microbiology**. v. 258, 2017.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 7, 2006.

GONTIJO, M. T. P.; SILVA, J. S.; VIDIGAL, P. M. P.; MARTIN, J. G. P. Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. **Food Research International**. v. 128, 2020.

GORDIAN, V.; SERRANO, Y.; ARROYO, N. Characterization of *Debaryomyces hansenii* strains as a potential treatment against superficial mycoses. **Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2013.

GORI, K.; SORENSEN, L. M.; PETERSEN, M. A.; JESPERSEN, L.; ARNEBORG, N. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. **Microbiology Open**. v. 1, n. 2, 2012.

HASSAN, F. A. M.; EL-GAWAD, M. A. M. A.; ENAB, A. K. Flavour compounds in cheese (review). **International Journal of Academic Research**. v. 4, n. 5, 2012.

HAYALOGLU, A. A.; KIRBAG, S. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, 2007.

HERNÁNDEZ-CAMARILLO, E.; CARVAJAL-MORENO, M.; ROBLES-OLVERA, V. J.; VARGAS-ORTIZ, M.; SALGADO-CERVANTES, M. A.; ROUDOT, A. C.; RODRÍGUEZ-JIMÉNES, G. C. Quantifying the Levels of the Mutagenic, Carcinogenic Hydroxylated Aflatoxins (AFM<sub>1</sub> and AFM<sub>2</sub>) in Artisanal Oaxaca-Type Cheeses from the City of Veracruz, Mexico. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**. v. 8, n. 6, 2016.

HYMERY, N.; VASSEUR, V.; COTON, M.; MOUNIER, J.; JANY, J.; BARBIER, G.; COTON, E. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 13, 2014.

INOKUMA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Ethanol production from N-acetyl-d-glucosamine by *Scheffersomyces stipitidis* strains. **AMB Express**. v. 83, n. 6, 2016.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Decreto nº 44.864. Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 01 de agosto de 2008.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Portaria nº 1.687 que dispõe sobre a inclusão do município São João Batista do Glória na microrregião da Canastra. Belo Horizonte, 22 de dezembro de 2016.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Portaria nº 1.736 que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 17 de julho de 2017.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. Ministério da Cultura. Bem cultural: Modo artesanal de fazer Queijo de Minas, nas regiões do Serro, serras da Canastra e do Salitre. Brasília, 13 de junho de 2008.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 14-148, 2009.

JONALLA, B. R. Y.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P. D. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, 2018.

JÚNIOR, L. C. G. C.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Variações na composição de queijo minas artesanal da serra da canastra nas quatro estações do ano. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 371, n. 64, 2009.

JÚNIOR, L. C. G. C.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES, F. A. R.; COSTA, R. G. B.; RESENDE, E. C.; CARVALHO, K. B. A. Maturação do queijo minas artesanal da microrregião campo das vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014.

KAMIMURA, B. A.; DE FILIPPIS, F.; SANT'ANA, A. S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal brazilian cheeses. **Food Microbiology**. 2019.

KAMIMURA, B. A.; CABRAL, L.; NORONHA, M. F.; BAPTISTA, R. C.; NASCIMENTO, H. M.; SANT'ANA, A. S. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three diferente farms. **Food Microbiology**. v. 89, 2020.

LECLERCQ-PERLAT, M. N.; CORRIEU, G.; SPINNLER, H. E. Comparison of Volatile Compounds Produced in Model Cheese Medium Deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Dairy Sciences**. v. 87, p. 1545-1550, 2004.

LEGGIERI, M. C.; PIETRI, A.; BATTILANI, P. Modelling Fungal Growth, Mycotoxin Production and Release in Grana Cheese. **Microrganisms**. v. 8, n. 1, 2020.

LI, J.; ZHENG, Y.; XU, H.; XI, X.; HOU, Q.; FENG, S.; WURI, L.; BIAN, Y.; ZHONGIE, Y.; KWOK, L.; SUN, Z.; SUN, T. Bacterial microbiota of Kazakhstan cheese revealed by single molecule real time (SMRT) sequencing and its comparison with Belgian, Kalmykian and Italian artisanal cheeses. **BCM Microbiology**. v. 17, n. 13, 2017.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas ao queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 69, n. 1, 2009.

LIU, W.; ZHENG, Y.; KWOK, L.; SUN, Z.; ZHANG, J.; GUO, Z.; HOU, Q.; MENHE, B.; ZHANG, H. High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia. **BMC Microbiology**. v. 15, n. 45, 2015.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U, M, T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Caatinga**. v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DO QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO, MINAS GERAIS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 4, 2004.

MILLER, J. R.; BUSBY, R. W.; JORDAN, S. W.; CHEEK, J.; HENSHAW, T. F.; ASHLEY, G. W.; BRODERICK, J. B.; CRONAN, J. E.; JR.; MARLETTA, M. A. Escherichia coli LipA Is a Lipoyl Synthase: In Vitro Biosynthesis of Lipoylated Pyruvate Dehydrogenase Complex from Octanoyl-Acyl Carrier Protein. **Biochemistry**. v. 39, 2000.

MINAS GERAIS. Lei nº 14.185 que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2002.

MONDIAL DU FROMAGE ET DES PRODUITS LAITIERS. Concurso mundial de queijos 2019. Disponível em: <https://www.mondialdufromage.com/>. Acesso em: 12 mai. 2020.

MONTAGNA, M. T.; SANTACROCE, M. P.; SPILOTROS, G.; NAPOLI, C.; MINERVINI, F.; PAPA, A.; DRAGONI, I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. **Mycopathologia**. v. 158, p. 245-249, 2004.

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

MOUNIER, J.; COTON, M.; IRLINGER, F.; LANDAUD, S.; BONNARME, P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Chapter 38: Smear-ripened cheeses. **Elsevier**. 2017.

MURLIKI, J. B. Caracterização físico-química e microbiota fúngica em queijo colonial. 2017.

NAHIDUL-ISLAM, S. M.; KUDA, T.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, B. Bacterial and fungal microbiota in traditional Bangladesh fermented milk products analysed by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**. v. 111, 2018.

NETTO, M. M. **A geografia do Queijo Minas Artesanal**. Tese de Doutorado em Geografia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

NIELSEN, M. S.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, P. V. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 42, 1998.

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do Queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

NOGUEIRA, I. S.; NABOUT, J. C.; OLIVEIRA, J. E.; SILVA, K. D. Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**. v. 35, n. 2, 2008.

O'BRIEN, C. E.; MCCARTHY, C. G. P.; WALSH, A. E.; SHAW, D. R.; SUMSKI, D. A.; KRASSOWSKI, T.; FITZPATRICK, D. A.; BUTLER, G. Genome analysis of the yeast *Diutina catenulata*, a member of the Debaryomycetaceae/Metschnikowiaceae (CTG-Ser) clade. **Plos One**. v. 13, n. 6, 2018.

OKSANEN, J.; BLANCHET F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOEC, E.; WAGNER, H. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. 2019.

OLIVEIRA, D. F.; PORTO, M. A. C.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Caracterização de queijos minas artesanais produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Economia Doméstica**. v. 24, n. 2, 2013.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. v. 7, n. 3, 2012.

O'SULLIVAN, D. J.; COTTER, P. D.; O'SULLIVAN, O.; GIBLIN, L.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J. Temporal and Spatial Differences in Microbial Composition during the Manufacture of a Continental-Type Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 81, n. 7, 2015.

PAN, Y.; BREIDT, F. Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 24, 2007.

PANELLI, S.; BRAMBATI, E.; BONACINA, C.; FELIGINI, M. Diversity of fungal flora in raw milk from the Italian Alps in relation to pasture altitude. **Springerplus**. v. 2, n. 405, 2013.

PANGASTUTI, A.; ALFISAH, R. K.; ISTIANA, N. I.; SARI, S. A.; SETYANINGSIH, R.; SUSILOWATI, A.; PURWOKO, T. Metagenomic analysis of microbial community in over-fermented tempeh. **Biodiversitas**. v. 20, n. 4, 2019.

PEREIRA, B. P.; VIEIRA, T. R.; VALENT, J. Z.; BRUZZA, A.; WAGNER, S. A.; PINTO, A. T.; SCHMIDT, V. Implicações do processo produtivo na qualidade do queijo artesanal serrano. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 18, 2014.

PEREIRA, M. N.; DA SILVA, J. R.; FREIRE, I. S. F.; ESCATOLIN, L. C.; TALLAMINI, S. C. Microbiota do Queijo Artesanal Serrano produzido em Santa Catarina, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v. 18, n. 4, 2019.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27, n. 2, 2004.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. **Clinical Infectious Diseases**. v. 43, n. 1, 2006.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. A. M.; PIRES, A. C. S.; FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. Segurança do queijo minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 39, n. 4, 2009.

PORCELLATO, D.; SKEIE, S. B. Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese. **International Dairy Journal**. v. 61, 2016.

PREHN-KRISTENSEN, A.; ZIMMERMAN, A.; TITTMANN, L.; LIEB, W.; SCHREIBER, S.; BAVING, L.; FISCHER, A. Reduced microbiome alpha diversity in Young patients with ADHD. **Plos One**. v. 13, n. 7, 2018.

QUEIROGA, R. C. R. E.; MATIAS, S. M. G.; SANTOS, M. M.; BARBOSA, I. C.; GARCIA, E. F.; SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, C. E. V.; SOUSA, H. M. H. Características físico-químicas, microbiológicas e perfil de ácidos graxos de queijos de leite de cabra comercializados. **Revista Institucional Adolfo Lutz**. v. 68, n. 3, 2009

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 37, n. 5, 2013.

QUIJADA, N. M.; MANN, E.; WAGNER, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M.; SCHMITZ-ESSER, S. Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. **International Journal of Food Microbiology**. v. 267, p. 54-61, 2018.

ROCHA, A. M. P. **Controle de fungos durante a maturação do Queijo Minas Padrão**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

RODRIGUEZ, C.; DOMINGUEZ, A. The growth characteristics of *Saccharomyces lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 30, n. 5, 1984.

ROGER, S.; DEGAS, C.; GRIPON, J. C. Production of Phenyl Ethyl Alcohol and its Esters During Ripening of Traditional Camembert. **Food Chemistry**. v. 28, 1988.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; CUNHA, A. F.; NUNES, A. C.; MOREIRA, J. L. S. PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 6, 2011.

RYCHLIK, M.; WARMKE, R.; GROSCH, W. Ripening of Emmental Cheese Wrapped in Foil with and without Addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. III. Analysis of Character Impact Flavour Compounds. **LWT – Food Science and Technology**. v. 30, n. 5, 1997.

SANT'ANNA, F. M. D. **Microbioma do Queijo Minas Artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação**. Tese de doutorado em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SANTOS, K. R. **Avaliação da qualidade microbiológica do Queijo Minas Artesanal produzido na Serra da Canastra – MG**. Monografia de Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SARAIVA, C. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; MOREIRA, V. E.; BARROS, S. O. Aspectos ambientais da produção do queijo minas artesanal. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 388, n. 67, 2012.

SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**. v. 12, 2011.

SESSOU, P.; KEISAM, S.; TUIKHAR, N.; GAGARA, M.; FAROUGOU, S.; JEYARAM, K. High-Throughput Illumina MiSeq Amplicon Sequencing of Yeast Communities Associated With Indigenous Dairy Products of Benin and Niger. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, 2019.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R.; PICCOLI, R. H.; FERREIRA, E. B. Características físico-químicas do queijo minas artesanal da Canastra. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 380, n. 66, 2011.

SILVA, V. L. M. **Caracterização físico-química e de fungos filamentosos em queijo de manteiga comercializado no estado de Alagoas**. Dissertação de Mestrado em Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

SMITH, D. P.; PEAY, K. G. Sequence Depth, Not PCR Replication, Improves Ecological Inference from Next Generation DNA Sequencing. **Plos One**. v. 9, n. 2, 2014.

SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; DE PAULA, J. C. J.; TEODORO, V. A. M.; MOREIRA, G. M. M.; PINTO, M. S. Principais defeitos em queijo minas artesanal: uma revisão. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 72, n. 2, 2017.

SU, C.; LEI, L.; DUAN, Y.; ZHANG, Q.; YANG, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 93, p. 993-1003, 2012.

ŠURANSKÁ, H.; RASPOR, P.; UROIĆ, K.; GOLIĆ, N.; KOS, B.; MIHAJLOVIĆ, S.; BEGOVIĆ, J.; ŠUŠKOVIĆ, J.; TOPISIROVIĆ, L.; ČADEŽ, N. Characterization of the Yeast and Mould Biota in Traditional White Pickled Cheeses by Culture-Dependent and Independent Molecular Techniques. **Folia Microbiologica**. v. 64, 2016.

SUZUKI, M.; PRASAD, G. S.; KURTZMAN, C. P. *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij (1952). The Yeasts, a taxonomic study. **Elsevier**. v. 2, p. 361-372, 2011.

TEMPEL, T. V. D; JAKOBSEN, M. Yeasts associated with Danablu. **International Dairy Journal**. v. 8, 1998.

TILOCCA, B.; COSTANZO, N.; MORITTU, V. M.; SPINA, A. A.; SOGGIU, A.; BRITTI, D.; RONCADA, P.; PIRAS, C. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**. v. 210, 2020.

TORRES, P. J.; SIAKOWSKA, M.; BANASZEWSKA, B.; PAWELCZYK, L.; DULEBA, A. J.; KELLEY, S. T.; THACKRAY, V. G. Gut Microbial Diversity in Women With Polycystic Ovary Syndrome Correlates With Hyperandrogenism, **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 4, 2018.

UNTERSEHER, M.; JUMPPONEN, A.; OPIK, M.; TEDERSOO, L.; MOORA, M.; DORMANN, C. F.; SCHNITTLER, M. Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics – lessons learned from community ecology. **Molecular Ecology**. v. 20, 2011.

VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; GEERAERTS, J. Volatile Constituents Of *Trichothecium roseum*. **Sabouraudia**. v. 16, p. 141-150, 1978.

VAN MASTRIGT, O.; TEJEDA, D. G.; KRISTENSEN, M. N.; ABEE, T.; SMID, E. J. Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures. **Microbial Cell Factories**. v. 104, n. 17, 2018.

VELÁZQUEZ, M. S.; STURMER, S. L.; BRUZONE, C.; FONTENLA, S.; BARRERA, M.; CABELLO, M. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in high altitude sites of the Patagonian Altoandina region in Nahuel Huapi National Park (Argentina). **Acta Botanica Brasílica**. v. 30, n. 4, 2016.

VERMOTE, L.; VERCE, M.; DE VUYST, L.; WECKX, S. Amplicon and shotgun metagenomic sequencing indicates that microbial ecosystems presente in cheese brines reflect environmental inoculationduring the cheese production process. **International Dairy Journal**. v. 87, p. 44-53, 2018.

WATTS, S. C.; RITCHIE, S. C.; INOUYE, M.; HOLT, K. E. FastSpar: Rapid and scalable correlation estimation for compositional data. **Bioinformatics**. v. 35, n. 6, 2019.

WOLFE, B. E.; BUTTON, J. E.; SANTARELLI, M.; DUTTON, R. J. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. **Cell**. v. 158, 2014.

XU, H.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L.; ATTWELL, R. W.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology**. v. 8, 1982.

XU, Z.; CHEN, J.; SJI, X.; WANG, B.; ZHENG, X.; ZHENG, X. Characteristic physicochemical indexes and flavor compounds in Xinjiang Kazak cheese during ripening. **Food Bioscience**. v. 35, 2020.

ZHENG, X.; LIU, F.; SHI, X.; WANG, B.; LI, K.; LI, B.; ZHUGE, B. Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. **Food Research International**. v. 105, 2018.



<b>Lodderomyces</b>										X						
<b>Pseudogymnoascus</b>		X														X
<b>Setophoma</b>					X			X								
<b>Resinicium</b>					X											
<b>Cleistothelebolus</b>								X								
<b>Mucor</b>								X								
<b>Holtermanniella</b>									X							
<b>Ceratobasidium</b>	X															
<b>Metarhizium</b>						X										
<b>Clonostachys</b>				X												
<b>Bionectria</b>																X
<b>Yamadazyma</b>										X						
<b>Gorgomyces</b>																X
<b>Bipolaris</b>												X				
<b>Phoma</b>									X							
<b>Hortaea</b>															X	
<b>Mycosphaerella</b>										X						
<b>Lasiodiplodia</b>															X	
<b>Archaeorhizomyces</b>												X				
<b>Pseudeurotium</b>		X		X	X	X	X	X		X						
<b>Hyphopichia</b>																X

<sup>1</sup> Amostra de QMA.

<sup>2</sup> Amostra de QAM.