

MAYRA CARLA DE FREITAS MARTINS

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE
Lactococcus ISOLADOS DE AMBINETES LÁCTEOS E NÃO LÁCTEOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

M386d
2018
Martins, Mayra Carla de Freitas, 1987-
Diversidade de bactérias lácticas e identificação molecular
de *Lactococcus* isolados de ambientes lácteos e não lácteos. /
Mayra Carla de Freitas Martins. – Viçosa, MG, 2018.
xvi, 83 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Queijo - Fabricação. 2. Diversidade genética. 3. Bactérias
do ácido láctico. 4. *Lactococcus lactis*. 5. Queijo - Variedades.
6. Leite. 7. Fermentação. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22.ed. 637.3

MAYRA CARLA DE FREITAS MARTINS

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE
Lactococcus ISOLADOS DE AMBINETES LÁCTEOS E NÃO LÁCTEOS**

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

APROVADA: 15 de maio de 2018.



Rosângela de Freitas
(Coorientadora)



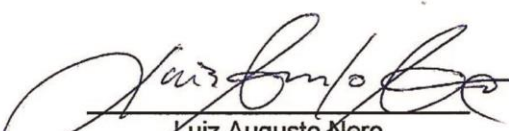
Monique Renon Eller
(Coorientadora)




Maura Pinheiro Alves



Eliana dos Santos Leandro



Luiz Augusto Nero



Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

Dedico a Deus e a meus pais, Dimas e Rosa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me conduzido ao longo desse caminho, me dando forças para continuar a cada dia o meu trabalho.

Aos meu pai, Dimas e minha mãe, Rosa pelo exemplo da verdadeira sabedoria e humildade.

As minhas irmãs, Walkíria e Thalyta por toda amizade e apoio nos momentos difíceis.

À Andressa, que trabalhou como estagiária no projeto e se tornou uma grande companheira e amiga. Muito obrigada!!!

À Maura, sempre amiga em todos os momentos.

À Carini, pela amizade e companheirismo.

À Universidade Federal de Viçosa por ter me acolhido durante anos e proporcionado tantas oportunidades de estudar.

Ao departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro às pesquisas.

À Coordenação de aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro às pesquisas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro às pesquisas.

Ao meu orientador, Antônio Fernandes de Carvalho, pela confiança, amizade e pelos valiosos conselhos que me motivam sempre me tornar uma profissional melhor.

À professora Rosângela por aceitar coorientar este trabalho.

À professora Monique pela amizade e pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Luís Augusto Nero, por ter cedido a estrutura do Laboratório de Biologia Molecular para a realização das análises.

A Professora Eliana Santos Leandro, pela doação das culturas utilizadas no trabalho, pela amizade e ensinamentos.

A todos os companheiros do Laboratório de leite e derivados pela amizade e ajuda nos experimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. CAPITULO 1: BACTERIAL DIVERSITY OF ARTISANAL CHEESE	5
Abstract.....	6
Introduction.....	7
Material and methods.....	10
Sample collection.....	10
Enumeration of LAB by culture-dependente microbial techniques.....	10
Rep-PCR fingerprint and molecular identification of LAB strains.....	11
Metagenomic DNA extration from cheese samples.....	12
PCR amplification.....	12
TTGE analysis.....	13
Sequencing of TTGE.fragments.....	14
Results and discussion.....	15
LAB selection from artesanal cheese.....	15
PCR-TTGE fingerprinting and sequencing.....	1
Conclusion.....	24
References.....	25
3. CAPITULO 2: DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ISOLADO DE FONTES LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS.....	34
Resumo.....	35
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Coleção de isolados.....	37
Identificação molecular de <i>Lacococcus lactis</i> por sequenciamento 16S rDNA....	38
Confirmação da subespécie <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	39
Análise de presença de clones por REP-PCR.....	39

Análise da presença de clones por PFGE.....	40
Análise de diversidade de <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> por MLST.....	41
Resultado e discussão.....	42
Conclusão.....	54
Referência	54
4. CAPITULO 3: CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DE FONTES LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS PARA PRODUÇÃO DE PRODUTOS FERMENTADOS	60
Resumo.....	61
Introdução.....	63
Material e método.....	64
Origem dos isolados.....	65
Lactofermentação.....	65
Produção de diacetil.....	65
Atividade proteolítica.....	66
Capacidade de acidificação.....	66
Resistência a diferentes concentrações de NaCl.....	67
Atividade antimicrobiana.....	68
Identificação do gene da nisina.....	68
Resultado e discussão.....	69
Conclusão.....	79
Referência.....	80

LISTA DE ABREVIACÕES

BAL- Bactérias do ácido ltico

UFC/g- Unidade Formadora de colnia

TTGE- *Temporal Temperature-gradient gel eletrophoresis*

PCR- Reação em Cadeia da DNA Polimerase

NSLAB- *Nonstarter lactic acid bactéria*

DGGE- *Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*

UPGMA- *unweighted pair group method with arithmetic mean*

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*

EDTA- cido Etilenodiamino Tetra-Actico

DNA- cido Desoxirribonucleico

RNA- cido Ribonucleico

MRS- *Man Rogosa and Sharpe*

ATCC- *American Type Culture Collection*

REP-PCR- Amplificao Fragmento Palndromo Extragnico Repetitivo

PFGE- Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

MLST- *Multilocus Sequence Type*

BURST- *Based Upon Related Sequences*

STs- Sequence type

CC- Complexo clonal

LDR- Leite Desnatado Reconstitudo

DO- Densidade tica

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1: BACTERIAL DIVERSITY OF ARTISANAL CHEESE

Figura. 1. TTGE profiles of V3 regions of 16S rRNA gene under low GC-content migration conditions from artisanal cheese samples (C) collected in the state of Pará, north Brazil, during the dry season (DS). M: ladder.....18

Figura. 2. TTGE profiles of V6-V9 regions of the 16S rRNA gene under low GC-content migration conditions from artisanal cheese samples (C) collected in the state of Pará, north Brazil, during the rainy season (RS). M: ladder.....19

Figura. 3. TTGE electrophoretic profiles of fragments from 16S rRNA gene bacteria communities present in artisanal cheeses (C) from the state of Pará, north Brazil, during dry (DS) and rainy (RS) seasons. The dendrogram was constructed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).....22

CAPITULO 2: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ISOLADO DE FONTES LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS

Figura. 1. Dendrograma baseado no agrupamento UPGMA na análise de REP-PCR para os 23 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.....4

Figura. 2. Dendrograma baseado no agrupamento UPGMA do perfil de restrição *Sma*I PFGE de 23 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.....48

Figura. 3. Diagrama eBURST “population snapshot” isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* e BURST V3 ([http://eburst.mlst.net /](http://eburst.mlst.net/)). Foram formados 2 complexos clonais diferentes (CC1-CC2). O tamanho dos pontos é proporcional ao número de isolados.....53

CAPITULO 3: **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***

Figura. 1. Halos de inibição frente aos patógenos.....76

Figura. 2. Identificação do gene da nisina.....77

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1: BACTERIAL DIVERSITY OF ARTISANAL CHEESE

Table 1. Microbial species identification after sequencing of the variable V6-V9 region of 16S rRNA gene from TTGE profiles.....23

CAPITULO 2: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ISOLADO DE FONTES LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS

Tabela. 1. Identificação de *Lactococcus lactis* por sequenciamento de 16S rRNA gene e da subespécie *L. lactis* subsp. *Lactis* por PCR subespécie-específica.....42

Tabela. 2. Origem, Alelos e STs obtidas na análise de MLST.....50

CAPITULO 3: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Tabela. 1. Atividade fermentativa, produção de diacetil e atividade proteolítica produzida por *L. lactis* subsp. *lactis*.....68

Tabela. 2. Resultados obtidos na atividade antimicrobiana e identificação do gene de nisina.....74

Tabela. 3. Capacidade de acidificação das estirpes por meio de mensuração do pH e acidez.....77

RESUMO

MARTINS, Mayra Carla de Freitas, M.Sc., Universidade Feral de Viçosa, maio de 2018. **Diversidade de bactérias lácticas e identificação molecular de *Lactococcus* isolados de ambientes lácteos e não lácteos**. Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Monique Renon Eller, Rosângela de Freitas e Florence Valence-Bertel.

Ambientes lácteos como queijos artesanais e leite cru são considerados excelentes fontes para isolamento de LAB com características específicas que podem ser utilizadas na indústria de fermentados. Porém, fontes não lácteas também podem fornecer isolados com características interessantes que podem, ser aproveitadas em produtos lácteos. Este trabalho teve início com o estudo da diversidade da microbiota de queijos artesanais da região amazônica durante as diferentes estações do ano. Para isso, foram realizadas contagens de BAL em meios específicos e análise de cultura-independente, que avalia de forma mais ampla a presença de bactérias lácticas e de outros grupos que possam estar presentes. O cultivo de BAL a partir dos queijos permitiu a obtenção de um vasto banco de culturas lácticas a serem estudadas e caracterizadas. A análise de cultura-independente TTGE mostrou a diversidade e a presença de diferentes bactérias lácticas, outros gêneros poucos encontrados em queijos e até mesmo bactérias citadas na literatura como comuns em infecções do trato urinário. A análise dos resultados do TTGE revelou a similaridade entre os perfis de bandas dos queijos coletados no período seco e no período chuvoso mostrando que os queijos que apresentam maior similaridade foram coletados no mesmo período do ano e que possivelmente o clima contribui para a microbiota dominante em cada um deles. Dentre os grupos de bactérias isoladas a partir dos queijos artesanais, *Lactococcus lactis* foi estudado com maior detalhe devido à sua importância como *cultura starter* na indústria de alimentos. Os isolados identificados como *Lactococcus lactis* foram incorporados a uma coleção da mesma espécie isoladas a partir de diferentes fontes lácteas e não-lácteas, que foram submetidas a um estudo por MLST para um melhor entendimento sobre a diversidade genética entre esses isolados. Para isso, um total de 23 isolados foram submetidos às análises de REP-PCR e PFGE, onde a presença ou não de clones foi estudada. Tendo sido os 23 isolados considerados diferentes, pode-se realizar a análise de MLST com um esquema desenvolvido anteriormente para esse gênero. A análise revelou a existência de novas sequências

STs que nunca haviam sido relatadas no banco de dados criado para esta espécie dentro desse esquema e abriu a possibilidade de que esses isolados poderiam ter características tecnológicas interessantes para aplicação na indústria. Após o estudo relacionado à diversidade genética dos isolados, foi necessário avaliar as características fenotípicas dessas culturas, visando sua aplicação em produtos lácteos. Testes fenotípicos para avaliação de perfil de fermentação, capacidade de desenvolvimento em diferentes concentrações de NaCl, produção de diacetil, presença de genes importantes para característica de bioproteção e outras características foram avaliadas neste estudo com o intuito caracterizar fenotipicamente essas estirpes e direcionar seu potencial de aplicação na indústria. Como resultado, algumas estirpes apresentaram potencial antagonista para os patógenos testados sendo esse resultado extremamente importante para pesquisas futuras. Quanto as demais características estudadas, os isolados apresentaram resultados satisfatórios que viabilizariam sua utilização como cultura *starter* ou como culturas bioprotetoras caso a expressão de genes para produção de nisina seja confirmada. Este trabalho permitiu compreender a diversidade microbiana presente nos queijos artesanais, suas variações durante diferentes épocas do ano assim como a importância do estudo de bactérias como *Lactococcus lactis* que podem ter uma grande variabilidade dentro da própria espécie contribuindo assim, para características diferenciadas de fermentação e outras funções importantes em alimentos. Esses resultados vão auxiliar nos próximos estudos que poderão entender mais detalhadamente a aplicação adequada para cada isolado caracterizado e a potencialização das características desse isolado que poderão ser benéficas para a indústria.

ABSTRACT

MARTINS, Mayra Carla de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2018. **Diversity of lactic bacteria and molecular identification of *Lactococcus* isolated from dairy and non-dairy environments.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Monique Renon Eller, Rosângela de Freitas and Florence Valence-Bertel.

Dairy environments such as artisanal cheeses and raw milk are considered excellent sources for LAB isolation with specific characteristics that can be used in the fermented industry. However, non-dairy sources can also provide isolates with interesting characteristics that can be used in dairy products. This work began with the study of the microbial diversity of artisanal cheeses from the Amazon region during the different seasons of the year. For this, BAL counts were performed in specific media and culture-independent analysis, which evaluates in a broader way the presence of lactic bacteria and other groups that may be present. The cultivation of BAL from the cheeses allowed to obtain a vast bank of lactic cultures to be studied, characterized and in the future applied in fermented foods. The culture-independent TTGE analysis showed the diversity and presence of different lactic bacteria, other genera few found in cheeses and even bacteria cited in the literature as common in urinary tract infections. The analysis of the TTGE results revealed the similarity between the bands profiles of the cheeses collected during the dry period and in the rainy season, showing that cheeses with the highest similarity were collected in the same period of the year and that the climate possibly contributes to the dominant microbiota in each one of them. Among the groups of bacteria isolated from artisanal cheeses, *Lactococcus lactis* was studied in greater detail due to its importance as a starter culture in the food industry. The isolates identified as *Lactococcus lactis* were incorporated into a collection of the same species isolated from different dairy and non-dairy sources, which were submitted to a study by MLST for a better understanding of the genetic diversity among these isolates. For this, a total of 23 isolates were submitted to REP-PCR and PFGE analyzes, where the presence or not of clones was studied. Since the 23 isolates were considered different, the MLST analysis can be performed with a previously developed scheme for this genera. The analysis revealed the existence of new ST sequences that had never been reported in the database created for this species within this scheme and opened the possibility that these isolates could have interesting technological

features for application in the industry. After the study related to the genetic diversity of the isolates, it was necessary to evaluate the phenotypic characteristics of these cultures, aiming their application in dairy products. Phenotypic tests for evaluation of fermentation profile, developmental capacity at different concentrations of NaCl, diacetyl production, presence of important genes for bioprotection characteristics and other characteristics were evaluated in this study with the purpose of characterizing phenotypically these strains and directing their application potential industry. As a result, some strains showed antagonistic potential for the pathogens tested and this result is extremely important for future research. Regarding the other characteristics studied, the isolates presented satisfactory results that could be used as starter culture or as bioprotective cultures if the expression of genes for nisin production is confirmed. This work allowed to understand the microbial diversity present in the artisanal cheeses, their variations during different times of the year, as well as the importance of the study of bacteria such as *Lactococcus lactis* that can have a great variability within the species itself, thus contributing to differentiated characteristics of fermentation and other important functions in food. These results will aid in the next studies that will be able to understand in more detail the suitable application for each characterized isolate and the potentialization of the characteristics of this isolate that could be beneficial for the industry.

1-INTRODUÇÃO GERAL

O estudo da diversidade microbiana em ambientes lácteos e não lácteos têm grande importância para o entendimento da presença de diferentes microorganismos nesses ambientes, bem como, o impacto desses microorganismos no produto final quando nos referimos aos produtos lácteos artesanais. Cada ambiente possui características únicas que favorecem e permitem o desenvolvimento de diferentes espécies bacterianas. Fatores como região, geografia, temperatura e clima interferem de maneira direta na capacidade de diferentes grupos bacterianos se desenvolverem e conseqüentemente nas características dos produtos artesanais.

Os queijos artesanais e o leite cru são considerados fontes potenciais de novas estirpes de bactérias lácticas. O modo de fabricação desses queijos faz com que a fermentação seja conduzida por bactérias contaminantes da pastagem, pele do animal, utensílios, superfícies e outros ambientes que possam ter contato com o queijo durante a fabricação. O estudo da comunidade bacteriana presente nos queijos artesanais têm revelado a presença de espécies que ainda não haviam sido relacionadas com queijos e uma grande diversidade de bactérias lácticas com características tecnológicas diferenciadas. Além disso, ambientes não lácteos como capim, diferentes tipos de silagem e até mesmo a pele do animal ambiente não-lácteo também têm sido uma fonte importante de novas estirpes que se adaptaram e por isso, podem fornecer características interessantes a serem exploradas.

Lactococcus lactis é um micro-organismo reconhecido como GRAS, muito utilizado como cultura *starter* na fermentação de produtos lácteos. A diversidade de *Lactococcus* isoladas de ambientes lácteos e não lácteos é de grande interesse industrial e pode ser estudada por técnicas moleculares avançadas como o MLST que é capaz de relacionar filogeneticamente as cepas favorecendo o entendimento

sobre a origem e a relação entre elas. Além disso, a caracterização fenotípica é necessária para entender as características e o potencial de cada uma delas.

Este trabalho consiste em três artigos que estudam a diversidade genética e as características de BAL que foram isoladas de diferentes ambientes brasileiros. O capítulo 1, refere-se ao estudo de diversidade de BAL isoladas de queijos artesanais da região amazônica, coletados em diferentes estações do ano (clima seco e chuvoso). Esse estudo foi realizado, por meio de técnicas cultura-dependente e cultura- independente para que a identificação da microbiota presente, não ficasse restrita à composição dos meios de cultura e às condições de cultivo. O capítulo 2, refere-se ao estudo da diversidade genética por MLST, de um grupo específico de isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* obtidos por meio do isolamento e identificação das estirpes coletadas dos queijos da região amazônica (capítulo 1) e também de uma coleção construída anteriormente por pesquisadores que isolaram *L. lactis* subsp. *lactis* a partir de ambientes lácteos (leite de búfala, leite de cabra, leite de vaca, queijo artesanal da ilha de Marajó) e não lácteos (capim, silagem de capim, silagem de amendoim). O capítulo 3 refere-se à caracterização fenotípica dos 23 isolados estudados no capítulo 2. O Estudo de diversidade indicou que os 23 isolados estudados são diferentes geneticamente e por isso, devem ter suas características fenotípicas estudadas individualmente. Foram realizadas análises fenotípicas para caracterização da fermentação, produção de diacetil, capacidade de proteólise, capacidade de desenvolvimento em diferentes concentrações de NaCl, capacidade antagonista e presença do gene da nisina. Essa caracterização teve como objetivo verificar se algum desses isolados tem potencial para ser utilizado na indústria e se algum deles apresentava alguma característica diferenciada desenvolvida durante a sua adaptação no ambiente e que também pudesse ser explorada.

O objetivo desse estudo foi entender a diversidade microbiana em diferentes ambientes (lácteos e não lácteos) buscando a aplicação de estirpes com potencial para serem utilizadas na indústria de alimentos objetivando novos perfis de sabor e novas aplicações para o desenvolvimento e aprimoramento dos alimentos industrializados fermentados.

1. CAPÍTULO 1: Bacterial diversity of artisanal cheese

**Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil
during the dry and rainy seasons**

Mayra Carla de Freitas Martins^a, Rosângela de Freitas^a, Júlio Cesar Deuvaux,
Monique Renon Eller, Luís Augusto Nero, Antônio Fernandes de Carvalho^{a*}

^aFood Science Department, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade
Federal de Viçosa, MG, Brazil. Tel.: +55 3138991800.

E-mail address: antoniofernandes@ufv.br (A.F. Carvalho).

Abstract

The microbiota from artisanal cheeses produced in the Amazonian region is evaluated. Samples of artisanal cheeses were obtained from markets in Conceição do Araguaia and Redenção (Pará, Brazil) over rainy and dry seasons, and their biodiversity was assessed by culture-dependent and culture-independent methods. Mean counts of lactic acid bacteria (LAB) in cheeses ranged from 7.32 to 8.84 log CFU/g, for both seasons. Members of genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* were predominant. The amplification of the 16S rRNA V6-V9 region, followed by a temporal temperature-gradient gel electrophoresis (TTGE) and sequencing of the TTGE bands revealed important differences in the microbial composition variability between samples from the two seasons and among cheese samples analyzed. TTGE showed the presence of microorganisms that are frequently found in cheese, such as *L. lactis* subsp. *lactis*,

as well as other non-usual species, such as *Macrococcus caseolyticus* and *Corynebacterium variabile*. Moreover, TTGE analysis revealed the presence of microorganisms that have been isolated from other types of foods (*Paralactobacillus selangorenses*) along with some not usually found in foods, such as *Exiguobacterium acetylicum*, plus the presence of pathogenic microorganisms (*Granulicatella elegans* and *Aerococcus sanguinicola*). The present molecular approaches combined with culture-dependent methods provided a more detailed description of the microbial ecology of traditional cheeses from the Amazonian region in northern Brazil.

Keywords: artisanal cheese; diversity; PCR-TTGE; lactic acid bacteria; Amazonian region; Brazil.

Introduction

In the Amazonian region of the southern state of Pará (Brazil), artisanal cheese production is an important local economic activity, often representing an additional source of income for families with limited resources (Menezes, 2011). Artisanal cheese is produced in small dairy units using raw cow's milk, animal rennet and salt, without the addition of starter cultures. The product is soft, yellowish and compact, characteristic of an unripened cheese.

Artisanal cheeses (or traditional cheeses) come from specific regions and are produced from raw milk using rudimentary production methods (Guerrero et al., 2009). Studies show that a high microbial diversity, combined with specific cheese manufacturing methods, is responsible for giving artisanal cheeses features that are unique to the regions where they are made (Montel et al., 2014). The complexity of the microbial community is due to external factors, such as production techniques

and ripening conditions, and internal factors, such as the physicochemical composition of the cheese and the microbial interactions that occur. Raw milk microbiota is an important part of the final cheese microbiota: the composition of this microbiota is strongly influenced by the composition of the autochthonous microbiota of animal skin, dairy equipment, soil, and air (microorganisms from the milk production environment). Additionally, physical contact from the hands of the cheesemaker, manufacturing environment conditions, dairy equipment, and cheese-making practices contribute to the microbial diversity of the final product (Pelaéz and Requema, 2005).

Lactic acid bacteria (LAB) have been identified as the main microbial group present in artisanal cheeses. Organisms of genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus* are considered the most common (Fox et al., 2000). The LAB naturally present in raw milk or intentionally added to raw milk during the cheese-manufacturing process are associated with properties such as taste, texture, and aroma. LAB are widely used as starter cultures in various dairy industry products (Carr et al., 2002). The interest in the study of raw milk cheese microbiota comes from the need to characterize their complex populations and identify the microorganisms responsible for their organoleptic characteristics. Moreover, the lactic microbiota of raw milk and traditional dairy products continues to generate interest for the identification of new strains of LAB. These present a high biotechnological potential and therefore are of great importance to the food industry (Wouters et al., 2002).

The methods used in the characterization of microbial populations may be culture-dependent and culture-independent. Culture-dependent methods are characterized by the use of selective and/or different culture media in the enumeration and identification of microorganisms (Al-Kahaldi & Mossoba, 2004).

These methods are widely studied and recognized by standard-setting bodies; nevertheless, they are laborious, time consuming, and often require several identification tests at the level of genera and/or species, allowing only a partial determination of bacterial microbiota (de Freitas et al., 2013, Kisand & Wikner, 2003).

Because culture-dependent methods show little recovery efficiency for microorganisms in environmental samples taken for microbial diversity studies, culture-independent methods have been developed as an alternative in order to obtain more precise microorganism identification. Molecular methods are genotypic identification techniques characterized by reproducibility, automation, and speed. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) has been identified as an important tool in the study of microbial communities and their dynamics. The advantages of TTGE include simplicity of execution and reduced analysis time required as compared to traditional identification methods. This technique has proven to be faster, more economical and more reliable for profiling complex bacterial community structures and determining the evolution of microbial populations of foods (Cocolin et al., 2007; Giraffa and Neviani, 2001). The technique has also been used to rate the bacterial diversity in cheeses (Dolci et al., 2008; Feligini et al., 2012; Fontana et al., 2010; Jany and Barbier, 2008; Settanni et al., 2012).

The present study aimed to identify the microbial biodiversity in the artisanal cheeses produced in Conceição do Araguaia and Redenção, located in the state of Pará in northern Brazil, in order to evaluate the prevalent microorganisms present in the samples collected in dry and rainy seasons using a combined approach of culture-dependent and culture-independent methods.

Materials and methods

Sample collection

The samples of raw milk artisanal cheese (n = 20) were obtained from local markets in Conceição do Araguaia and Redenção (Pará, Brazil). Ten cheeses were collected in September and October 2012 (dry season) and ten cheeses in March and April 2013 (rainy season). The seasons evaluated in this study correspond to periods of notable climate differences in the region: rainfall ranged from 68 mm, in the dry season, to 250 mm, in rainy season, and a little temperature variation was observed, from 22 to 31 °C (INPE, 2016). The collected samples were stored under refrigeration until microbiological analysis.

Enumeration of LAB by culture-dependent microbial techniques

The cheese samples (25g) were weighed aseptically, transferred to individual sterile plastic bags containing 225 mL of a 0.85% (w/v) NaCl solution, homogenized, and diluted in the same solution. From each sample, selected dilutions were pour plated in duplicate and in distinct culture media: M17 agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, England), incubated at 30 °C for 48h, and at 45 °C for 48h, de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, England), incubated at 30 °C for 48h, and under anaerobic conditions using GasPak EZ™ Gas Generating Container Systems, BD (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA). After incubation, the colonies that formed on the plates were enumerated, and the results were expressed in CFU/g. After enumeration, 10% of colonies were randomly picked from the highest dilutions and submitted to microscopy observation (Nikon optiphot phase contrast equipment) in order to discard isolates for which the morphological criteria and the preliminary test were not consistent with LAB (Gram-positive, nonmotile, nonsporeforming, catalase negative and rod- or coccus-shaped). Isolates were then

purified by streaking (three successive times) on same culture media and the same conditions used for enumeration. Purified isolates were stored at -80°C in isolation broth media (M17 or MRS) supplemented with 30% (v/v) glycerol.

Rep-PCR fingerprint and molecular identification of LAB strains

A total of 169 isolates were cultured in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) at 30°C for 16h, and then subjected to DNA extraction using the Genomic Wizard DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA). Rep-PCR was performed according to the protocol described by Dal Bello et al. (2010) using a single primer (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). PCR products were separated by electrophoresis in 2.0% (w/v) agarose gels for 2 h at a constant voltage of 110 V in $0.5 \times$ Tris/Borate/EDTA buffer (TBE). Gels were stained using GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), and recorded using an LPIX transilluminator (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brazil). Fingerprints were analyzed using BioNumerics 4.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The similarities among profiles were calculated using the Pearson similarity coefficient (1%). The compiled matrix was used for cluster analysis using the unweighted pair group method with the arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm.

The identification of isolates was performed by amplifying 16S rRNA genes from the genomic DNA with the universal primers F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and R1492 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Deng et al., 2007). The PCR products were double-strand sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, Korea), and identification was defined only for sequences with 100% similarity compared to the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) using Basic Alignment Search Tool software (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

Metagenomic DNA extraction from cheese samples

The twenty samples of artisanal cheeses were subjected to metagenomic DNA extraction. Ten grams of each sample were homogenized in 90 mL of 2% sodium citrate (w/v) solution. A 1.5 mL aliquot of this mixture was added to a 2 mL tube and centrifuged for 10 min at 11,000 × *g*. The pellet was washed three times with buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mL of EDTA pH 8.0, 6.7% sucrose, and an enzymatic lysis step was performed by incubating for 1 h at 37 °C after the addition of 100 µL of lysozyme (50 mg/mL) and 5 µL of RNase (10 mg/mL). Fifty microliters of SDS (10%) and 20 µL of proteinase K (20 mg/mL) were then added. The mixture was subsequently incubated for 1 h at 55 °C. DNA purification was performed using phenol and chloroform according to Sambrook and Russell (2001). Briefly, an equal volume of phenol:chloroform was added to the DNA sample. The contents of the tube were mixed until an emulsion formed, then centrifuged at 12,000 × *g* for 15 min at room temperature to separate the liquid and organic phases. The aqueous phase containing the DNA was transferred to a fresh tube. DNA was precipitated by adding isopropyl alcohol. After centrifugation for 15 min at 11,000 × *g*, the DNA pellet was washed with 70% ethanol, resuspended in 30 µL of TE buffer, and stocked at -20 °C.

PCR amplification

To investigate the dominant bacterial species in the cheeses, the V1-V9 region of the 16S rRNA gene was amplified with universal primers F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and R1492 (5'-TAGGYTACCTTGTTACGACT-3') (Deng et al., 2007), generating amplicons with a size of approximately 1500 bp. PCR reaction was performed in a final volume of 25 µL containing GoTaq Flex[®] Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 200 µM dNTPs, 1U of Go Taq Flex polymerase

(Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.3 µg/µL dried bovine albumin (BSA) (Promega), with a 0.1 µM concentration of each primer, approximately 80 ng of total DNA and ultrapure water. DNA was amplified as follows: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 63 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min 30 s, and a final extension step at 72 °C for 7 min.

The second reaction amplified the V6-V9 region of the 16S rRNA gene and was performed using primers R1492 and U968-GC (5'-ACGGGGGGAACGCGAAGACCTTAC-3') with a GC-clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGC-3') attached (Favier et al., 2002), generating amplicons with a size of approximately 520 bp. The reaction media with a final volume of 25 µL was composed of 1 µL primary reaction with a 1:10 dilution of Go Taq Flex[®] Reaction Buffer (Promega), 200 µM dNTPs, 1U of GoTaq Flex polymerase (Promega), 2.5 mM MgCl₂ (Promega), 0.3 µg/µL dried bovine albumin (BSA) (Promega), with a 0.1 µM of each primer, 0.5 µL formamide, and ultrapure water. The second amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 5 min.

TTGE analysis

The DCode[™] Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, California, USA) was used for TTGE analyses according to the manufacturer's instructions. PCR products were applied to an 8% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide-bis acrylamide, 37.5:1). Electrophoresis was performed in 1x TAE buffer (2.0 M Tris acetate, 0.05 M EDTA, pH 8.3) with a ramp temperature of 0.4 °C per hour, with a temperature range within 62–70 °C for 20 h at a constant voltage of 41 V. After electrophoresis, DNA

bands were stained in 1× TAE buffer containing SYBR[®] Gold nucleic acid stain (Invitrogen, Carlsbad, CA) and visualized under UV light. Fingerprints were analyzed using BioNumerics 4.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The similarities among profiles were made using the Dice similarity coefficient (1%). The compiled matrix was used for the cluster analysis using the unweighted pair group method with the arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm.

Sequencing of TTGE fragments

TTGE bands in the gels were identified by sequencing. Briefly, selected TTGE bands were extracted from the gels, transferred into 30 µL sterile water and incubated overnight at 4 °C. The DNA was re-amplified with the primers R1492 and U968-GC without the GC-clamp as follows: after preheating to 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 5 min.

The PCR products were sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, Korea), and identification was made only for sequences with 100% similarity when compared with the National Center for Biotechnology Information database (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) using the Basic Alignment Search (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Results and Discussion

LAB selection from artisanal cheese

Characterization studies of LAB from artisanal cheeses are important in order to understand the diversity of cheeses produced in different regions and relate the isolates taxonomically. Additionally, research in this area enables the valorization of artisanal cheeses, contributing to local development. Moreover, better knowledge of the strains may facilitate the selection of strains that have industrial importance - thus, the food industry's interest in the bacteria strains as starters cultures for cheese production (Wouters et al., 2002). In the present study, we report the first characterization of diversity found in the endogenous microbiota of artisanal cheese produced in Conceição do Araguaia and Redenção (Pará, Brazil) during dry and rainy seasons, using a combination of culture-dependent and culture-independent methods.

The mean counts for LAB obtained in the culture media considered in the present study ranged from 7.32 to 8.94 log CFU/mL in cheeses manufactured during both seasons, which are values frequently reported for artisanal cheeses (Alegría et al., 2009; Dolci et al., 2010; Fuka et al., 2010; Gala et al., 2008; Pangallo et al., 2014; Delcenserie et al., 2014). Of the different isolates taken from the cheeses in our study, 169 were characterized as possessing typical LAB characteristics. Following this characterization, all isolates were grouped using rep-PCR fingerprinting into 47 different molecular patterns that were selected for sequence analysis of the 16S rRNA gene.

The isolates were identified as *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus* spp. (*L. lactis*, and *L. garvieae*), *Enterococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Pediococcus acidilacti*, and *Lactobacillus plantarum*. For most of the genes identified, it was observed that partial

sequencing of the 16S rRNA gene was sufficient to provide proper and reliable identification of the isolates, with variations that allowed for differentiation among their species. The adopted protocol is widely used for proper LAB identification from artisanal foods, except for species identification of *Enterococcus* (Perin and Nero, 2014; Moraes et al., 2013; Mohania et al., 2008).

Among the identified isolates, the most frequent LAB genera recovered from cheese produced during the rainy season belonged to genera *Lactococcus* and *Weissella*, whereas for cheese produced during the dry season, the most frequent LAB belonged to genera *Enterococcus* and *Lactobacillus*. All the cited genera have demonstrated an important role in the production of traditional cheeses (Montel et al., 2014). The genus *Weissella*, for example, is characterized as nonstarter lactic acid bacteria (NSLAB); this genus plays an important role during cheese ripening because they produce volatile flavor compounds that contribute to a cheese's sensory profile (Sgarbi et al., 2013). Enterococci are also described as relevant NSLAB in traditional cheeses, being responsible for beneficial features to various cheeses and for intense lipolytic activity (Girafa, 2003; Mucchetti and Neviani, 2006); however, *Enterococcus* spp. are also associated with low hygienic conditions during the milking and storage, being also linked to a diversity of virulence features (Garcia Fontan et al., 2001).

Streptococcus and *Pediococcus* were exclusively found in samples taken during the rainy season, while *Leuconostoc* was present in samples from the dry season. Terzic-Vidojevic et al. (2013) identified that *Leuconostoc* and *Pediococcus* were predominant in artisanal Vlasina raw goat's milk cheese and presented a potential as use for starter cultures.

3.2 PCR-TTGE fingerprinting and sequencing

Methods without cultivation stages, such as TTGE, were developed to make the estimation of microbial biodiversity of complex samples more efficient (Parayre et al., 2007). Total microbial DNA from cheeses manufactured in two different seasons was extracted and analyzed by PCR-TTGE. Fig. 1 and 2 show TTGE profiles from V6-V9 regions of the bacterial 16S rRNA gene. Important differences in fingerprints were observed between the two seasons and the variability in microbial composition, assessed by the number of bands and migration positions in TTGE gels, was high among the cheese samples analyzed. Furthermore, some bands were identified in more than one sample, indicating that the studied cheeses may have common microorganisms.

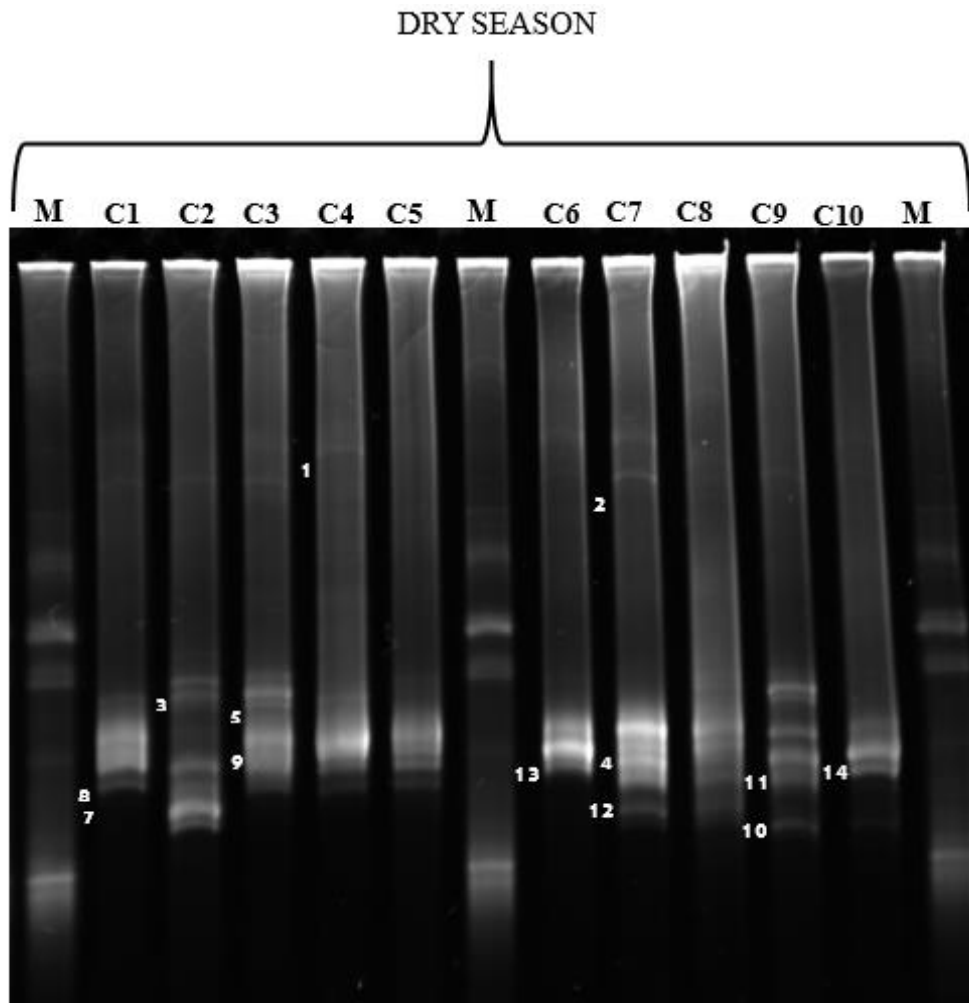


Fig. 1. TTGE profiles of V3 regions of 16S rRNA gene under low GC-content migration conditions from artisanal cheese samples (C) collected in the state of Pará, north Brazil, during the dry season (DS). M: ladder.

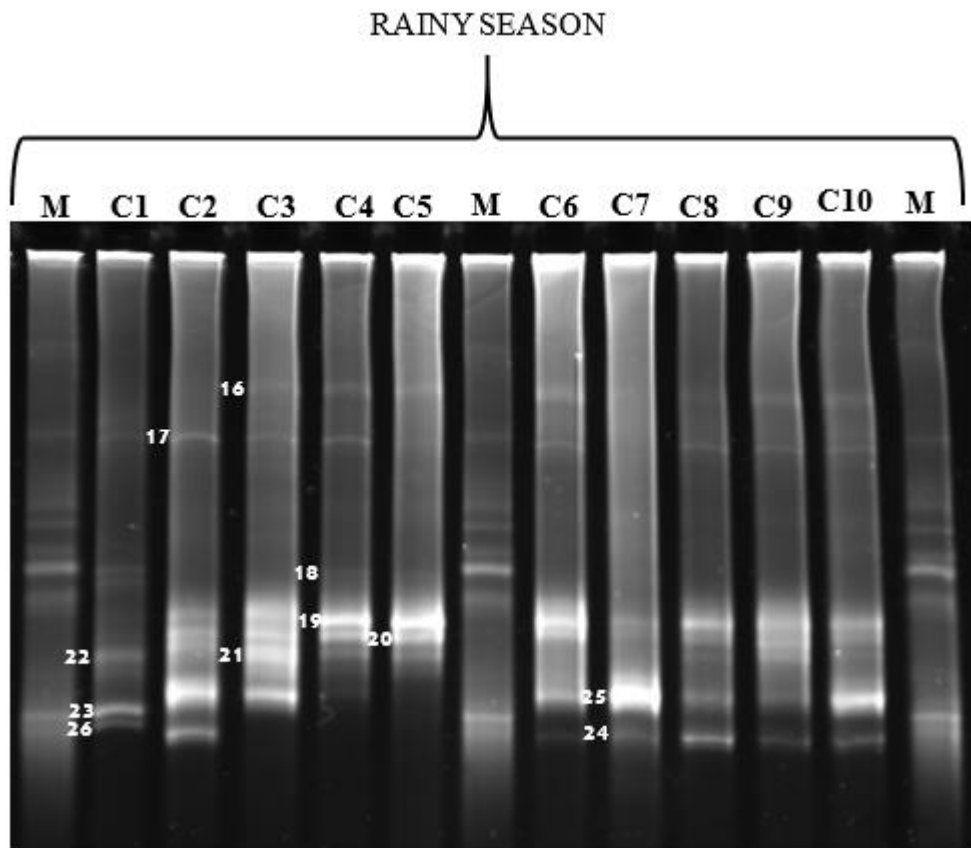


Fig. 2. TTGE profiles of V6-V9 regions of the 16S rRNA gene under low GC-content migration conditions from artisanal cheese samples (C) collected in the state of Pará, north Brazil, during the rainy season (RS). M: ladder.

The TTGE analysis for artisanal cheese samples from two different regions of the state of Pará revealed that the band patterns given by samples collected in the dry and rainy seasons showed less than 20% similarity and were thus arranged in separate groups. The group formed in the dry season samples showed maximum similarity among 55% of samples (C6DS and C7DS samples), while in the rainy season samples, the maximum similarity among samples was 70% (C4RS and C5RS samples). The formation of a single profile by the C1RS sample, which demonstrated less than 20% similarity to samples taken only from the rainy season, was also observed (Fig. 3). Bonetta et al. (2008) collected samples from Robiola di Roccaverano cheese during spring, winter and summer to analyze sample diversity

by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). The authors observed that there was no difference between the generated profiles from the winter and summer samples. Yet in the summer group, the differences within communities are mainly between samples of fresh cheese and 20-day ripened cheese. According to the authors, the differences in profiles are related to the daily variations in raw milk temperature.

Following excision from the TTGE gels, the 11 selected bands were reamplified and provided suitable amplicons for identification. Bands 6, 8, 9 and 11 identified in the dry season samples (Figure 1) indicated the presence of *Paralactobacillus selangorensis*, *Macrococcus caseolyticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Granulicatella elegans*, respectively (Table 1). The genus *Paralactobacillus* includes a single species, *P. selangorensis*, originating from the Malaysian food ingredient, chili bo (Leisner et al., 2000). A recent proposal recommended the transfer of the *P. selangorensis* to the *Lactobacillus* genus on the basis of their close phylogenetic relationships (Haakensen et al., 2011). This suggested transfer has also been mentioned in Salvetti et al. (2012).

M. caseolyticus was present in almost all the dry season samples. This species was identified in traditional Sicilian cheese by Randazzo et al. (2008) in a study of microbiota diversity using DGGE. Giannino et al. (2009) identified *M. caseolyticus* in 61.5% of the raw milk samples used in Fontina cheese making. Previously classified as *Staphylococcus caseolyticus* (Schleifer et al., 1982), this species is usually isolated from cow's milk, bovine organs and food-processing factories (Baba et al., 2009). *G. elegans* was identified in cheese samples from both the dry and rainy seasons (bands 11 and 22, respectively). Usually not found in food, *G. elegans* could be part of the normal oral microbiota (Aas et al., 2005). However, these bacteria are predominantly isolated from blood cultures from patients with infective endocarditis

(Quartermain et al., 2013). *G. elegans*, originally known as *Abiotrophia elegans*, can exhibit variability and pleomorphism on Gram staining (Christensen and Facklam, 2001) and this variability poses challenges to the identification and taxonomic classification of the organism.

In samples from the rainy season, *Exiguobacterium acetylicum* (bands 16, 19, 21), *Corynebacterium variabile* (band 23), *Aerococcus sanguinicola* (band 24) and *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (band 26) were also identified. Like the other previously mentioned bacteria, *E. acetylicum* had never before been identified in artisanal cheese. Sorokulova et al. (2009) showed that *E. acetylicum* have been used for efficient waste decomposition. *Exiguobacterium* bacteria can be present in many different environments, including food (Vishnivetskaya et al., 2007) and it was reported that *Exiguobacterium* strains have been isolated from shrimp (Lopez-Cortes et al., 2006). *C. variabile* was described as prevalent in cured cheese rinds (Cocolin et al., 2013). Ubiquitous in nature, the genus *Corynebacterium* will generally colonize animal skin and the human gastrointestinal and urogenital tract (Braem et al., 2012). These characteristics explain the presence of the genus in artisanal cheeses since there is possible contamination potential during milking and cheese production. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (band 26) is generally found in meat products since it is used to prolong the shelf life of meat and meat derivatives (McLeod et al., 2010). Nevertheless *Lactobacillus sakei* species is also isolated from cheeses with a high degree of ripening (Pasquale et al., 2014), milk and yoghurts (Yang et al., 2012) and its use is even suggested as a potential control mechanism against *Listeria monocytogenes* (Martinez et al, 2015).

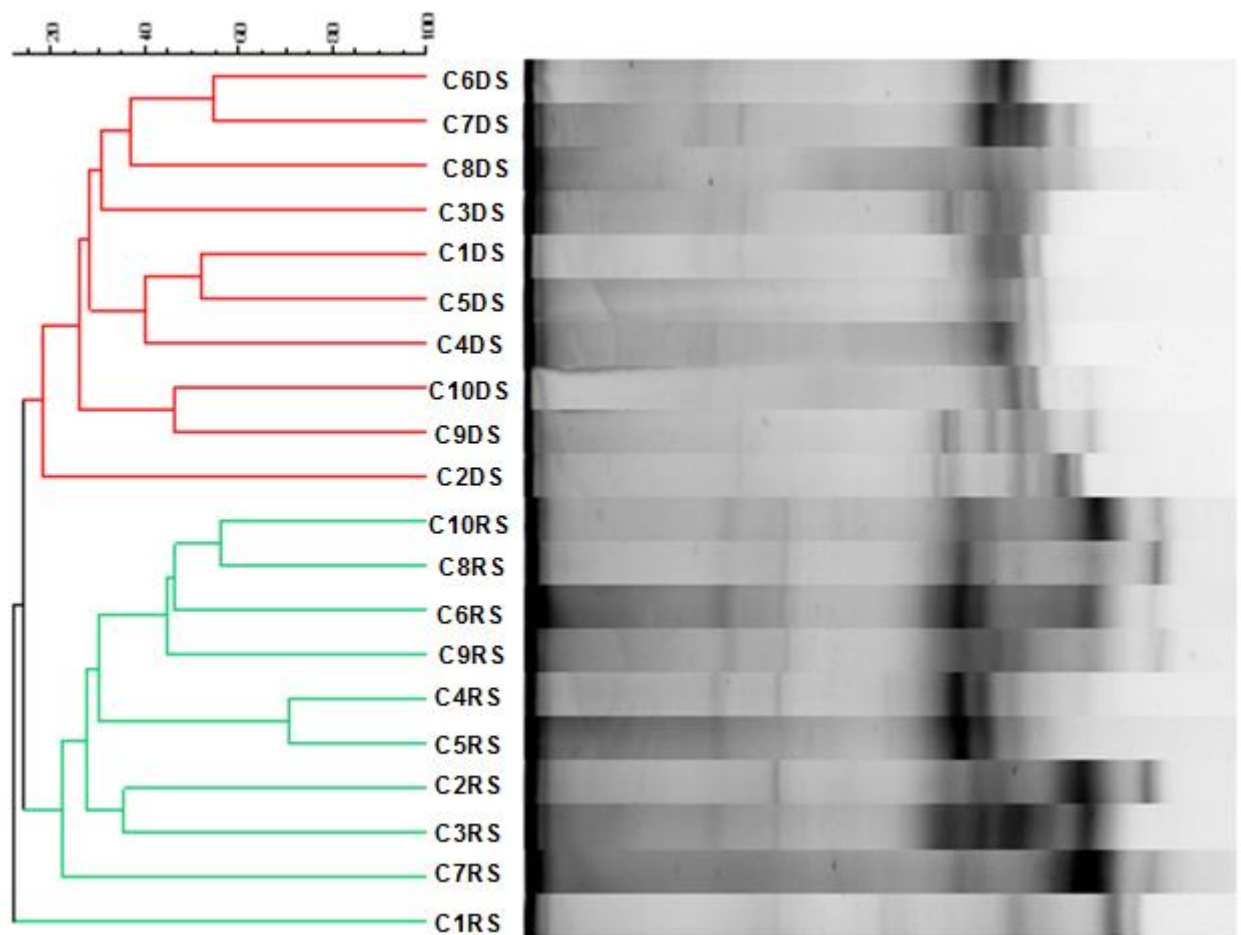


Fig. 3. TTGE electrophoretic profiles of fragments from 16S rRNA gene bacteria communities present in artisanal cheeses (C) from the state of Pará, north Brazil, during dry (DS) and rainy (RS) seasons. The dendrogram was constructed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Table 1. Microbial species identification after sequencing of the variable V6-V9 region of 16S rRNA gene from TTGE profiles.

Band^a	Closest relative	Season	Homology (%)	Accession number
6	<i>Paralactobacillus selangorenses</i>	Dry	89	NR024885.1
8	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	Dry	91	NR074941.1
9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dry	92	N103918.1
11	<i>Granulicatella elegans</i>	Dry	87	NR0286682.1
22	<i>Granulicatella elegans</i>	Rainy	96	NR0286682.1
16	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	Rainy	99	NR113585.1
19	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	Rainy	99	NR113585.1
21	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	Rainy	99	NR113585.1
23	<i>Corynebacterium variabile</i>	Rainy	99	NR102874.1
24	<i>Aerococcus sanguinicola</i>	Rainy	97	NR025396.1
26	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	Rainy	86	NR075042.1

^a Numbers refer to band designation presented in Fig. 1 and Fig. 2.

It can be concluded from the results obtained that conventional culture-dependent methods combined with molecular techniques afford significant insights into microbial populations occurring in cheese. Divergences in the bacterial species detection between the methods used could be due to different factors. For example, the presence of bacterial DNA in the cheese matrix could be due to cellular autolysis or the high selectivity of certain media that favors specific microorganisms which find optimal conditions for their growth (Dolci et al., 2008). Thus, the present research

confirms the importance of combining molecular culture-independent approaches with classical microbiological methods for the study of complex communities of traditional cheeses.

In this study, we observed that different batches of the same kind of cheese may vary in their biodiversity depending on the season. This difference can be influenced by various factors, including seasonally variable chemical compositions in the milk, production process specifics, particular environmental conditions of the household, and raw milk transport and cheese-handling temperatures (Terzic-Vidojevic et al., 2014). Other authors have also identified changes in cheese microbiota during different seasons, probably due to a prevalence of certain genera in one season versus another, consequently resulting in competition between microorganisms (Cardoso et al., 2015; Castro et al., 2016).

The variation in the microbiota of artisanal cheeses or the prevalence of some genera in all seasons directly influences the sensory characteristics and technological attributes of the final product due to a complex interaction between the different microorganisms and a high rate of metabolite diversity, both of which give cheeses their flavor (Dal Bello et al., 2010).

Conclusion

The results of this work represent the first molecular approaches that target the traditional cheeses produced in Conceição do Araguaia and Redenção situated in the Pará state, in northern Brazil. Different LAB were isolated from cheeses produced in the dry and rainy seasons, demonstrating their genetic variability and providing a proper understanding of these artisanal cheese ecosystems. Finally, the obtained results lead to further studies to explore the technological and beneficial potential of the isolated strains, targeting their possible use by the dairy industry as adjunct

cultures in production of fermented products.

Acknowledgments

CNPq, CAPES, FAPEMIG for financial support.

References

Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5721–32.

Alegría, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 44–51.

Al-khaldi, S.F., Mossoba, M.M. (2004). Gene and Bacterial Identification Using High-Throughput Technologies: Genomics, Proteomics, and Phonemics. *Nutrition, Disease and The Genome*, 20, 32-38.

Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., Hiramatsu, K. (2009). Complete genome sequence of *Staphylococcus caseolyticus* strain JCSCS5402, [corrected] reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 191, 1180–90.

Bonetta, S., Bonetta, S., Carraro, E., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2008). Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food microbiology*, 25, 786–92.

Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., De Vuyst, L. (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Veterinary Microbiology*, 157, 383–90.

Cardoso, V.M., Borelli, B.M., Lara, C.A., Soares, M.A., Pataro, C., Bodevan, E.C., Rosa, C.A. (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*, 69, 331–340.

Carr, F.J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281–370.

Castro, R., Oliveira, L., Sant, F., Luiz, L., Sandes, S., Silva, C., Silva, A., Nunes, A., Penna, C., Souza, M. (2016). Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*, 99, 1–11.

Christensen, J.J., Facklam, R.R. (2001). *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3520–3.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 29–43.

Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I., Beimfohr, C. (2007). Optimization of conditions for profiling bacterial populations of food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 100–109.

Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., Cocolin, L. (2010). Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and

antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT Food Science and Technology*, 43, 1151–1159.

de Freitas, R., Pinheiro Luiz, L.M., Alves, M.P., Valence, F., Nero, L.A., de Carvalho, A.F. (2013). Selective enumeration of propionibacteria in Emmental-type cheese using Petrifilm™ Aerobic Count plates added to Lithium Glycerol broth. *Journal of Dairy Research*, 80, 270–275.

Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube, G. (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science*, 97, 6046–6056.

Deng, W.D., Wanapat, M., Ma, S.C., Chen, J., Xi, D.M., He, T.B., Yang, Z.F., Mao, H.M. (2007). Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences manifest rumen bacterial diversity in Gayals (*Bos frontalis*) fed fresh bamboo leaves and twigs (*Sinarumdinaria*). *Asian Australas. Journal of Animal Science*, 20, 1057–1066.

Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Bertolino, M., Cocolin, L. (2010). Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 71–5.

Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 302–311.

Favier, C.F., Vaughan, E.E., Vos, W.M. De, Akkermans, A.D.L., (2002). Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Applied and environmental Microbiology*, 68, 219–226.

Feligini, M., Panelli, S., Buffoni, J.N., Bonacina, C., Andrighetto, C., Lombardi, A. (2012). Identification of microbiota present on the surface of Taleggio cheese using PCR DGGE and RAPD-PCR. *Journal of Food Science*, 77, 609–615.

Fontana, C., Cappa, F., Rebecchi, A., Cocconcelli, P.S. (2010). Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 205–211.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., Mcsweeney, P.L.H. (2000). Starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Fundamentals of cheese science* (pp. 54-97). Aspen Publishers, Gaithersburg.

Fuka, M.M., Engel, M., Skelin, A., Redzepović, S., Schloter, M. (2010). Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 19–24.

Gala, E., Landi, S., Solieri, L., Nocetti, M., Pulvirenti, A., Giudici, P. (2008). Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 347–51.

Garcia Fontan, M.C., Franco, I., Prieto, B., Tornadijo, M.E., Carballo, J. (2001). Microbiological changes in San Simòn cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiology*, 18, 25–33.

Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F., Feligini, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 188–95.

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

Giraffa, G., Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 19–34.

Guerrero, L., Guardia, M.D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska, Biemans, S., Sajdakowska, M., Sulmont-Rosse, C., Issanchou, S., Contel, M., Scalvedi, M.L., Granli, B.S., Hersleth, M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative Cross-Cultural Study. *Appetite*, 52, 345–354.

Haakensen, M., Pittet, V., Ziola, B. (2011). Reclassification of *Paralactobacillus selangorensis* (Leisner *et al.*, 2000) as *Lactobacillus selangorensis* comb. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 61, 2979–83.

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – Centro de previsão do tempo e estudos climáticos. <http://www.cptec.inpe.br/> Accessed 22 November 2016.

Jany, J.L., & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25, 839–848.

Kisand, V., & Wikner, J. (2003). Combining culture-dependent and -independent methodologies for estimation of richness of estuarine bacterioplankton consuming

riverine dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3607–3616.

Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, J., Christensen, H., Rusul, G. (2000). Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chilli bo, a Malaysian food ingredient. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 50, 19–24.

Lopez-Cortes, A., Schumann, P., Pukall, R., Stackebrandt, E. (2006). *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov. isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 183–190.

McLeod, A., Zagorec, M., Champomier-Verges, M-C., Naterstad, K., Axelsson, L. (2010). Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis. *BMC Microbiology*, 10, 120.

Menezes, S.S. (2011). Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. *Revista de Geografia*. 28, 40-56.

Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 177, 136–54.

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O., Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, 9(4), 190–198.

Moraes, P.M., Perin, L.M., Silva, A. Jr., Nero, L.A. (2013). Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109–112.

Martinez RC, Staliano CD, Vieira AD, Villarreal ML, Todorov SD, Saad SM, Franco BD. (2015) Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. *Food Microbiology*, 48, 143-152

Mucchetti, G., Neviani, E. (2006). “Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza”. (Eds.). Tecniche Nuove, Milano, Italy.

Pangallo, D., Saková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., Kuchta, T. (2014). Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 38–43.

Parayre, S., Falentin, H., Madec, M-N., Sivieri, K, Le Dizes, A-S., Sohier, D., Lortal, S. (2007). Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low gc-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiology Methods*, 69, 431–44.

Pasquale D. I., Cagno D. R., Buchin S., Angelis D. M., G.M., (2014). Reveal a Succession in the Core Microbiota Involved in the Ripening of Pasta Filata Caciocavallo Pugliese Cheese. *Microbial Ecology Dynamics*, 80, 6243- 6245.

Pelaéz, C., & Requema, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15, 831-844.

Perin, L.M., & Nero, L.A. (2014). Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology*, 14, 36.

Quartermain, L., Tailor, H., Njenga, S., Bhattacharjee, P., Rao, G.G. (2013). Neonatal *Granulicatella elegans* Bacteremia, London, UK. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1165–1166.

Randazzo, C.L., Pitino, I., De Luca, S., Scifò, G.O., Caggia, C. (2008). Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 269–78.

Salveti, E., Torriani, S., Felis, G.E. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 217–26.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schleifer, K., H., Kilpper-Balz, R., Fischer, U., Faller, A., Endl, J. (1982). Identification of “*Micrococcus candidus*” ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of “*Micrococcus caseolyticus*” ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, 15-20.

Settanni, L., Grigoli, D.A., Tornambé, G., Bellina, V., Francesca, N., Moschetti, G., Bonanno, A. (2012). Persistence of wild *Streptococcus thermophilus* strains on wooden vat and during the manufacture of a traditional Caciocavallo type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 73–81.

Sgarbi, E., Lazzi, C., Tabanelli, G., Gatti, M., Neviani, E., Garini, F. (2013). Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal of Dairy Science*, 7, 4223–4234.

Sorokulova, I., Krumnow, A., Globa, L., Vodyanoy, V. (2009). Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1123–1126

Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Nikolic, M., Topisirovic, L., Kojic, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food Microbiology*, 39, 27-38.

Terzic-Vidojevic, A., Tolinacki, M., Nikolic, M., Veljovic, K., Jovanovic, S., Macej, O., Topisirovic, L. (2013). Artisanal Vlasina Raw Goat's Milk Cheese: Evaluation and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 51(4), 554–563.

Vishnivetskaya, T.A., Siletzky, R., Jefferies, N., Tiedje, J.M., Kathariou, S. (2007). Effect of low temperature and culture media on the growth and freeze-thawing tolerance of *Exiguobacterium* strains. *Cryobiology*, 54, 234–240.

Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91–109.

Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. (2012) Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 10, 2:48.

**2. CAPÍTULO 2: Diversidade genética de
Lactococcus lactis subsp. *lactis* isolados de
fontes lácteas e não lácteas**

Estudo por MLST e biodiversidade genética de estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isoladas de fontes lácteas e não lácteas brasileiras

Resumo

Estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* são utilizadas nos principais processos fermentativos da indústria de lácteos. Este estudo teve como objetivo identificar e avaliar a diversidade genética de *L. lactis* subsp. *lactis* isolados de diferentes fontes vegetais e lácteas no Brasil. A identificação de *L. lactis* subsp. *lactis* foi realizada por sequenciamento parcial do 16S rRNA, PCR do 16S rRNA subespécie específica, seguida de uma etapa de restrição enzimática utilizando *MbolI*. Vinte e três isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* foram encontrados e submetidos primeiramente às análises de REP-PCR e PFGE para verificar a presença de clones na coleção. Não havendo, a análise de MLST foi realizada para os 23 isolados utilizando 6 genes *housekeeping*. A análise de REP-PCR teve maior poder discriminatório. A análise de MLST revelou a existência de 11 STs sendo que, destas, 9 ainda não haviam sido identificadas. Na análise do agrupamento dos STs ocorreu a formação de 2CC sendo o CC1 formado por 3 isolados e CC2 por dois isolados. Todos os outros STs se distribuíram na forma de “*singletons*”. Esses resultados nos mostram que essa coleção possui uma diversidade interessante para ser explorada, podendo contribuir no fornecimento de novas estirpes com potencial para serem utilizadas em produtos fermentados na indústria de alimentos.

Palavras chaves: diversidade genética, MLST, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Introdução

As bactérias lácticas (BAL) são muito difundidas na natureza, sendo capazes de colonizar e multiplicar-se em diferentes condições ambientais, incluindo a microbiota

do intestino de humanos e animais, bem como ambientes nutricionalmente ricos como leite, vegetais, carne, frutas e bebidas, uma vez que são consideradas micro-organismos fastidiosos (DALIÉ; DESCHAMPS; RICHARD-FORGET, 2010). Do grupo das BAL, a espécie *L. lactis* se destaca como um dos micro-organismos mais utilizados na indústria de laticínios e sua utilização possui o *status* “Generally Recognised As Safe” (GRAS) (LAROUTE et al., 2017). *L. lactis* é utilizada na fabricação de vários produtos lácteos artesanais e como cultura *starter* na indústria de alimentos. A presença dessa cultura nos produtos, tem como consequência a produção de ácido láctico durante a fermentação, o que confere ao produto características únicas de sabor, além de preparar o meio através da redução do pH, para o desenvolvimento de outros micro-organismos secundários, que também irão contribuir para o flavor final do produto.

A pesquisa por novas estirpes de *L. lactis* de ecossistemas lácteos e não-lácteos tem sido vista como uma estratégia para produção de alimentos fermentados com características tecnológicas diferenciadas e como nova alternativa de culturas bioprotetoras contra o desenvolvimento de patógenos em queijos (HO et al., 2018). As estirpes ambientais de *L. lactis* tendem a possuir uma diversidade maior de genes, que pode resultar em uma maior capacidade de produzir compostos aromáticos diferenciados em queijos e ainda não existentes em culturas industriais (MORALES et al., 2003).

Segundo Nomura et al. (2006), as estirpes de *L. lactis* isoladas de plantas produzem compostos associados ao aroma diferenciados das estirpes isoladas de leite, além de demonstrarem ser mais resistentes a condições ambientais adversas.

O conhecimento da diversidade de comunidades microbianas de *Lactococcus spp.* isolados em diferentes ambientes lácteos e não-lácteos expandiu-se com o uso de análises moleculares como MLST, por meio das quais é possível explorar e

conhecer novos ecossistemas, auxiliar na seleção de isolados diferenciados geneticamente que poderão apresentar um bom potencial para aplicação tecnológica em lácteos. Neste contexto, a *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é uma técnica molecular que permite a definição da ecologia e da filogenia de novas estirpes de *Lactococcus*, uma vez que tende a ser mais informativa comparada a outros métodos de genotipagem (PASSERINI et al., 2010). A técnica MLST é baseada no sequenciamento de um limitado número (geralmente 5 ou 7) de genes de manutenção presentes no genoma core (genoma típico da espécie como um todo) (BELÉN; PAVÓN; MAIDEN, 2009).

Assim, neste trabalho foi avaliada a diversidade de *L. lactis* subsp. *lactis* isoladas de ambientes lácteos e não-lácteos brasileiros, utilizando as técnicas de REP-PCR e PFGE como suporte para a análise de MLST.

Material e método

Coleção de isolados

Noventa e duas cepas pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Pesquisa em Leite e Derivados, Inovaleite, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa- MG foram utilizadas neste trabalho. Os isolados são provenientes de diferentes ecossistemas, incluindo ambientes vegetais como silagem de capim e silagem de amendoim e também outros ecossistemas como queijos artesanais da região amazônica, queijo artesanal da Ilha de Marajó, leite de cabra, leite de búfala e leite de vaca. Os isolados estudados já haviam sido identificados como *L. lactis* por meio de métodos fenotípicos e, por isso, a confirmação de espécie e subespécie por meio de técnicas moleculares foi necessária. A ativação dos isolados foi realizada em meio de cultura Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Acumedia, Lansing, EUA) a 32 °C por 48 h.

Como estirpe de referência foram utilizadas *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 1428 para confirmação de subespécie por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação molecular de *Lactococcus lactis* por sequenciamento 16S rDNA

Após a extração do DNA, os noventa e dois isolados foram submetidos à amplificação do gene 16S rDNA utilizando os primers universais P027 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (DENG et al., 2007). Os fragmentos obtidos possuem aproximadamente 1500pb. As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL utilizando-se Go Taq Master Mix (Promega, Madison, USA), 50 pmol do primer, 2 µL de DNA na concentração aproximada de 80 ng. A reação foi realizada utilizando-se desnaturação inicial na temperatura de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 34 segundos, anelamento a 63 °C por 1 min, extensão por 1 min e 30 segundos a 72 °C e extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) durante 2 h a uma tensão constante de 120 V em tampão Tris / Borato / EDTA 1X (TBE). Para verificar o tamanho dos fragmentos utilizou-se o marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Promega, Madison, USA). Os géis foram corados utilizando Diamont TM Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, WI, USA) e as bandas foram visualizadas sob luz UV.

Os fragmentos foram enviados para Macrogen Inc., na Coreia, para sequenciamento do gene amplificado e as sequências obtidas foram alinhadas com outras sequências de genes 16S rRNA presentes no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) do National Center for Biotechnology information (NCBI) utilizando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Confirmação da subespécie *L. lactis* subsp. *lactis*

Após o cultivo em meio de cultura Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Acumedia) por 18 h a 32 °C, os isolados confirmados como *L. lactis* foram submetidos à extração de DNA utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA). A identificação da subespécie *L. lactis* subsp. *lactis* foi realizada por meio de PCR subespécie específica em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio Rad, Califórnia, EUA) e, posteriormente, foi realizada a digestão dos fragmentos utilizando a enzima *MbolI* (Carlsbad, Califórnia, USA) de acordo com PU et al. (2002). Para a eletroforese foi preparado um gel de agarose a 1,5% (m/v) (Uniscience) e a corrida foi realizada a 100 V por 60 min. Os fragmentos foram corados utilizando Diamont™ (Promega, Madison, USA). Para confirmação do tamanho do fragmento de 236 pb para *L. lactis* subsp. *lactis* foi utilizado um marcador molecular 100pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA).

Análise da presença de clones por REP-PCR

A REP-PCR (amplificação de um fragmento palíndromo extragênico repetitivo) foi conduzida apenas para as cepas identificadas como *L. lactis* subsp. *lactis*. A metodologia foi realizada como descrito por Dal Bello et al. (2010), utilizando-se o *primer* (GTG)₅ (5'- GTGGTGGTGGTGGTG-3'). As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL utilizando-se Go Taq Master Mix (Promega, Madison, USA), 50 pmol do *primer* e 2 µL de DNA na concentração aproximada de 80 ng. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) (Uniscience) durante 2 h a uma tensão constante de 120 V em tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para verificar o tamanho dos fragmentos utilizou-se o marcador molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega,). Os géis foram corados utilizando

Diamont™ Nucleic Acid Dye (Promega,) diluído 1:500 e aplicado 0,6 µL por cada 1 µL de amostra. As bandas foram visualizadas sob luz UV. Os perfis de bandas foram analisadas utilizando software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). As semelhanças entre os perfis foram calculadas utilizando a correlação de Pearson e os dendrogramas foram construídos utilizando o Método do Grupo de Pares Não Ponderado com Média Aritmética (UPGMA).

Análise da presença de clones por PFGE

Os isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* foram cultivados em caldo MRS (Acumedia) até atingirem densidade óptica (DO₆₅₀) maior que 0,3 e menor que 1. As células foram recuperadas por centrifugação a 3500 x g por 10 min a partir de 10 mL de cultura. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) acrescido de lisozima 10 mg·mL⁻¹ (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubado a 37 °C por 1 h. Após a incubação, os tubos contendo as células foram colocados em banho-maria a 60 °C por 30 min e, posteriormente, acrescidos de 700 µL de Megabase Agarose (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA) à 60 °C. A solução foi homogeneizada e então distribuída em moldes para confecção dos blocos de agarose. Os blocos foram armazenados a 4 °C por 15 min e transferidos do molde para tubos contendo tampão TE até o momento da etapa de desproteíntização. Nesta etapa, os blocos foram retirados do tubo e transferidos para outro contendo solução de desproteíntização (Tris-base 10 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0, SDS a 10%, 20 mg·mL⁻¹ de Proteinase K (Sigma, Saint Louis, MO, USA)) e incubados à 55 °C por 2 h. Após esse tempo, os plugs foram lavados 1 vez com 1 mL de água por 10 min e 4 vezes com 1 mL de TE (pH 8,0) por 10 min. Os blocos foram armazenados a 4 °C até o momento da digestão enzimática. A digestão enzimática do DNA foi realizada adicionando os plugs em tampão de restrição 1x

(Promega, Madison, WI, USA), acrescido de 15 unidades da enzima *SmaI* (Promega, Madison, WI, USA). Após a mistura, os blocos foram armazenados a 4 °C por 1 h. A digestão enzimática do DNA foi realizada na temperatura de 25 °C por 4 h. Posteriormente, os blocos foram aplicados em gel preparado com Megabase Agarose 1 % (m/v) (Bio Rad, Hercules, CA, USA) e tampão TBE 0,5x (45 mM tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM de EDTA, pH 8,0). A eletroforese foi realizada no equipamento CHEF-DR® III System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão TBE 0,5x a 14 °C com um pulso inicial de 2 s, final de 20 s a 6 V/cm durante 21 h. O gel obtido foi corado utilizando-se Diamont™ Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, WI, USA) 1x por 30 min e visualizado sob luz UV. Os perfis obtidos foram analisados utilizando software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). A análise dos perfis obtidos foi realizada utilizando a correlação de Pearson e demonstradas em um dendrograma construído por meio do Método do Grupo de Pares Não Ponderado com Média Aritmética (UPGMA).

Análise de diversidade *L. lactis* subsp. *lactis* por MLST

Os perfis de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolados de diversos ambientes, que não foram considerados idênticos nas análises de REP-PCR e PFGE, foram selecionados e submetidos à análise de MLST (*Multilocus Sequence Type*). Os genes estudados foram aqueles correspondentes a regiões intragênicas do genoma que codifica X-prolyldipeptidil Aminopeptidase (pepXP, 504 pb), fosfoglicerato Quinase (pgk, 480 pb), serina hidroximetiltransferase (GLYA, 453 pb), ATPase envolvida no reparo do DNA (recN, 489 pb), aminoácido de cadeia ramificada (bcaT, 516 pb) e pirimidina-nucleósido fosforilase (pdp, 492 pb), de acordo com Passerini et al. (2010). Os produtos foram sequenciados pela empresa MacroGen (Seoul, Rep. Korea). A partir dos fragmentos do genoma obtido, as sequências foram analisadas

utilizando CLC Sequence Viewer 6 e comparadas com as sequências disponíveis na base de dados (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>). Para explicar o agrupamento das STs foi utilizado o algoritmo BURST e a análise foi realizada utilizando o programa eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>).

Resultado e discussão

Dos noventa e dois isolados estudados, vinte e três foram identificados como *Lactococcus lactis* pelo sequenciamento e, posteriormente, foram confirmados como *L. lactis* subsp. *lactis* por PCR (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação de *Lactococcus lactis* por sequenciamento de 16S rRNA gene e da subespécie *L. lactis* subsp. *Lactis* por PCR subespécie-específica.

Número da estirpe	Origem	Identificação por sequenciamento	Número de identificação	Subespécie identificada no PCR subespécie-específica
2	Queijo artesanal da região amazônica (estação seca)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KY880977.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
10	Queijo artesanal da região amazônica (estação chuvosa)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99%)	<u>AB602817.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
12	Queijo tipo manteiga da Ilha do Marajó	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99%)	<u>AB602817.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
23	Silagem de capim	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>LT631749.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
24	Leite de vaca	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>LT631749.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
25	Silagem de capim	<i>Lactococcus lactis</i> (98%)	<u>KT261220.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
27	Queijo artesanal da região Amazônica	<i>Lactococcus lactis</i> (97%)	<u>KX880977.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

	(estação seca)			
29	Queijo artesanal da região amazônica (estação seca)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>LT631749.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
30	Silagem de amendoim	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KX880977.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
31	Queijo artesanal da região amazônica (estação seca)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KX880977.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
32	Queijo artesanal da região amazônica (estação seca)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KX880977.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
34	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KF879131.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
46	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KF879131.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
50	Queijo artesanal da região amazônica (estação chuvosa)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>LT631749.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
51	Leite de vaca	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99%)	<u>AB601162.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
52	Queijo artesanal da região amazônica (estação seca)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KX880980.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
61	Leite de búfala	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KX880980.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
71	Leite de búfala	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99%)	<u>AB601162.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
76	Queijo artesanal da região amazônica (estação seca)	<i>Lactococcus lactis</i> (100%)	<u>KY347896.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
78	Queijo artesanal da região amazônica	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<u>KF879131.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

(estação seca)				
80	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (99%)	<u>AB601162.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
84	Leite de vaca	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (100%)	<u>LC119135.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
90	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (100%)	<u>LC119135.1</u>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

A presença da espécie *Lactococcus lactis* nesses diferentes ambientes lácteos e não lácteos reforça os resultados obtidos por outros autores (Passerini et al., 2010; Achilleos and Berthier, 2013; Perin and Nero, 2014; Costa et al., 2013; Luiz et al., 2016). Kelly e colaboradores (2010) sugerem que inicialmente os *Lactococcus* tenham colonizado o leite devido ao contato com a grama ou com a forragem utilizada para fazer a cama do animal e que, posteriormente, se adaptaram ao ambiente lácteo. Estudos apontam também que, historicamente, *Lactococcus* colonizavam sementes antes da germinação e por isso conseguem se estabelecer e dominar rapidamente novos ambientes (KELLY; DAVEY; WARD, 1998).

Considerando a classificação proposta por PASSERINI et al. (2010), os *L. lactis* subsp. *lactis* obtidos neste trabalho são estirpes ambientais devido à sua origem de plantas, leite cru e queijos fabricados com leite cru. Alguns autores afirmam que apesar da espécie *L. lactis* ter sido considerada fastidiosa durante um longo período, ela vem demonstrando uma ótima capacidade de adaptação a diversos ambientes, podendo muitas vezes sobreviver a condições de pH extremo, diferentes disponibilidades de nutrientes e competição com outros micro-organismos (Guchte et al., 2002).

O estudo da espécie *Lactococcus lactis* no que se refere a diferenciação da subespécie *L. lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ainda apresenta dificuldades devido à semelhança entre os genomas das duas subespécies. O sequenciamento do gene 16S rRNA, eficiente na identificação de algumas espécies, não apresenta bons resultados no caso de *L. lactis*, visto que os resultados obtidos não são confiáveis para distinguir essas duas subespécies, *lactis* e *cremoris*. De acordo com Crhistopher et al. (2009), isso acontece devido às múltiplas cópias do gene 16S rRNA (4 a 7 cópias) existentes no genoma de *L. lactis*, que assim como em outras bactérias podem gerar resultados equivocados no sequenciamento, dependendo de qual cópia do 16S rRNA for amplificada. O mesmo autor afirma que o método utilizado por Pu et al. (2002) demonstrou bons resultados. No presente estudo, após o sequenciamento do 16S rRNA, foi realizada a identificação da subespécie *lactis* e *cremoris* de acordo com Pu et al., (2002), para que posteriormente a avaliação da diversidade genética pudesse ser realizada pelo esquema de MLST proposto por Passerini et al., (2010).

A análise de REP-PCR revelou a formação de 18 *clusters* dentre os 23 isolados analisados (Figura 1), considerando 90% de similaridade. Os grupos formados tiveram baixa homologia entre si, indicando alta diversidade entre as estirpes de *Lactococcus lactis*.

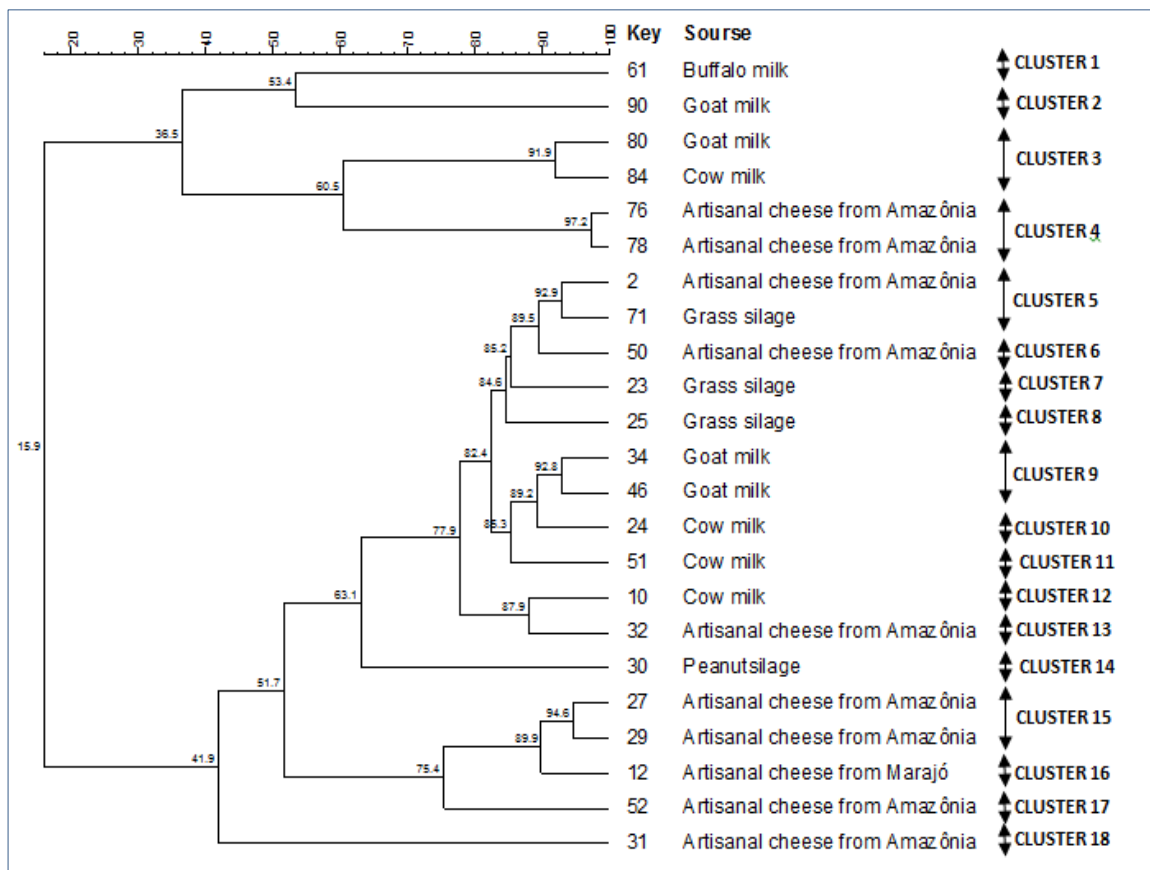


Figura 1. Dendrograma baseado no agrupamento UPGMA na análise de REP-PCR para os 23 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Não houve formação de *clusters* com mais de dois isolados e o máximo de homologia encontrada foi no cluster 4, entre os isolados 76 e 78, que apresentaram 97,2% de homologia, ambos isolados dos queijos artesanais da região amazônica. As estirpes 80 e 84 originadas de leite de cabra e vaca respectivamente, apresentaram 91,9% de similaridade no *cluster* 3. Os isolados 2 e 71 de queijo artesanal da região amazônica e silagem de capim respectivamente, apresentaram 92,9% de similaridade formando o *cluster* 5.

Esperava-se que as estirpes de origem láctea tivessem uma similaridade muito maior entre si que em relação às estirpes de origem vegetal, considerando que durante a adaptação ocorrem perdas, mutações e aquisições de genes para adaptação ao novo habitat.

Em relação aos três isolados de origem vegetal, houve um agrupamento das estirpes 23 e 25 oriundas de silagem de capim, com 84,3% de similaridade, enquanto a estirpe 30, oriunda de silagem de amendoim, que apresentou baixa similaridade com todos os outros isolados. Por ser tão diferente geneticamente e ainda se tratar de um isolado de origem vegetal, a cepa 30 pode apresentar características genotípicas diferenciadas e interessantes para a indústria de alimentos.

Dentre os isolados de origem láctea as estirpes 34 e 46, ambas isoladas de leite de cabra, apresentaram 92,8% de similaridade formando o cluster 9 e os isolados 27 e 29 apresentaram 94,6% de similaridade no cluster 15. O isolado 31, obtido de queijo artesanal da região amazônica apresentou baixa similaridade em relação às demais estirpes lácteas e, assim como o isolado 30, também pode apresentar características fenotípicas interessantes para aplicação industrial. A estirpe 12 originária de queijo artesanal da ilha de Marajó apresentou homologia de 89,9% com as estirpes 29 e 27 isoladas dos queijos do sul do Pará, indicando que pode haver grande similaridade entre isolados de queijos artesanais de diferentes regiões.

O estudo de diversidade realizado por meio da análise de PFGE revelou a existência de perfis com 100% de similaridade (Figura 2).

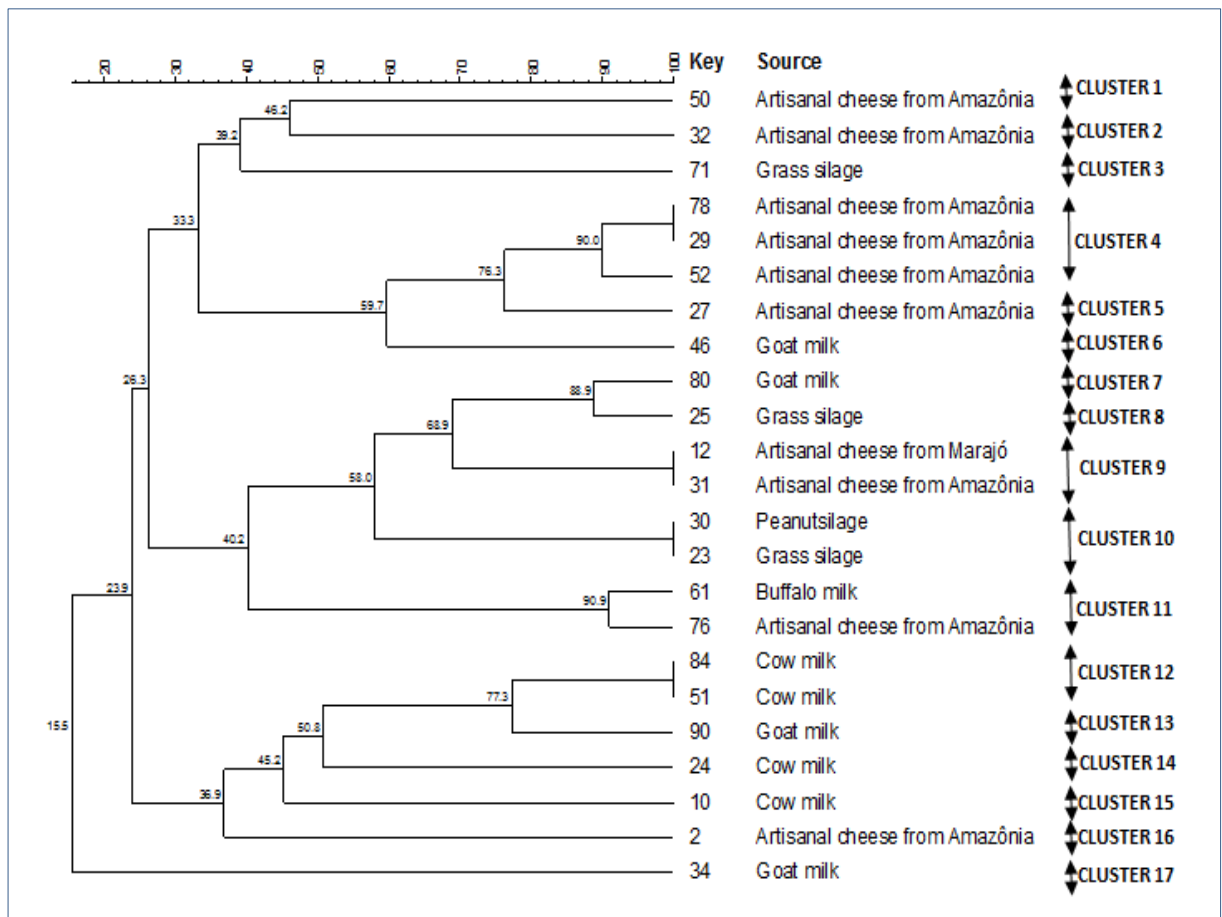


Figura 2. Dendrograma baseado no agrupamento UPGMA do perfil de restrição *SmaI* PFGE de 23 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Esta ocorrência foi encontrada nos pares de isolados 78 e 29, 12 e 31, 30 e 23, 84 e 51. A presença dos perfis semelhantes pode indicar que a PFGE, apesar de ser utilizada historicamente na avaliação da diversidade de microorganismos, não foi capaz de indicar diferenças genéticas das estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* quando utilizada a enzima *SmaI* para restrição do DNA.

Os clones 78 e 29 foram coletados a partir de queijo artesanal da região amazônica no período seco e foram considerados idênticos ao isolado 52, que também tem origem destes mesmos queijos, com 90% de similaridade. Os clones 12 e 31 são também provenientes de queijos artesanais, porém, produzidos em regiões diferentes. Os clones 30 e 23 são isolados de fontes vegetais como silagem de

amendoim e silagem de capim, respectivamente, e os isolados 84 e 51, que também tiveram 100% de similaridade, são ambos isolados dos queijos artesanais da região amazônica.

Alguns isolados como o 2, 10, 34 e 24 apresentaram perfis muito diferentes de todos os outros encontrados. Psoni et al., (2007) também avaliaram a diversidade genética de *L. lactis* no queijo Batzos utilizando PFGE e verificaram a existência de um alto grau de heterogeneidade entre as estirpes. PFGE também foi utilizada por Alemayehu et al. (2014) para avaliar a diversidade de *L. lactis* subsp *lactis* isolados de fontes vegetais como capim, milho e ervilhas.

No geral, o agrupamento obtido na análise de PFGE confirmou o resultado da REP-PCR quando se observa a tendência de agrupamento entre estirpes de origem láctea e não láctea. Porém, os níveis de similaridade e a distribuição dentro dos grupos não foram os mesmos. Na análise de PFGE ocorreu também um número maior de perfis isolados.

As diferenças entre os resultados obtidos nas duas técnicas podem ser explicadas pela forma que cada metodologia possui de explorar o polimorfismo do DNA. A análise por REP-PCR é considerada uma técnica confiável, que reproduz padrões de bandas complexos com boa repetibilidade e capacidade discriminatória superior a outras técnicas baseadas em PCR, e já foi utilizada por outros autores para diferenciar bactérias lácticas, incluindo *L. lactis* subsp. *lactis* (Mohammed et al., 2009; Dal Bello et al., 2010; Perin and Nero, 2014; Terzic-Vidojevic et al., 2014; Tormo et al., 2015; Visintin et al., 2016; Perin et al., 2017). A análise de PFGE é mais complexa e se baseia no polimorfismo enzimático de restrição em uma análise de todo genoma, podendo detectar alterações específicas como deleções, inserções e rearranjos do DNA. Essa análise é considerada um método eficiente nos estudos de diversidade de bactérias do ácido láctico podendo, com seu alto poder

discriminatório, diferenciar estirpes pertencentes à mesma espécie ou até mesmo a distinção de subespécies (Randazzo et al., 2009). O poder discriminatório da análise de PFGE está diretamente ligado à escolha da enzima de restrição. A endonuclease *SmaI* têm sido utilizada em diversos trabalhos para a diferenciação de *Lactococcus lactis* e outras bactérias lácticas pela análise de PFGE (Psoni et al., 2007; Pillidge et al., 2009; Terzic-Vidojevic et al., 2015; Zycka-krzesinska et al., 2015; Bozoudi et al., 2016; Domingos-Lopes et al., 2017).

A análise de PFGE apresentou um menor poder discriminatório entre os 23 isolados. Este resultado pode ser explicado devido ao fato de a análise ter sido conduzida apenas com uma enzima (*SmaI*). Considerando as variações obtidas nas análises de PFGE e REP-PCR foi definido que todos os 23 isolados consistiam em estirpes únicas e portanto deveriam ser submetidos à análise de MLST.

A tipagem dos 23 isolados por MLST revelou existência de 11 STs indicando um alto nível de heterogeneidade dentre os isolados (Tabela 2). Novos alelos foram obtidos para os *loci* estudados, excluindo *Bcat* que não apresentou nenhum *locus* novo. Das 11 STs obtidas, apenas duas (14 e 65) já foram descritas anteriormente (LUIZ et al., 2016; PASSERINI et al., 2010) e estão depositadas no banco de dados MLST para *L. lactis* subsp. *lactis* (<http://www-mlst.biotoul.fr/Lactococcuslactissubsplactis>).

Tabela 2. Origem, Alelos e STs obtidas na análise de MLST para isolados de *L. lactis* subsp *lactis*.

Número do isolado	Origem	ST	Alelos					
			<i>Bcat</i>	<i>Glya</i>	<i>Pdp</i>	<i>Pepxp</i>	<i>Pgk</i>	<i>Recn</i>
2	Queijo artesanal da região amazônica	65	8	12	9	22	22	14
10	Leite de vaca	65	8	12	9	22	22	14

12	Queijo artesanal da Ilha de Marajó	14	4	4	3	4	6	6
23	Silagem de capim	<i>103</i>	11	17	32	6	10	33
24	Leite de vaca	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14
25	Silagem de capim	<i>105</i>	11	17	3	32	33	33
27	Queijo artesanal da região amazônica	<i>106</i>	8	12	9	11	33	34
29	Queijo artesanal da região amazônica	<i>106</i>	8	12	9	11	33	34
30	Silagem de amendoim	<i>107</i>	11	17	33	6	3	35
31	Queijo artesanal da região amazônica	<i>108</i>	2	33	34	6	34	36
32	Queijo artesanal da região amazônica	<i>109</i>	2	33	34	6	35	36
34	Leite de cabra	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14
46	Leite de cabra	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14
50	Queijo artesanal da região amazônica	65	8	12	9	22	22	14
51	Leite de vaca	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14
52	Queijo artesanal da região amazônica	<i>106</i>	8	12	9	11	33	34
61	Leite de búfala	<i>110</i>	11	17	33	6	3	33
71	Silagem de capim	<i>111</i>	11	17	6	6	36	33
76	Queijo artesanal da região amazônica	<i>106</i>	8	12	9	11	33	34
78	Queijo artesanal da região amazônica	<i>106</i>	8	12	9	11	33	34
80	Leite de cabra	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14
84	Leite de vaca	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14
90	Leite de cabra	<i>104</i>	8	12	14	1	14	14

*Novos STs estão em itálico.

O estudo da distribuição das STs dos isolados realizado no programa eBRURST não indicou um ancestral comum entre os organismos da coleção estudada. A maioria das STs apresentou uma distribuição denominada “*singletons*”, que caracteriza STs que ficaram isolados no diagrama porque diferiram em mais de

2 loci dos 6 estudados e, por isso, foram considerados perfis distantes dos outros analisados. Dois complexos clonais foram formados, sendo o CC1 composto por 3 isolados de STs 109, 111, 108 e o CC2 composto por 2 isolados com STs 110 e 107 (Figura 3). Os isolados que compõem o CC1 incluem duas estirpes de queijo artesanal do sul do Pará e 1 estirpe de capim de silagem. Já o CC2 foi formado por 2 estirpes isoladas de leite de búfala e silagem de amendoim. As relações observadas nesses dois complexos indicam a proximidade genética que pode ocorrer entre isolados de origem láctea e não-láctea, o que não é evidenciado nas análises de REP-PCR e PFGE. A falta de correlação entre estirpes com baixo grau de similaridade no PFGE e que apresentaram uma relação genética no MLST também foi observada por outros autores (Picozzi et al., 2010; Freitas et al., 2015).

Do ponto de vista dos resultados da análise de PFGE, as diferenciações dos perfis podem indicar uma grande variabilidade na organização do genoma, por meio de rearranjos ou no conteúdo do genoma expresso por meio de deleções ou inserções de elementos genéticos móveis. Resultados contrários aos descritos acima também ocorreram com alguns isolados que apresentaram 100% de similaridade na análise de PFGE e apresentaram STs diferentes, com uma relação distante na análise dos STs. Na verdade, a comparação direta entre os resultados obtidos entre as duas análises é devido a forma como cada uma delas estuda o isolado em questão. A análise de MLST identifica pequenas mutações nos genes constitutivos, enquanto o PFGE identifica rearranjos significativos no genoma. Além disso, a velocidade com que ocorrem essas modificações genéticas avaliadas por essas duas análises são diferentes, sendo portanto, difíceis de serem comparadas. Mesmo assim, em alguns casos há uma correlação direta entre os isolados com alta similaridade na análise de PFGE e isolados com mesmo ST como relato por LUIZ et al. (2016).

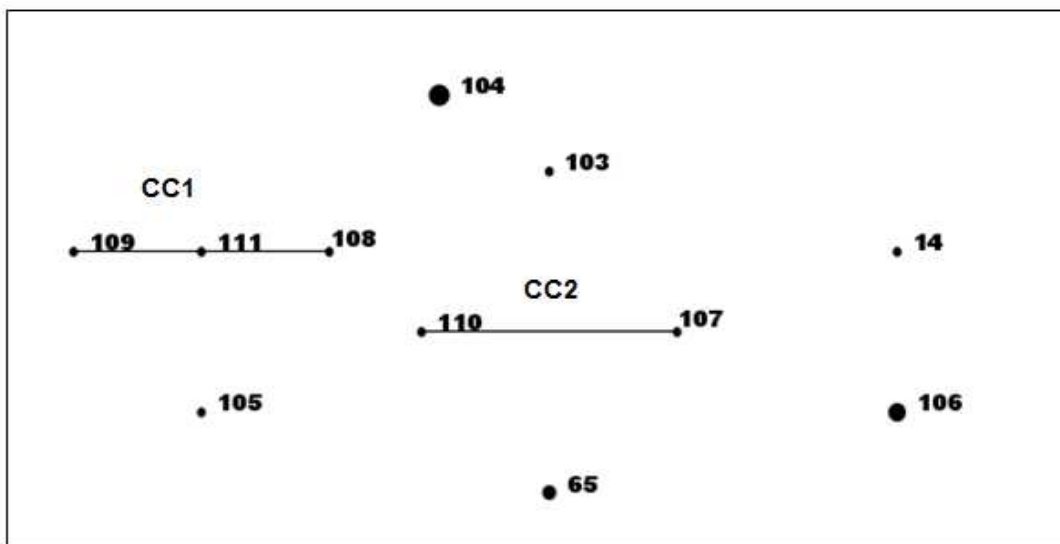


Figura 3. Diagrama eBURST “population snapshot” isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* e BURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>). Foram formados 2 complexos clonais diferentes (CC1-CC2). O tamanho dos pontos é proporcional ao número de isolados.

Além dos isolados agrupados na forma de CC, houve a distribuição de STs na forma de “*singletons*” por possuírem uma relação mais distante com os outros isolados. As STs 104 e 106 mostradas no diagrama foram compostas por 7 e 5 isolados cada uma, respectivamente. Dentre as cepas que compartilharam a ST 104 estão presentes isolados apenas de leite de vaca e cabra, sendo que alguns deles apresentaram alto grau de similaridade nas análises de REP-PCR e PFGE.

Os isolados que compõem a ST 106 são todos provenientes de queijos artesanais da região amazônica. Neste caso, observa-se um agrupamento que pode estar diretamente relacionado com a região em que os queijos foram coletados. Apesar dos queijos terem sido fabricados por produtores diferentes, estavam todos submetidos à mesma condição da região e o mesmo clima, podendo ter influenciado

à presença de uma cepa específica. Acredita-se que mesmo havendo variabilidade em isolados da mesma região, esta é menor quando comparada com isolados de várias regiões e habitats.

As outras STs 103, 105 e 111 também distribuídas como *singletons* foram compostas apenas por 1 isolado, todas de fontes não-lácteas de onde já se esperava uma tendência maior de heterogeneidade genética (PASSERINI et al., 2010).

Conclusão

Este trabalho contribuiu para a identificação e caracterização da diversidade genética de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolados de diferentes fontes vegetais e lácteas. O conhecimento da diversidade desses isolados foi de extrema importância para a continuidade do trabalho de seleção de novas estirpes com potencial para serem utilizadas na indústria de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro das seguintes agências brasileiras:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286–295, 2013.

ALEMAYEHU, D. et al. International Journal of Food Microbiology Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 57–61, 2014.

BELÉN, A.; PAVÓN, I.; MAIDEN, M. C. J. Europe PMC Funders Group Multilocus Sequence Typing. n. 8, p. 1–11, 2009.

BOZOUDI, D. et al. LWT - Food Science and Technology Assessment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and mature PDO Feta cheese made at three mountainous areas of Greece. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 525–533, 2016.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, v. 47, p. 45–61, 2015.

COSTA, H. H. S. et al. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minasartesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858–1866, 2013.

DAL BELLO, B. et al. LWT - Food Science and Technology Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1151–1159, 2010.

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 370–380, 2010.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178–190, 2017.

FREITAS, R. DE et al. Biodiversity of dairy Propionibacterium isolated from dairy farms in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 70–77, 2015.

GUCHTE, M. VAN DE et al. Stress responses in lactic acid bacteria. **CEUR Workshop Proceedings**, v. 1621, n. September, p. 36–43, 2002.

HO, V. T. T. et al. Characterisation of Lactococcus lactis isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against Listeria monocytogenes in cheese. **Food Control**, v. 85, p. 472–483, 2018.

KELLY, W. J.; DAVEY, G. P.; WARD, L. J. H. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 85–92, 1998.

KELLY, W. J.; WARD, L. J. H.; LEAHY, S. C. Chromosomal diversity in Lactococcus lactis and the origin of dairy starter cultures. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, n. 1, p. 729–744, 2010.

LAROUTE, V. et al. From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of Lactococcus lactis. **Microorganisms**, p. 1–17, 2017.

LUIZ, L. M. P. et al. Mesophilic Lactic Acid Bacteria Diversity Encountered in Brazilian Farms Producing Milk with Particular Interest in Lactococcus lactis Strains. p. 503–511, 2016.

MOHAMMED, M. et al. International Journal of Food Microbiology Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 417–423, 2009.

- MORALES, P. et al. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 201–209, 2003.
- NOMURA, M. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 396–405, 2006.
- PARAPOULI, M. et al. Characterization of a wild, novel nisin A-Producing *Lactococcus* strain with an *L. lactis* subsp. *cremoris* genotype and an *L. lactis* subsp. *lactis* phenotype, isolated from Greek raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 11, p. 3476–3484, 2013.
- PASSERINI, D. et al. Genes but Not Genomes Reveal Bacterial Domestication of *Lactococcus Lactis*. v. 5, n. 12, 2010.
- PERIN, L. M. et al. International Journal of Food Microbiology Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 159–167, 2015.
- PERIN, L. M. et al. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017.
- PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- PICOZZI, C. et al. Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 2035–2045, 2010.
- PILLIDGE, C. J. et al. Intragenomic 16S rRNA gene heterogeneity in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 222–227, 2009.

PISANO, M. B. et al. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. **Food Control**, v. 51, p. 1–8, 2015.

PERSONI, L. et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos , a Greek PDO raw goat milk cheese. v. 114, p. 211–220, 2007.

PU, Z. Y. et al. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. p. 353–361, 2002.

RANDAZZO, C. L. et al. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. **Food Control**, v. 20, n. 8, p. 756–763, 2009.

TERZIC-VIDOJEVIC, A. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses , sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. **Food Microbiology**, v. 39, p. 27–38, 2014.

TERZIC-VIDOJEVIC, A. et al. LWT - Food Science and Technology Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. v. 63, p. 298–306, 2015.

TORMO, H. et al. International Journal of Food Microbiology Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 9–15, 2015.

VISINTIN, S. et al. International Journal of Food Microbiology Molecular identification and physiological characterization of yeasts , lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 69–78, 2016.

VLIEG, J. E. VAN H. et al. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 183–190, 2006.

ZYCKA-KRZESINSKA, J. et al. International Journal of Food Microbiology Identification and characterization of tetracycline resistance in *Lactococcus lactis* isolated from Polish raw milk and fermented artisanal products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 134–141, 2015.

3. Capítulo 3: **Características tecnológicas de *L. lactis* subsp. *lactis* de fontes lácteas e não lácteas para produção de produtos fermentados**

Avaliação do potencial tecnológico de estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isoladas de ambientes lácteos e não lácteos

Mayra Carla de Freitas Martins^a, Andressa Fusieger, Luís Augusto Nero, Antônio Fernandes de Carvalho^{a*}

^aFood Science Department, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil. Tel.: +55 3138991800.

E-mail address: antoniofernandes@ufv.br (A.F. Carvalho).

Resumo

Lactococcus lactis subsp. *lactis* possui grande importância para a indústria de alimentos devida à sua utilização como cultura *starter*. O isolamento de novas estirpes a partir de ambientes lácteos e não lácteos pode revelar estirpes com potencial tecnológico para serem utilizadas pela indústria. Este trabalho teve como objetivo, a caracterização tecnológica desses isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* visando uma aplicação na indústria de alimentos. A primeira característica estudada foi o perfil de lactofermentação a partir da análise do coágulo formado após 24 e 48 h. Dos 23 isolados estudados, 8 não apresentaram formação de coágulo, 3 apresentaram coagulação uniforme porém frágil, 6 coagulação uniforme, 5 coagulação uniforme com soro na parte de baixo do tubo. O teste de produção de diacetil, revelou que 7 estirpes produzem diacetil sendo uma delas, isoladas de ambiente não-lácteo (silagem de capim). A capacidade proteolítica de cada isolado também foi analisada e foi observada essa característica em 16 estirpes. Apenas 1 estirpe de ambiente não-lácteo apresentou a capacidade de proteólise, esse resultado pode ser atribuído à necessidade adaptativa que cada ambiente exige do

micro-organismo. Esse resultado é importante do ponto de vista tecnológico, visto que, existe a necessidade de culturas com capacidade de proteólise para a melhoria de sabor e *flavor* em diversos tipos de queijos. Atividade antimicrobiana também foi avaliada para *Listeria monocytogenes* com resultado positivo de halos superiores a 21 mm para 9 estirpes. Não houve a formação de halos de 21 mm para *S. aureus*. O efeito antagonismo de BAL pode ocorrer devida à presença de substâncias antagonistas como a nisina, produzida durante o desenvolvimento do microorganismo. Para essa característica foi realizada a PCR que identificou 6 isolados que possuem o gene e que poderão em algum momento expressar essa característica de produção de nisina. Novas pesquisas são necessárias para verificar possíveis outras substâncias produzidas pelas estirpes que apresentaram efeito antagonista mas que não apresentam o genes para produção de nisina. A pesquisa com diferentes concentrações de NaCl mostrou que nenhuma das estirpes se desenvolve em concentrações iguais ou inferiores a 4% m.v⁻¹ de NaCl. Algumas das estirpes se destacaram quando a produção de ácido lático foi avaliada. Todos esses resultados indicam que as estirpes estudadas apresentam características tecnológicas importantes para a indústria de alimentos e que a aplicação dessas é viável para a produção de alimentos fermentados.

Keywords: Potencial tecnológico, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Introdução

Bactérias lácticas são muito difundidas na natureza, sendo capazes de colonizar e multiplicar-se em diferentes condições ambientais, o que inclui a microbiota do intestino de humanos e animais, bem como ambientes nutricionalmente ricos como leite, vegetais, carne, frutas e bebidas, uma vez que são considerados micro-organismos fastidiosos (DALIÉ *et al.*, 2010). Dentro do grupo das BAL, a espécie *Lactococcus lactis* se destaca pela sua importância tecnológica, a qual é extensivamente utilizada como cultura *starter* na produção de vários tipos de queijos pela indústria de laticínios, o que contribui para qualidade, segurança microbiológica e vida útil desse tipo de alimento (LEANDRO, 2013).

A busca por novas estirpes de *L. lactis* oriundas de ecossistemas não lácteos tem favorecido a seleção de microrganismos com capacidade de formar compostos diferenciados associados ao *flavor* e produção de antimicrobianos (LEANDRO, 2013). Segundo Nomura *et al.* (2006), estirpes de *L. lactis* isoladas de plantas produzem compostos associados ao aroma diferenciando-se das estirpes isoladas de leite, e além disso, demonstram ser mais resistentes a condições ambientais adversas. A utilização destas novas estirpes tem sido visto como uma alternativa para produção de queijos com sabores diferenciados dos já existentes, devido ao potencial de adaptação em leite e consequente contribuição para o desenvolvimento de novos fermentos (STEELE, BROADBENT & KOK, 2013).

A aplicação de culturas *starters* na fermentação de alimentos não só exige a compreensão do ecossistema que compreende o alimento, mas também a distinção de características tecnológicas e fisiológicas inerentes às estirpes predominantes no alimento. Na produção de queijos, a propriedade mais importante de culturas *starters* é a capacidade de rápida produção de ácido rapidamente (DAL BELLO *et al.*, 2012).

As estirpes comumente utilizadas na produção de queijos são isoladas de leite *in natura* ou a partir de queijos elaborados com leite *in natura* e os critérios para a seleção de cultura *starter* baseiam-se na capacidade de converter de forma rápida a lactose do leite em ácido láctico, causando rápido decréscimo no pH do leite, tolerância aos métodos de conservação da cultura (LEROY & DE VUYST, 2004; TEUBER & GEIS, 2006). Outras propriedades, como a tolerância ao sal, atividade proteolítica, atividade autolítica, produção de diacetil, resistência a antibióticos e fago-resistência são consideradas características tecnológicas comumente observadas para a seleção de estirpes potenciais para aplicações industriais. Além dessas propriedades, algumas estirpes de *Lactococcus* spp. possuem a capacidade de síntese de bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos), como a nisina. Estas bacteriocinas podem controlar a multiplicação de patógenos em alimentos, como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (DAL BELLO *et al.*, 2012).

Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi de avaliar o potencial tecnológico de estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* isoladas de ambientes lácteos e não lácteos.

Material e método

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Leite e Derivados (InovaLeite) do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária, ambos situados no Campus da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa/MG.

Origem dos isolados

Foram analisadas 23 estirpes de *L. lactis* subsp. *Lactis*, oriundas de ecossistemas lácteos e não lácteos, sendo queijos artesanais da região amazônica, queijo tipo manteiga, leite de diferentes espécies animais (vaca, búfala e cabra), leite de vaca tipo creme e silagem de capim e amendoim forrageiro pertencentes ao banco de culturas do InovaLeite/UFV. Os isolados estavam previamente caracterizados como Gram-positivos, catalase negativa, subespécie *lactis* e armazenados em glicerol 30% (v/v), a -80 °C até o momento das análises. Juntamente a estes isolados, analisou-se também as amostras de referência *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 e *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO 1428.

Lactofermentação

A partir das estirpes ativadas, alíquotas (1% v/v) foram transferidas para tubos contendo 10 mL de leite desnatado reconstituído (LDR, 10% v/v, Molico Nestlé, São Paulo, Brasil) e incubadas a 30 °C durante 24 a 48 h. A avaliação dos resultados ocorreu por meio da análise empírica, observando-se a formação de coágulo e classificando-o em: uniforme, uniforme com presença de soro na parte inferior, uniforme com predominância frágil (aparência), esfacelado com presença de soro na parte inferior e ausência de coágulo.

Produção de diacetil

Alíquotas (1 % v/v) das estirpes foram inoculadas em 10 mL de LDR (10 % m/v) e incubadas a 30 °C por 24 h. Logo após, a cada 1000 µL de cada suspensão adicionou-se de 500 µL de α -naftol (1 % m/v, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e 500 µL de solução de Hidróxido de Potássio (KOH, 16% m/v, Grupo Química Industrial, Rio de Janeiro, Brasil) e incubadas a 30 °C por 10 min. O procedimento foi

conduzido em triplicata e a produção de diacetil determinada pela formação de anel vermelho no topo dos tubos (Dal BELLO *et al.*, 2012).

Atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica, 100 µL das estirpes foram ativadas em 10 mL de caldo MRS (*de Man, Rogosa e Sharpe*) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, EUA) e incubadas a 30 °C durante 18 - 24 h. A partir deste pré-inóculo, as estirpes foram semeadas em forma de picada em placas de Petry contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA, HiMedia, Índia) com adição de 10 % de LDR (10% v/v). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 e 48 h. O experimento foi conduzido em triplicata e a atividade proteolítica indicada pela formação de uma zona clara ao redor das culturas (FRANCIOSI *et al.*, 2009).

Capacidade de acidificação

Para a avaliação da capacidade de acidificação, as estirpes foram submetidas a análise de pH e acidez titulável, sendo realizadas duas repetições.

Para a determinação do pH, 100 µL das estirpes foram reativados em 10 mL de caldo MRS e incubados a 30°C durante 18-24 h. Alíquotas (1% v/v) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de LDR estéril (10% v/v) a 30°C durante 24 h. Como amostra controle foi utilizado tubos de LDR estéril sem inóculo. O pH foi mensurado após 6, 12 e 24 h de incubação, utilizando pHmetro digital (Hanna Instruments, São Paulo, Brasil) (MORANDI; BRASCA; LODI, 2011).

A partir dos mesmos tubos da determinação de pH e respectivos intervalos de tempo, determinou-se a atividade de acidificação. Foram transferidos 10 mL de cada amostra para um béquer de 50 mL com adição de 4-5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1%. Posteriormente, fez-se a titulação com solução de hidróxido de

sódio 0,1 N (NaOH) até obter a primeira coloração rosa persistente por aproximadamente 30 seg. O resultado da acidez foi calculado a partir da fórmula de acidez para solução normal em % (m/p), tendo:

Equação 1

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$$

Sendo “V” o volume da solução de NaOH 0,1 N gasto na titulação, “f” o fator de correção da solução de NaOH 0,1 N e “m” a massa da amostra, em gramas, usada para a titulação.

Resistência a diferentes concentrações de NaCl

Para avaliar a resistência das estirpes a diferentes concentrações de NaCl, estas foram ativadas em caldo MRS durante 16-18 h e incubadas a 30 °C. Alíquotas de 188 µL de caldo MRS com concentrações diferentes de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 e 10%; Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) e 2 µL das estirpes foram distribuídas em microplacas de microtitulação de 96 poços com fundo chato (Kasvi). Como controle negativo, 188 µL de caldo MRS das diferentes concentrações de NaCl foram incubadas sem acréscimo das estirpes. Em seguida, a microplaca foi submetida à incubação em equipamento Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 30 °C sob agitação por 24 h, com leitura de O.D. em comprimento de onda de 600 nm a cada 30 min. O potencial de multiplicação das culturas nas diferentes concentrações de NaCl, conduzidas em duplicata, será avaliado pela diferença das OD registradas nas leituras e as médias das OD finais obtidas a fim de avaliar a taxa de crescimento (DAL BELLO et al., 2012).

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com o teste da gota (*spot-on-the-lawn*) conforme proposto por Lewus & Montville (1991), com modificações. Para o experimento, testou-se a atividade antimicrobiana das estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* frente aos patógenos de *L. monocytogenes* e *S. aureus* (ATCC 25923) que foram reativados em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi) e incubados a 35 ± 2 °C por 18 h.

As estirpes foram ativadas (1 % v/v) em caldo MRS e incubadas a 30 °C por 18 h. Após o cultivo, 10 µL de cada estirpe foram depositadas em duplicata em orifícios de 5 mm de altura (“*spot*”) em placas de Petri contendo ágar MRS. Após absorção completa pelo meio, as placas foram incubadas em anaerobiose a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as placas foram recobertas com uma sobrecamada de 8 mL de ágar BHI semissólido (0,8 % de ágar-ágar, Kasvi) contendo 0,8 mL do patógeno. As placas foram incubadas em anaerobiose a 35 ± 2 °C durante 24 h e verificou-se a presença de halos de inibição formados pelo crescimento das bactérias patogênicas ao redor do “*spot*” e concomitante mensuração dos mesmos.

Identificação do gene de nisina

Todos as estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* foram avaliadas quanto a presença de gene que codifica para a nisina (LI & O’SULLIVAN, 2002; PERIN *et al.*, 2012). O procedimento experimental ocorreu com o uso de *primers* específicos para *nisA* (seq.) 5’ GGATAGTATCCATGTCTG 3’ e 5’ CAATGATTTTCGTTCTGAAG 3’ com fragmento de interesse de 300 pb. Como controle positivo foi utilizada a cepa *L. lactis* subsp. *lactis* DY13 lyofast DY 13 (Clerici-Sacco Group, Cadorago, Itália).

A Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) ocorreu em tubos Eppendorf de 0,2 mL, sendo padronizadas com volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de solução master mix 2X (GoTaq® Green Master Mix, Promega), 1,5 µL de cada primer (20 pmol), 1 µL de DNA da amostra e Nuclease-Free Water (Promega) para completar o volume da reação. A reação ocorreu em termociclador (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad, Califórnia, EUA), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 95 °C por 2 min para abertura inicial da fita, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 4 min. Ao final da reação, manteve-se o termociclador a 4 °C a fim de conservar o produto de reação até a aplicação no gel de agarose.

A cada 5 µL do produto da reação de PCR, adicionou-se 4 µL de solução corante (1 X, Diamond™, Promega) e, posteriormente, aplicou-se a solução nos poços de gel de agarose 2 % (m/v) submerso em solução tampão TBE 0,5 X. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Midi, Uniscience) por 60 min a 100 V e utilizou-se o marcador molecular de 100 pb (DNA Ladder, Promega).

Após a eletroforese, o gel foi examinado em transluminador UV (L-PIX, Loccus Biotecnologia, Brasil) com sistema computacional integrado para o registro da imagem e a presença do gene *nisA* realizou-se pela presença de bandas no tamanho aproximado de 300 pb.

Resultado e discussão

Na Tabela 1 encontram-se expressos os resultados obtidos para a avaliação do tipo de coágulo, capacidade de produção de diacetil e atividade proteolítica. A avaliação do tipo de coágulo, evidenciou 8 estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* não apresentaram capacidade de coagulação, o que pode ter ocorrido devido ao baixo número de células e 3 apresentam coagulação homogênea e uniforme porém frágil,

6 apresentaram coagulação uniforme e 5 com coagulação uniforme e soro na parte inferior do tubo.

A coagulação do leite compreende o primeiro estágio na fabricação de queijos pela desestabilização das micelas de caseína, reunindo-as e formando uma rede que constitui a coalhada do queijo. Esta etapa pode ocorrer pela ação de enzimas coagulantes (renina, quimosina) e/ou culturas lácticas específicas que são adicionadas ao leite, resultando na liberação de ácido láctico como seu produto metabólico, reduzindo o pH e, conseqüentemente, inibindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e elevando a atividade coagulante pela expulsão do soro (FOX *et al.*, 2000; LUCEY, JOHNSON, HORNE, 2003).

A produção de diacetil foi observada em 7 estirpes, sendo 2 provenientes de leite de cabra, 1 de leite de búfala, 3 de queijos artesanais da região amazônica e 1 de silagem de capim. Estirpes isoladas de leite de vaca, leite de vaca tipo creme, queijo tipo manteiga e silagem de amendoim forrageiro não demonstraram produção deste composto. As cepas de referência também apresentaram resultados positivos.

Culturas lácticas como o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e o *Lactococcus mesenteroides* subsp. *cremoris* são capazes de metabolizar o excesso de piruvato através do α -acetolactato, produzindo acetoína. Entretanto, na presença de oxigênio, o α -acetolactato é convertido em diacetil, um composto responsável pelo aroma característico da manteiga e de alguns iogurtes (FORSYTHE, 2002).

Resultados positivos para a produção de diacetil em estirpes de *L. lactis* também foram evidenciados na literatura (Dal Bello *et al.*, 2012). Este composto tem um poder de inibição no crescimento de bactérias Gram-negativas por reagir com a proteína de ligação da arginina, afetando a sua utilização. Adicionalmente, tem sido associado às propriedades antifúngicas e antibacterianas nos diversos processos fermentativos (CÂMARA, 2012; AUNSBJERG *et al.*, 2015).

Tabela 1. Atividade fermentativa, produção de diacetil e atividade proteolítica produzida por *L. lactis* subsp. *lactis*

Estirpe	Avaliação do tipo de coágulo	Produção de Diacetil	Atividade Proteolítica	
			24 h	48 h
Leite de vaca				
84	Sem coagulação	-	+	+
51	Sem coagulação	-	+	+
24	Coagulação uniforme e frágil	-	+	+
Leite de cabra				
90	Sem coagulação	+	+	+
34	Sem coagulação	-	+	+
46	Coagulação uniforme	-	-	-
80	Coagulação uniforme	+	+	+
Leite de búfala				
61	Coagulação uniforme e frágil	+	-	-
Leite de vaca tipo creme				
10	Coagulação uniforme	-	+	+
Queijo região amazônica				
76	Sem coagulação	+	+	+
78	Coalhada esfacelada e soro em baixo	-	+	+
27	Coagulação uniforme e soro em baixo	-	+	+
52	Sem coagulação	-	+	+
29	Sem coagulação	+	+	+
2	Coagulação uniforme e soro em baixo	-	+	+

31	Coagulação uniforme e soro em baixo	+	-	+
32	Coagulação uniforme	-	-	-
Queijo tipo manteiga				
12	Coagulação uniforme	-	+	+
50	Coagulação uniforme e soro em baixo	-	+	+
Silagem amendoim forrageiro				
30	Coagulação uniforme e frágil	-	-	-
Silagem capim				
25	Coagulação uniforme	-	-	-
71	Coagulação uniforme	+	-	-
23	Sem coagulação	-	+	+
Cepas referência				
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	ND*	+	+	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 1428	ND	+	+	+
Controle				
Controle negativo	Sem coagulação	-	-	-

*ND: não determinado.

16 estirpes das 23 estudadas apresentaram atividade proteolítica, apenas uma de ambientes não-lácteos. A proteólise é um pré-requisito para o crescimento das BAL e consequente degradação das proteínas do leite, efeito de grande importância para a produção de queijos e para o desenvolvimento de aroma e sabor dos mesmos. Com base nestes resultados, estirpes com atividade proteolítica podem ser empregadas como culturas adjuntas em diferentes tipos de queijos, contribuindo para o aumento da quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres, principais precursores dos compostos específicos responsáveis pelo aroma e sabor dos alimentos.

Os resultados encontrados para a atividade antimicrobiana e detecção para o gene de nisina estão expressos na Tabela 2. Também estão ilustrados na Figura 2 algumas placas dos halos de inibição verificados frente aos patógenos de interesse.

De acordo com os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana, pode-se ressaltar que todas as estirpes testadas apresentaram atividade inibitória (antimicrobiana) contra os dois agentes patogênicos testados. Estes patógenos que são transmitidos pelos alimentos foram selecionados pelo fato de que estudos demonstraram sua susceptibilidade às substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias do ácido lático, sendo este geralmente adotado como indicador dessa atividade (ANDRADE *et al.*, 2014; PERIN & NERO, 2014).

As médias dos halos de inibição frente cada estirpe foram mais expressivas sobre *L. monocytogenes*. Todas as estirpes isoladas de leite de vaca, leite de cabra e queijo tipo manteiga apresentaram diâmetro médio dos halos superiores a 21 mm. Halos superiores a 21 mm não foram verificados frente a *S. aureus*. A inibição de bactérias patogênicas por bactérias lácticas é uma característica positiva porque está associada ao aumento da segurança do alimento.

As variações no diâmetro dos halos podem ser justificadas pela diversidade e variedade de substâncias antimicrobianas que podem ser produzidas, agindo por exclusão competitiva e síntese de substâncias antagonistas, como ácidos orgânicos (ácido lático), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas (NAIDU *et al.*, 1999).

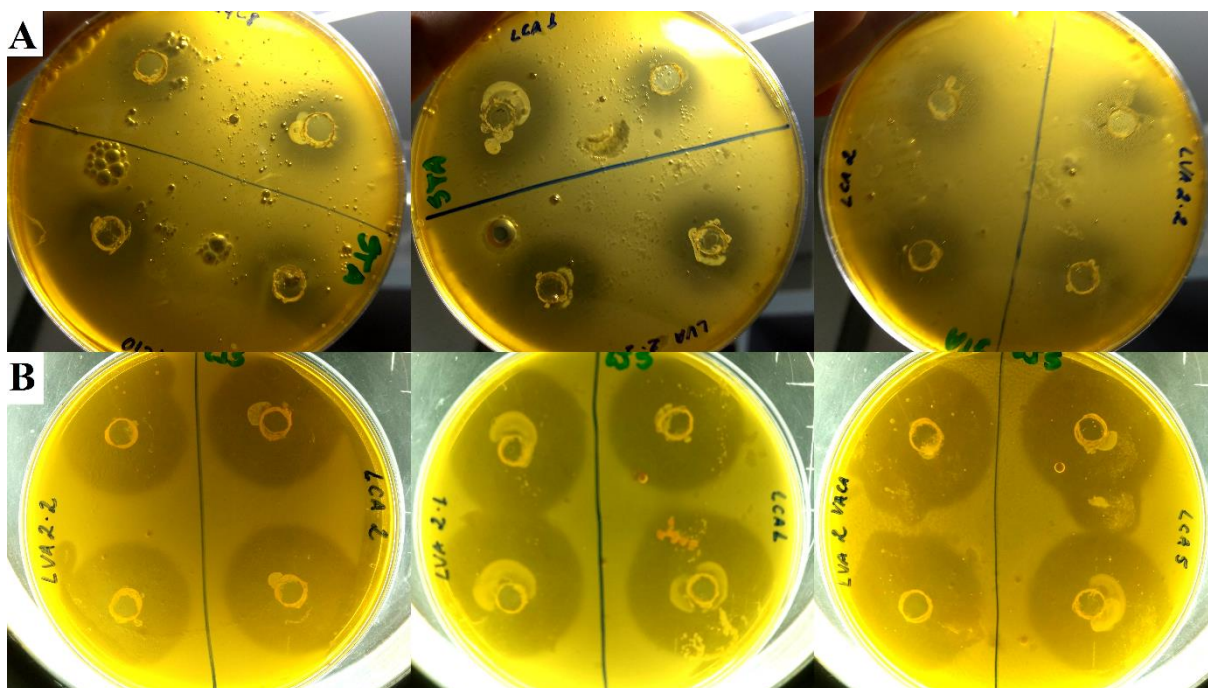
Tabela 2. Resultados obtidos na atividade antimicrobiana e identificação do gene de nisina.

Estirpe	Atividade Antimicrobiana*		Detecção para o gene de nisina**
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	
Leite de vaca			
84	+++	++	Negativo
51	+++	+	Negativo
24	+++	+	Positivo
Leite de cabra			
90	+++	+	Positivo
34	+++	++	Negativo
46	+++	+	Positivo
80	+++	+	Positivo
Leite de búfala			
61	++	+	Negativo
Leite de vaca tipo creme			
10	++	++	Negativo
Queijo região amazônica			
76	+++	++	Negativo
78	+++	++	Negativo
27	+	++	Negativo
52	+	++	Negativo
29	+	+	Negativo
2	+	+	Negativo
31	++	++	Positivo
32	++	++	Negativo
Queijo tipo manteiga			
12	+++	++	Negativo
50	+++	++	
Silagem amendoim forrageiro			
30	++	++	Negativo
Silagem capim			
25	++	++	
71	++	++	
23	+++	++	Positivo
Cepas referência			
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962	+	+	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 1428	+	+	
Controle			
Controle negativo	-	-	Negativo

*Resultados expressos de acordo com as médias dos diâmetros dos halos (mm), sendo (+) 1 a 10, (++) 11 a 20, (+++) 21 a 31.

**Resultados expressos de acordo com a presença de bandas no tamanho de 300 pb.

Os resultados demonstram um possível potencial de utilização destas estirpes na aplicação em alimentos como culturas lácticas, visando-se melhor qualidade sanitária do produto e, conseqüentemente, importantes para uso futuro como culturas bioprotetoras.



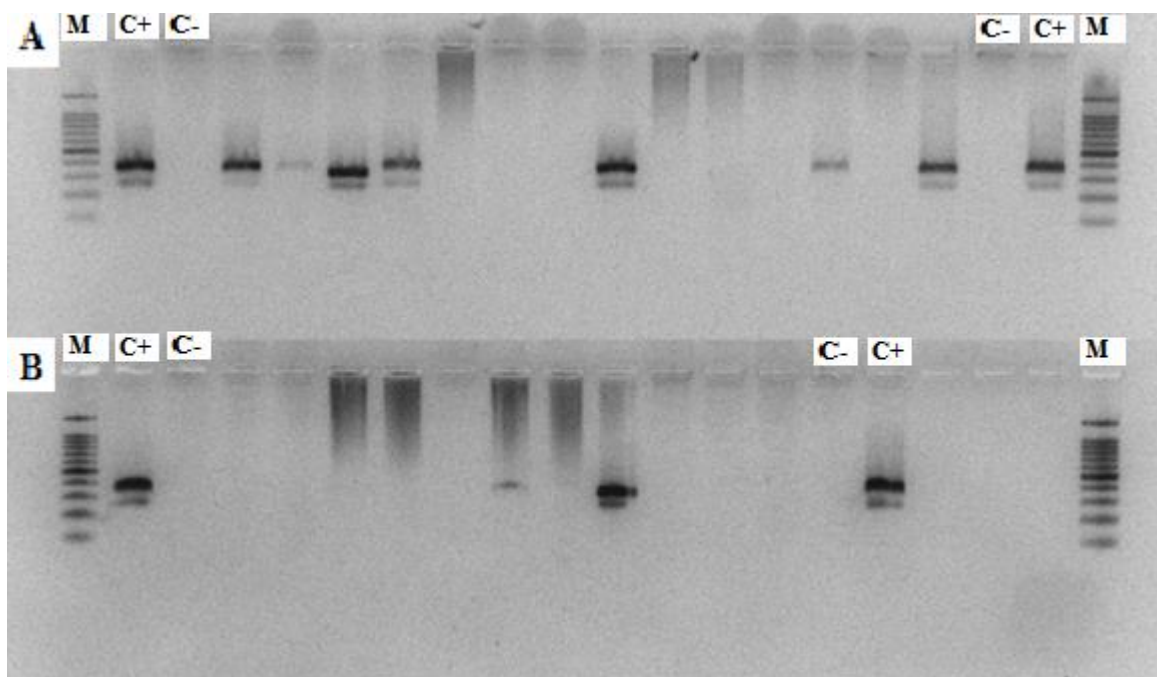
(A) Halos frente a *S. aureus*. (B) Halos frente *L. monocytogenes*.

Figura 1. Halos de inibição frente aos patógenos

Com base nos resultados para a detecção do gene da nisina (Tabela 3) das estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis*, seis apresentaram resultados positivos, conforme o padrão de bandas de 300 pb ilustrado na Figura 2. Destas, 1 oriunda de ambiente não lácteo e 5 que haviam apresentado halos superiores a 21 mm frente *L. monocytogenes*. Ainda em correlação aos resultados a atividade antimicrobiana, pode-se salientar que as demais estirpes provavelmente possuam outras substâncias antimicrobianas responsáveis pela

atividade inibitória. Em estudo realizado por Perin & Nero (2014), 9 isolados de *Lactococcus* spp. apresentaram resultados positivos para nisina, evidenciando o potencial bacteriocinogênico deste gênero.

A nisina é uma bacteriocina de classe I (lantibióticos) oriunda de uma cepa de *L. lactis*, descoberta inicialmente por Rogers & Whittier (1928). O operon da nisina, além de sua sequência codificadora (*nisA*), possui genes que participam dos processos enzimáticos (modificações pós-traducionais e clivagem do peptídeo líder) de maturação do pré-peptídeo (*nisB*, *nisC*, *nisP*), transporte (*nisT*), regulação (*nisR* e *nisK*) e genes de imunidade (*nisI*, *nisF*, *nisE*, *nisG*) (PATTON & VAN DER DONK, 2005).



(A) e (B) – Canaletas M correspondem ao marcador molecular DNA Ladder 100 pb. Canaletas C+ correspondem ao controle positivo. Canaletas C- correspondem ao branco. Demais canaletas correspondem as estirpes, sendo que em (B) as canaletas finais entre C+ e M estão vazias.

Figura 2. Identificação do gene da nisina

Contudo, apesar de estirpes (n=6) terem expressado o gene para *nisA*, mais estudos são necessários para verificar a presença de outros genes e se

há a expressão destes. O operon para nisina possui uma variedade de genes, sendo que cada um destes exerce uma função específica. Para a nisina de fato ser expressa, ela precisa de todos os genes constituídos, como de imunidade e regulação. Além disso, se analisou apenas uma fração do gene. Logo, para os resultados positivos pode-se salientar uma possibilidade de expressão.

As cepas em estudo também foram avaliadas quanto a sua capacidade de acidificação avaliando a capacidade de produzir ácido láctico e deslocamento de pH durante seu desenvolvimento. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3. Todas as estirpes conseguiram reduzir o pH e aumentar a acidez nos tempos estudados, porém algumas delas se destacaram após 24h obtendo uma alta acidez e baixo pH. Esses resultados positivos para capacidade de acidificação vieram de estirpes isoladas do leite como a LVA2VACA, LCA4 isolada de leite de cabra, Q1C4 e Q1C5 isolados de queijo da região amazônica e Q15C3 isolada do queijo tipo manteiga, indicando que possivelmente essas estirpes de fontes lácteas são mais adaptadas e por isso conseguem uma melhor acidificação do meio.

Os resultados de tolerância ao NaCl indicaram que houve as cepas só foram capazes de crescer em concentrações de NaCl menores ou iguais a 4% m/v⁻¹.

Tabela 3. Capacidade de acidificação das estirpes por meio de mensuração do pH e acidez.

Estirpe	pH			Acidez		
	T6	T12	T24	T6	T12	T24
Leite de vaca						
84	6,40	6,03	6,01	0,181	0,200	0,214
51	6,19	5,96	5,78	0,193	0,232	0,265
24	5,98	5,53	4,96	0,243	0,268	0,461
Leite de cabra						

90	6,26	6,06	5,17	0,193	0,222	0,447
34	6,37	5,80	5,66	0,177	0,264	0,284
46	5,94	5,50	4,67	0,225	0,317	0,583
80	5,99	5,64	5,38	0,215	0,300	0,377
Leite de búfala						
61	6,29	6,11	6,03	0,186	0,199	0,221
Leite de vaca tipo creme						
10	6,10	5,82	5,57	0,200	0,248	0,294
Queijo região amazônica						
76	6,23	6,20	5,82	0,170	0,183	0,256
78	5,93	5,12	4,85	0,227	0,372	0,490
27	5,88	5,45	4,54	0,215	0,319	0,622
52	6,28	6,17	6,13	0,170	0,185	0,194
29	6,25	6,07	5,79	0,175	0,215	0,262
2	5,91	5,37	4,66	0,229	0,325	0,548
31	6,23	5,87	5,45	0,184	0,222	0,344
32	6,12	5,44	4,90	0,211	0,336	0,468
Queijo tipo maneiga						
12	6,38	6,25	6,07	0,179	0,180	0,199
50	6,13	5,61	4,91	0,193	0,295	0,440
Silagem amendoim forrageiro						
30	6,33	6,22	5,91	0,181	0,192	0,231
Silagem capim						
25	6,38	6,22	5,81	0,172	0,180	0,266
71	6,18	5,81	5,11	0,202	0,258	0,433
23	6,33	6,12	6,04	0,172	0,185	0,214
Controle						
Meio Puro (LDR)	6,58	6,52	6,51	0,152	0,152	0,152

*ND – não determinado.

Conclusão

A caracterização tecnológica de estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* de origem láctea e não láctea demonstrou um potencial favorável para ambas, viabilizando sua utilização na indústria como cultura *starter*. Contudo, a aplicação tecnológica destas depende da função que o microrganismo exercerá no produto, bem como do próprio produto ao qual ele será adicionado.

Referências

- ANDRADE, C.R.G.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; ACURCIO, L.B.; SANT'ANNA, F.M.; CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, D.L.S. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592-1600, 2014.
- AUNSBJERG, S. D.; HONORÉ, A. H.; MARCUSSEN, J.; EBRAHIMI, P.; VOGENSEN, F.K.; BENFELDT, C.; SKOV, T.; KNØCHEL, S. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 194, n. 46-53, 2015.
- CÂMARA, S. P. A. **Estudo do potencial bioactivo e tecnológicos de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo do pico artesanal**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2012.
- DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P.D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 58-65, 2012.
- DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 370-380, abr. 2010.
- FORSYTHE, J. A flora microbiana dos alimentos. In: FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. cap. 4, p. 109-151.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 3-11, 2009.
- FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; Mc SWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000. 578 p.
- LAZZI, C.; POVOLO, M.; LOCCI, F.; BERNINI, V.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 20-28, 2016.
- LEANDRO, E. S. **Diversidade e resistência ao processo de liofilização de estirpes de *Lactococcus Lactis* de ecossistemas distintos**. 2013. 72 f. Tese

- (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.
- LEWUS, B. C.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991.
- LI, H.; O’SULLIVAN, D. J. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3392-3400., 2002.
- LUCEY, J.A.; JOHNSON, M.E.; HORNE, D.S. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 9, p. 2725-2743, 2003.
- MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R. Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 341–359, 2011.
- NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.**, v. 38, p. 13-126, 1999.
- NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J. M.; SESEÑA, S.; PALOP, L. L.; CABEZAS, L. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092-1098, 2009.
- NOMURA, M. KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 396-405, 2006.
- PATTON, G. C.; VAN DER DONK, W. A. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 5, p. 543-51, 2005.
- PERIN, L.M.; MORAES, P.M.; NOGUEIRA, G.; SILVA JÚNIOR, A.; NERO, L.A. Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. **International Dairy Journal**, v. 25, p. 46-51, 2012.
- PERIN, L.M.; NERO, L.A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 26, p. 1-9, 2014.
- STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 135-41, abr. 2013.

TEUBER, M.; GEIS, A. The Genus *Lactococcus*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3. ed. New York: Springer US, 2006. cap. 1.2.7, v. 4, p. 205-228.

5. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, a diversidade microbiana de queijos artesanais da região Amazônica foi realizada por métodos cultura dependente e métodos cultura independente.

O método-dependente de cultura demonstrou a presença de BAL em ambas as estações estudadas e foram isolados gêneros como *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* que são comumente relatados em queijos e outros produtos lácteos. O método cultura-dependente demonstrou a presença de outros tipos de microorganismos que não são comumente relatados em alimentos lácteos, mas que estavam presentes nos queijos. A análise de diversidade microbiana indicou agrupamento entre os queijos coletados na mesma estação, sendo assim, concluiu-se que dentro de uma mesma estação do ano a diversidade microbiana é menos do que quando comparada a outras estações.

As estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolados dos queijos artesanais da Região Amazônica juntamente com outras estirpes isoladas de ecossistemas lácteos e não lácteos foram estudadas para verificação da diversidade genética entre elas e sua possível utilização na indústria de alimentos. As análises indicaram uma grande diversidade genética entre os isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, essa diversidade é muito importante sobre o ponto de vista de utilização dessas culturas na indústria de alimentos. Para isso, o potencial tecnológico de cada cultura foi avaliado e as culturas demonstraram um ótimo desempenho para as características básicas para fermentação de alimentos e até mesmo inibição de patógenos.