

**TATIANE FERREIRA ARAÚJO**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE  
*Enterococcus* spp. ISOLADOS DO FERMENTO  
ENDÓGENO UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO  
MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DA CANASTRA,  
MINAS GERAIS.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**TATIANE FERREIRA ARAÚJO**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE  
*Enterococcus* spp. ISOLADOS DO FERMENTO  
ENDÓGENO UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO  
MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DA CANASTRA,  
MINAS GERAIS.**

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

APROVADA: 29 de julho de 2008.

---

Prof. Edna Froeder Arcuri  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Mauro Mansur Furtado  
(Co-Orientador)

---

Prof. Regina Célia Santos Mendonça

---

Prof. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

---

Prof. Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira  
(Orientadora)

*“O essencial é invisível aos olhos...”*

*Aos meus pais Romilda e Ildeu por todo apoio incondicional  
em todos os momentos de minha vida.  
Ao meu irmão Bruno pelo incentivo.  
Vocês são meus tesouros!*

*A minha segunda família, Tia Sônia, Tio Carlos, Thierre, Brainer  
e minha irmã de coração Nayane que sempre vibraram  
com cada uma de minhas conquistas.  
Obrigada por sempre acreditarem em mim!*

*As minhas amigas, Jordânia e Leticia  
por toda ajuda a mim dispensada ao longo destes anos,  
me apoiando nos momentos mais difíceis.  
Amo vocês!*

*Aos meus sogros por todo carinho e torcida.  
A minha cunhada Luciana por sempre ter sido minha amiga e incentivadora  
em vários momentos de minha vida. Muito obrigada!*

*Ao meu noivo Leonardo, por tudo que passamos juntos  
e apesar de todos os contratemplos que vivemos,  
sei que torce por mim!*

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por ter iluminado todo o meu caminho até chegar aqui, dando-me força para continuar nos momentos mais difíceis quando pensei em desistir, e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais complicados desta jornada. Se obtive êxito é porque ELE desejou isso para mim.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de estar realizando todos os meus experimentos.

À minha orientadora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira por ter acreditado em meu potencial como pesquisadora aceitando-me como sua orientada. Pela paciência e compreensão, além do todo conhecimento que pude absorver ao longo destes meses.

À professora Edna Froeder Arcuri por todo auxílio e dedicação durante a realização do meu experimento na EMBRAPA e nas correções durante a escrita da dissertação.

Ao professor Mauro Mansur Furtado pelas sugestões feitas à minha dissertação.

Às professoras Regina Célia Santos Mendonça e Cláudia Pinto por todas as intervenções e sugestões em minha defesa. Tenham certeza de que cresci com todos questionamentos e correções que foram sugeridas.

Ao responsável pela coleção de culturas do Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde da FIOCRUZ, Ivano de Filipips, pela atenção e doação das estirpes padrão utilizadas nesta experimentação.

À equipe do laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa: Selda Loase Monalisa Azevedo, Alessandra, Marcos Aurélio Silva e em especial, Wanessa Martins e Laura Andrade, pois mesmo eu não estando presente, me auxiliaram em meus experimentos. Não poderia deixar de agradecer com todo carinho a uma pessoa que foi meu “braço direito” em Juiz de Fora: Patrícia Porto; não tenho palavras para agradecer sua dedicação com meus “*Enterococcus*”. Saiba que você tem uma boa parcela neste trabalho. Agradeço-lhes por toda ajuda e acolhida de vocês durante o tempo que estive realizando meus experimentos. A Izabela Vieira (Laboratório de Genética Molecular, Embrapa) pela companhia e ajuda nas quantificações de DNA. São amigas que levarei junto comigo por toda a vida.

À minha grande amiga Fabíola Ângelo e seus pais Heloísa e Ronaldo, pela amizade e companheirismo durante todo o mestrado, além de terem me acolhido em um momento crucial do meu curso. Vocês são maravilhosos! Agradeço-lhes por tudo!

À minha grande amiga Viviane Guzzo por sempre ter me apoiado em todos os momentos nos quais precisei.

Aos meus ajudantes “passageiros”, Darlan e Júlio César Taveira. Toda a ajuda de vocês foi fundamental!

À Talyta Almeida e Éder Galinari por sempre estarem presente nos momentos que precisei, me auxiliando da melhor maneira possível, sempre!

À Luciana Rodrigues por toda paciência ao me ajudar nas minhas inúmeras dúvidas e em meus problemas.

À Milene das Dores (Mi) que sempre esteve do meu lado, me apoiando e empurrando pra frente. Te adoro!

Ao João Paulo Victorino, pela amizade e companheirismo. Saiba que sempre poderá contar comigo, esteja onde estiver.

Aos grandes amigos do Laboratório de Culturas Láticas: Juliana Nóbrega, Flávia Alves, Karina Chaves, Aline Silva, Fabiana Carvalho, Edimara Ferreira, Elisângela Domingo, Henrique Campos, Ivaneide Côrrea, pela amizade e apoio. De uma forma ou de outra, cada um de vocês tem um pedacinho deste trabalho. Agradeço-lhes de coração!

Ao Célio de Souza, por sempre estar à disposição quando necessitei, além de colocar uma “musiquinha” para alegrar o meu longo dia de trabalho!

À Geralda, Vânia, Eliana, ao Sr. Juarez e ao Sr. Manoel, por sempre me auxiliarem quando solicitados.

Às minhas “irmãzinhas” de coração, Cristina (te adoro florzinha!) Nara (valeu por toda ajuda e paciência!) e Natália pela compreensão e paciência ao me agüentar em ocasiões de estresse e por compartilhar de vários momentos bons durante estes dois anos.

À minha eterna diretora Rita de Cássia, por ter me recebido de uma forma acolhedora, em um momento de profundas mudanças em minha vida.

À minha atual diretora Maria Amélia Fialho, por ter compreendido minhas necessidades, tornando sempre que possível, a continuação dos meus estudos.

Aos meus colegas de trabalho, em especial Maria de Lourdes, Cristiane Trevenzoli, André Mendes, Marco Aurélio, Daniel, Robson da Silveira, Alex Timoteo, Graça Mayrink, Fernando, Gorete, por sempre estarem ao meu lado, me incentivando, fazendo com que minhas dificuldades fossem transformadas em obstáculos a serem ultrapassados. Com isso, cresci a cada dia mais e mais! A vocês, dedico com todo carinho esta vitória!

Ao meu grande amigo Fábio Generoso, pela amizade incondicional, que surgiu do “nada” e que hoje é muito importante pra mim. Agradeço-lhe pelas aulas de estatísticas e de vida. Amigo, se cheguei até aqui, sabe que grande parte devo a você.

Ao meu amigo Flávio Barony, por ter me permitido compartilhar todos os meus problemas e contar sempre com sua ajuda, estando disponível a me ajudar no que fosse necessário. Saiba que poderá contar comigo sempre!

E, finalmente, a todos os meus alunos, em especial à turma 31 do ano de 2008, a quem dedico com todo carinho essa dissertação. Todos vocês são o meu motivo e orgulho de ser professora. Sem vocês, não teria o porquê em estar buscando novos conhecimentos, com a finalidade de me aprimorar, tornando-me uma professora cada vez melhor. Não tenho alunos... tenho amigos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	03
2.1 Queijos artesanais da Canastra .....	03
2.1.1 Tecnologia de fabricação do queijo Canastra .....	05
2.2 Cocos Gram positivos catalase negativos .....	06
2.3 Papel da microbiota láctica em queijos artesanais .....	07
2.4 Microbiota de queijos artesanais .....	08
2.5 Gênero <i>Enterococcus</i> .....	09
2.5.1 Classificação e identificação .....	10
2.5.2 Propriedades bioquímicas dos <i>Enterococcus</i> .....	14
2.5.2.1 Atividade acidificante .....	14
2.5.2.2 Atividade proteolítica .....	15
2.5.2.3 Metabolismo do citrato .....	16
2.5.2.4 Bacteriocinas .....	16
2.6 <i>Enterococcus</i> como probiótico .....	18
2.7 <i>Enterococcus</i> em queijos .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 Geral .....	22
3.2 Específicos .....	22
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	23
4.1 Origem dos isolados .....	23
4.2 Manutenção e ativação dos isolados obtidos do fermento endógeno ...	24

4.3	Teste da catalase e morfotintorial dos isolados .....	24
4.4	Testes bioquímicos .....	24
4.4.1	Hidrólise da arginina .....	24
4.4.2	Crescimento a 4 e 6,5% de NaCl .....	25
4.4.3	Crescimento à 10 e 45 °C .....	25
4.4.4	Crescimento em pH 9,6 .....	26
4.4.5	Teste de Bile esculina .....	26
4.5	Atividade acidificante .....	26
4.6	Caracterização fenotípica utilizando o kit API 20 STREP® .....	27
4.7	Reação em Cadeia da Polimerase .....	27
4.7.1	Extração de DNA .....	28
4.7.1.1	Quantificação do DNA .....	28
4.7.2	Reação da PCR .....	28
4.7.3	Separação e visualização dos produtos amplificados .....	29
<b>5.</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>30</b>
5.1	Caracterização fenotípica .....	30
5.1.1	Seleção dos isolados .....	37
5.2	Capacidade acidificante .....	38
5.3	Caracterização fenotípica pelo kit API 20 STREP® .....	40
5.4	Caracterização genotípica pela PCR .....	46
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>

## RESUMO

ARAÚJO, Tatiane Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-orientadores: Edna Froeder Arcuri e Mauro Mansur Furtado.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar cocos Gram positivos catalase negativos isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra. Este queijo é produzido na região da Canastra, Minas Gerais, utilizando-se leite cru de vaca e adição de culturas endógenas conhecida como “pingo”. Esta microbiota é muito diversificada, o que possibilita a identificação de vários grupos microbianos em sua composição e garante um produto com propriedades sensoriais próprias. Entre 106 isolados obtidos do ágar Kenner Fecal (KF) de queijos produzidos em oito unidades produtoras de queijo da cidade de Medeiros, Minas Gerais, 79 foram classificados presuntivamente como pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. Essa classificação deve-se aos resultados apresentados nos testes bioquímicos clássicos como hidrólise da arginina, crescimento a 4 e 6,5 % de NaCl, 10 e 45 °C, pH 9,6 e Bile esculina, além da avaliação por coloração de Gram e catalase. Os resultados indicaram quinze diferentes perfis fenotípicos, nos quais os microrganismos isolados agruparam-se. Somente quatro isolados foram identificados como *Enterococcus* típicos por terem apresentado resultados positivos para todos os testes e considerando a semelhança com as espécies tipo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Quarenta e dois isolados apresentaram 85,71 % de semelhança com espécies tipo. Após o agrupamento, foram selecionados quarenta e cinco microrganismos e submetidos à caracterização com auxílio do kit API 20 STREP®. Os resultados obtidos com a utilização do kit não identificaram de forma satisfatória, classificando os isolados como *Aerococcus viridans 1*, *Aerococcus viridans 2*, *Aerococcus viridans 3* e *Enterococcus avium*. Porém, em geral, a classificação foi dada como “fraca discriminação”. Estes isolados foram submetidos à identificação molecular pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Desta forma, nove isolados foram classificados como *Enterococcus* spp. e dois classificados como *Enterococcus faecium*. Estes resultados divergem daqueles observados pela metodologia clássica e kit API 20 STREP®. Este trabalho é continuidade de uma extensa pesquisa de identificação e caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra. A identificação correta dos organismos presentes nesta microbiota possibilita, posteriormente, relacionar o papel destes microrganismos no desenvolvimento das características sensoriais e qualidade do queijo Minas artesanal.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Tatiane Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa (Federal University of Viçosa), July 2008. **Characterization and identification *Enterococcus* spp. isolated from endogenous yeast employed in the manufacture of the artisan Minas cheese in the Canastra region, Minas Gerais - BRAZIL.** Orienter: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-orienters: Edna Froeder Arcuri and Mauro Mansur Furtado.

This work aimed to characterize and to identify Gram positive cocos, negative catalase, isolated from endogenous yeast employed in the manufacture of the Canastra cheese. This cheese is produced in the Canastra region, Minas Gerais, with raw bovine milk and with the addition of endogenous cultures known as “pingo” (drop). This microbiota is rather diversified, what makes it possible the identification of a number of microbial groups in their composition, and guarantees a product with unique sensorial properties. Among the 106 isolates obtained from the Kenner Fecal (KF) agar of cheeses manufactured in eight cheese producing units from Medeiros city, Minas Gerais, 79 were classified as presumptively pertaining to the *Enterococcus* spp. genus due to the results of the traditional biochemical tests as hydrolysis of arginine, growth at 4 and 6.5% NaCl, 10 and 45 °C, pH 9.6 and aesculin Bile, as well as the evaluation for Gram coloration and catalase. The results indicated fifteen different phenotypical profiles, in which the isolates were grouped. Only four isolates were identified as typical *Enterococcus* for having presented positive results for all the tests. Forty two isolates presented 85.71% similarity with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species groups. After that, forty five were selected, isolated, and submitted to the characterization with aid of the API 20 STREP® kit. The results obtained with the use of the kit did not identify them in a satisfactory way, classifying the isolates as *Aerococcus viridans 1*, *Aerococcus viridans 2*, *Aerococcus viridans 3* and *Enterococcus avium*. However, in general, the classification was given as “weak discrimination”. These isolates were submitted to the molecular identification through the Polymerase chain reaction (PCR) technique. In this way, nine isolates were classified as *Enterococcus* spp. And two classified as *Enterococcus faecium*. These results diverge of those ones mentioned by the classic methodology and API 20 STREP® kit. This work is a continuity of an extensive research of identification and characterization of the endogenous yeast employed in the manufacture of the Canastra cheese. The correct identification of the organisms present in this microbiota make it possible, later, to relate the role of these microorganisms in the development of the sensorial characteristics and quality of the artisan Minas cheese.

## 1. INTRODUÇÃO

A fabricação artesanal de queijos, a partir de leite cru, ocupa um importante papel econômico, social e cultural no estado de Minas Gerais. Há mais de 200 anos, o queijo Minas artesanal é fabricado de maneira rústica em pequenas propriedades rurais, e esta atividade é responsável pela sustentabilidade de cerca de 30 mil famílias de pequenos produtores, produzindo cerca de 44 mil toneladas/ano. Para o seu processamento é utilizado um fermento endógeno denominado “pingo”, empregado como cultura lática iniciadora o que desempenha um papel importante e ainda pouco conhecido, contribuindo para uma fermentação favorável do produto.

O pingo possui em sua composição, diversos grupos microbianos a exemplo das bactérias láticas e leveduras. Esta prática de adicioná-lo ao leite durante a fabricação do queijo artesanal, resultou ao longo dos anos, na inserção de uma microbiota diversificada única, refletindo as características climáticas e geográfica da região onde é fabricado, conferindo ao queijo Minas artesanal, característica sensorial exclusiva.

Um dos grupos microbianos presentes no pingo é o de bactérias do ácido láctico (BAL), composto por vários gêneros, entre os quais espécies do gênero *Enterococcus*. *Enterococcus* estão presentes em números altos no queijo e no fermento endógeno, sugerindo sua participação na composição das características sensoriais desse tipo de queijo. Por essa razão, torna-se importante conhecer o seu papel no componente de flavour e na textura do queijo, no processo de maturação que afeta essas duas variáveis, assim como atuação no antagonismo de bactérias indesejáveis possivelmente presentes no leite cru e no pingo, que são empregados na fabricação do queijo Canastra.

*Enterococcus* produzem substâncias que atuam no flavour como diacetil e acetoina, além de enzimas, que durante a maturação, podem contribuir para a textura desses queijos fabricados com leite cru. Para que esses estudos sejam feitos, há a necessidade de isolados bem identificados, que possam, posteriormente, serem utilizados para tais avaliações.

*Enterococcus* compreendem um grupo de microrganismos que apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, catalase negativos, entre diversos outros gêneros com esta morfologia: *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, dentro da definição de bactérias láticas. Apresentam diversidade fenotípica e são capazes de tolerar condições extremas de crescimento, como altas concentrações de NaCl e temperaturas extremas, sendo assim,

encontrados em diversos nichos. São frequentemente isolados de queijos produzidos a partir de leite cru de vaca, ovelha e cabra. Queijos europeus fabricados com leite cru, de forma artesanal como Genestoso, Idiazabal, Feta e Serra da Estrela, apresentam uma microbiota endógena diversa, com predomínio de *Enterococcus*.

*Enterococcus* também são capazes de produzir bacteriocinas, moléculas protéicas que inibem o crescimento de outros microrganismos. Estudos demonstram a ação antagonista de *Enterococcus* frente a patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, e *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum* e *Brochothrix thermosphacta*. Com essa característica, *Enterococcus* podem ser de extrema importância na inocuidade alimentar de queijos produzidos utilizando-se leite cru, já que o leite não sofrendo tratamento térmico, possibilitaria a manutenção e crescimento de patógenos até a maturação.

Tendo em conta a tradição na produção destes queijos artesanais, poucos são os trabalhos que informam sobre a caracterização microbiológica do fermento artesanal. Este trabalho é parte de uma pesquisa que vem sendo realizada com os queijos produzidos na Região da Canastra de diferentes cidades, cuja finalidade é contribuir para a caracterização desta cultura endógena, enfatizando os isolados já obtidos num trabalho anterior de cocos Gram positivos, catalase negativos, com ênfase em *Enterococcus* spp.

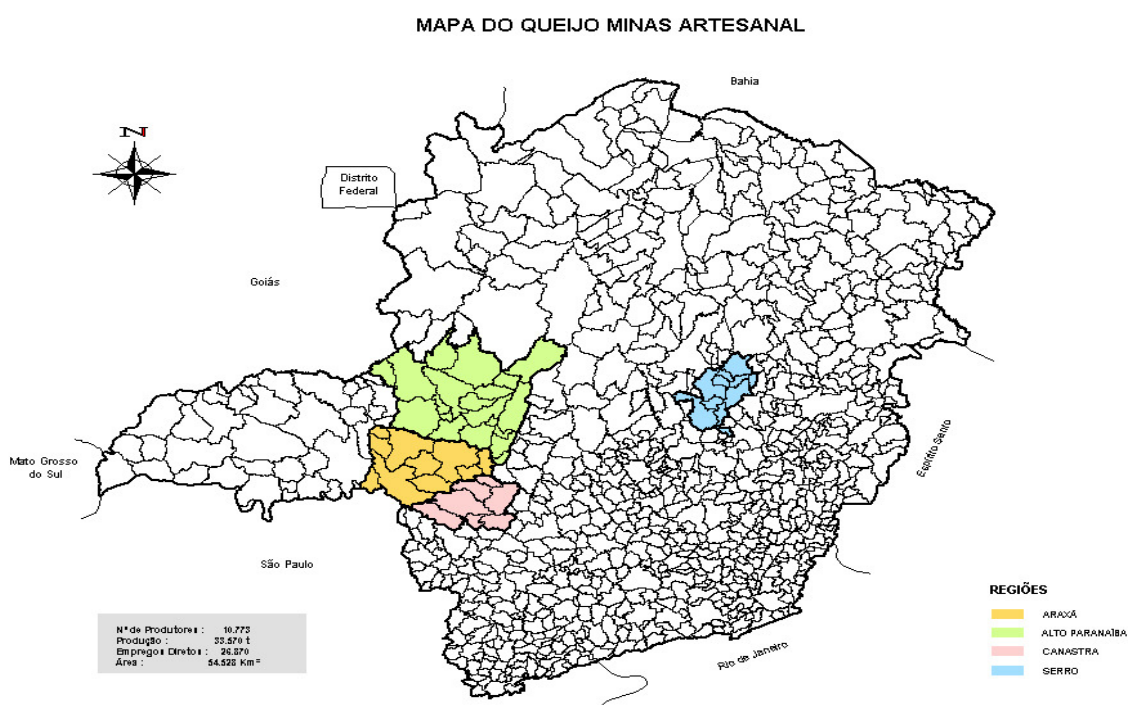
A identificação de estirpes do gênero *Enterococcus* permitirá estudos posteriores, que visem melhor entendimento do papel destas bactérias nas características sensoriais e de segurança do queijo Canastra.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Queijos artesanais da Canastra

O queijo Minas Artesanal é tradicionalmente produzido em quatro regiões distintas no estado de Minas Gerais. De acordo com o artigo 1º da Lei Estadual nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 (IMA, 2002), considera-se como queijo Minas artesanal, aquele produzido a partir do leite integral de vaca, fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios e massa uniforme, com ou sem olhaduras mecânicas, produzido nas quatro regiões reconhecidas como produtoras do queijo Minas artesanal. São elas: Canastra, Serro, Alto Paranaíba (Cerrado) e Araxá (Figura 1).

Esse queijo constitui a principal fonte de renda de um grande número de famílias, interferindo na economia dos vários municípios das quatro regiões produtoras que fabricam este queijo a partir de leite cru, mantendo as tradições culturais de fabricação existente em cada região.



**Figura 1.** Regiões produtoras dos quatro tipos de queijo Minas artesanal.

As quatro regiões abrangem uma área de 55.527 Km<sup>2</sup> e colocam no mercado um total de 26.085 toneladas/ano de queijo, com 9.015 produtores, atuando neste ramo, gerando 26.197 empregos diretos, indicando a importância econômica desse produto para as populações envolvidas (ALMEIDA, 2008).

O queijo Canastra origina-se da região da serra da Canastra, onde é produzido. Os queijos produzidos nas regiões de Araxá e Alto Paranaíba possuem o mesmo processo de fabricação, mas possuem denominações e características diferentes, referentes à região na qual são produzidos. A posição geográfica e condições climáticas diferencia os queijos tipo Canastra daqueles produzidos na região do Serro.

A região da Canastra compreende as cidades de Bambuí, Delfinópolis, Tapiraí, Medeiros, São Roque de Minas, Vargem Bonita e Piumhi (Portaria 694 do Instituto Mineiro de Agropecuária, de 17 de novembro de 2004). São aproximadamente 1.529 produtores que produzem por ano cerca de 5.787 toneladas (ALMEIDA, 2008). O queijo produzido nessa região é caracterizado pela consistência semi-dura com tendência à macia, de natureza manteigosa, textura compacta, cor branco amarelada com casca fina, amarelada sem trincas, além de sabor ligeiramente ácido, não picante, com peso variando entre 1.000 e 1.200 gramas (Portaria 818 do Instituto Mineiro de Agropecuária, 12 de dezembro de 2002) (Figura 2).

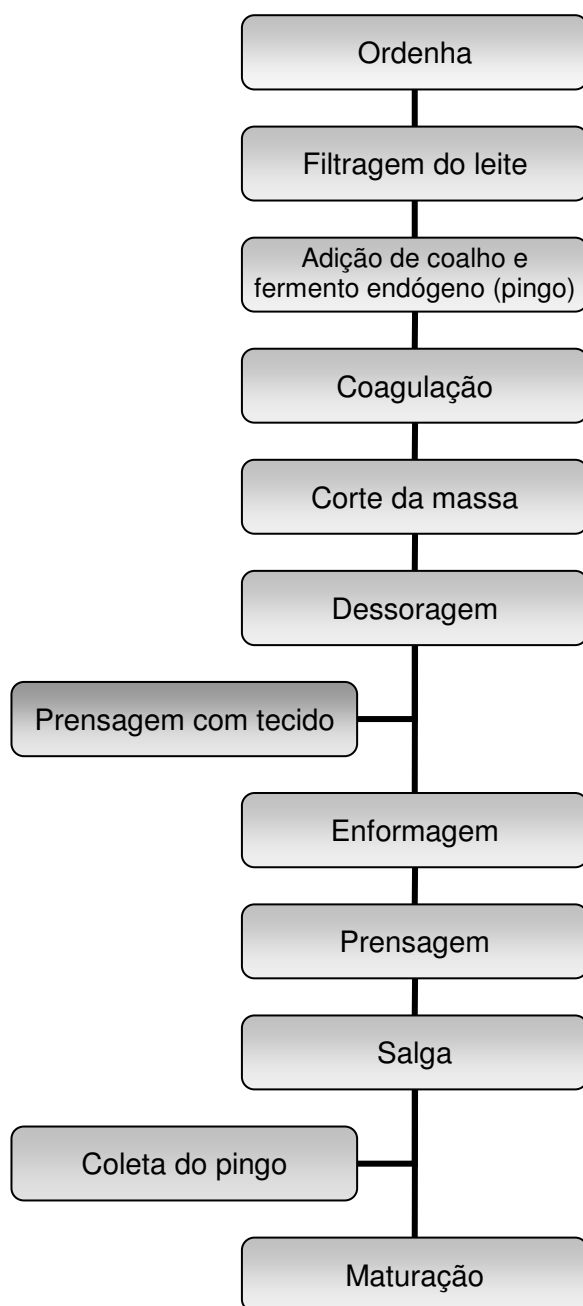


**Figura 2.** Queijo Minas artesanal produzido na região da Canastra. Fonte: Janaina Fidalgo / Folha Imagem.

Assim, o queijo Canastra, juntamente com os outros queijos Minas artesanal produzidos nas microrregiões do estado de Minas Gerais, devido a sua identidade e a seu modo tradicional de produção, possibilitaram seu tombamento pelo Instituto do Patrimônio Histórico Artístico e Cultural (IPHAN) como Patrimônio Cultural Brasileiro em 15 de maio de 2008. Esse registro, além de proteger o modo de produção, tem como objetivo estimular a sua atividade e desenvolvimento econômico das regiões produtoras, garantido apoio aos produtores na elaboração de políticas de incentivo desta prática tradicional.

### 2.1.1 Tecnologia de fabricação do queijo Canastra

O processo de fabricação do queijo Canastra está apresentado na Figura 3.



**Figura 3.** Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal fabricado na região da Canastra.

Após a ordenha, o leite é filtrado e acondicionado em galões de aço inox, recipientes plásticos ou tanques de aço inoxidável, nos quais adiciona-se o pingo, coalho e sal. Após repouso de cerca de 45 - 50 minutos, a massa é cortada, geralmente, com uma pá de madeira. Após a separação do soro, parte desse é retirado e a massa é enformada e prensada. No queijo Canastra, a prensagem da massa é feita usando-se tecido. Essa etapa do processo na fabricação dos queijos

artesanais diferencia os queijos da Canastra (prensagem com tecido), do queijo do Serro (prensagem somente com as mãos, sem ajuda de tecido). Após enformagem, segue-se salga seca. O sal, grosso ou fino, é colocado na parte superior do queijo, ainda dentro da forma. O soro salgado e translúcido, menos abundante, que escorre na bancada (de madeira, ardósia ou aço inox), ao final da dessora, é coletado e constitui o fermento endógeno (“pingo”) utilizado para inocular a próxima batelada do queijo Canastra. Após a salga (de ambos os lados), os queijos são maturados em prateleiras por cerca de 15 a 20 dias antes de serem comercializados.

A adição do pingo no processo de fabricação garante ao queijo um sabor e consistência diferenciados e único, devido à microbiota endógena, composta por bactérias láticas e leveduras. Além disso, à concentração de sal e baixos pHs, inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis, dentre os quais os coliformes.

Não existe uma padronização no processo de fabricação do queijo Canastra, assim como dos outros queijos Minas artesanal. A quantidade de coalho, fermento endógeno e sal adicionados variam entre os produtores (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; ORNELAS, 2005; BORELLI, 2006).

## **2.2 Cocos gram positivos catalase negativos**

Entre os grupos microbianos presentes no fermento endógeno e na microbiota do queijo, encontram-se cocos gram positivos, catalase negativos. Atualmente fazem parte deste grupo os seguintes gêneros: *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Facklamia*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (RUOFF, 2003). Entre esses microrganismos estão alguns gêneros pertencentes ao grupo de bactérias láticas.

Os cocos Gram positivos e catalase negativos dentro do grupo de bactérias láticas são: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (HOLT et al, 1994).

Os *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* são os principais gêneros microbianos que compõem diversos fermentos comerciais utilizados na fabricação de queijos, leites fermentados ou na fermentação de outras matérias primas. *Enterococcus*, apesar de apresentarem características tecnológicas importantes para a produção de queijos como atividade proteolítica e produção de compostos aromáticos, não são encontrados em culturas comerciais. Isso se deve ao fato destes microrganismos serem associados à contaminação de origem fecal e presença de

diversos fatores de virulência. Porém, sabe-se que *Enterococcus* podem ser isolados de diversos nichos como plantas, águas e leite, além do trato intestinal de humanos. Com isso, a associação da presença de *Enterococcus* em alimentos não pode ser atribuída unicamente à contaminação fecal, mas também como contaminante natural, principalmente em queijos e derivados (GIRAFÁ, 1997; 2002).

### 2.3 Papel da microbiota láctica em queijos artesanais

As bactérias do ácido láctico (BAL) são compostas por vários gêneros microbianos que apresentam na forma de cocos e bacilos e têm diversas características comuns como: são todas Gram positivas, na maioria das vezes catalase negativas, são raros os casos de motilidade e não esporulam. Atualmente são identificados 15 gêneros pertencentes a esse grupo. São eles: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (HOLT et al, 1994; STILES e HOLZAPFEL, 1997).

As BAL estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos, como vegetais, leite e carnes. São anaeróbias facultativas ou microaerofílicas. São sacarolíticas produzindo principalmente ácido láctico a partir da degradação da glicose e são divididas em homo ou heterofermentativas. As homofermentativas convertem a glicose a cerca de 85 % de ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem além do ácido láctico, também outros compostos como dióxido de carbono e ácido acético (HOLT et al, 1994).

Em geral, as BAL estão presentes em fermentos industriais, utilizados na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados. As principais funções microbiológicas de um fermento foram revistas por ROBINSON (2002) como:

- a) biopreservação de produtos devido à fermentação, resultando em aumento na vida de prateleiras, realçando a segurança;
- b) produção de bacteriocinas, apresentando grande potencial na conservação de alimentos;
- c) acentuação das propriedades sensoriais de um produto devido, por exemplo, a produção de ácidos orgânicos, componentes carbônicos e hidrólise parcial de proteínas e gorduras;

d) melhoraria das propriedades reológicas, isto é, viscosidade e dureza de produtos, e em alguns casos, incentivar a produção de gás (formação de olhaduras em queijos) e de cor (manchas azul, branca e vermelha pela presença de fungos).

*Enterococcus* contemplam várias destas funções tais como produção de substâncias inibidoras de natureza protéica, como as enterocinas (bacteriocinas), produção de componentes carbônicos e atividades proteolíticas, além de produzirem compostos aromáticos, contribuindo na maturação e segurança de queijos artesanais.

## 2.4 Microbiota de queijos artesanais

A produção de queijos envolve a participação de diversos microrganismos, que atuam como cultura *starter*, iniciando o processo de fermentação com a rápida produção de ácido, ou como cultura *non starter*, contribuindo na liberação de compostos aromáticos importantes na composição do flavour do produto final.

Várias pesquisas (GIRAFÁ, 1997; GONZALES et al, 2006; MADRAU et al, 2006) têm caracterizado a microbiota de diversos queijos artesanais, visando à identificação, quantificação e diversidade dos principais grupos microbianos, estabelecendo o papel destes microrganismos no desenvolvimento das características sensoriais destes queijos. Os mesmos são produzidos a partir de leites crus de vaca, cabra e/ou ovelha, no qual se observa uma grande variedade de microrganismos, compondo a microbiota.

Radazzo et al (2006) caracterizaram o queijo Pecorino Siciliano e encontraram bactérias pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*, com predominância das espécies *Lactococcus lactis* e *Streptococcus bovis*.

Madrau et al (2006), isolaram e identificaram bactérias lácticas do queijo Pecorino Sardo, produzido a partir de leite cru de ovelha, no qual também é utilizado fermento endógeno. Foram encontradas principalmente bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*.

Em um trabalho realizado por Ouadghiri et al (2005) observaram-se contagens superiores a  $10^9$  ufc/g de bactérias lácticas, com predominância dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus* no queijo produzido no Marrocos conhecido por Jben.

No México, observa-se um alto consumo de queijos frescos, assim como em outros países da América Latina. Em geral, estes queijos são produzidos nas fazendas

familiares ou em pequena escala nas fábricas que utilizam e tecnologias tradicionais, que incluem a acidificação por bactérias lácticas endógenas (TORRES e CHANDAN, 1981). Torres-Llanez et al (2006) caracterizando este tipo de queijo encontraram *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus casei* como espécies predominantes.

O queijo Genestoso produzido na região noroeste da Espanha é feito atualmente a partir da mistura de leites cru de vaca, cabra e ovelha. González et al (2006) isolaram 409 bactérias lácticas pertencentes os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Destes, 395 isolados foram avaliados quanto à capacidade antagonística. Todos os gêneros isolados inibiram *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutyricum* CECT4011, *Enterococcus faecalis* CECT 481 e *Staphylococcus aureus* CECT 240.

Herreros et al (2006) avaliaram o efeito da adição de culturas endógenas em leite pasteurizado para a fabricação do queijo Armada, comparando as propriedades físico-químicas e sensoriais do queijo produzido a partir de leite cru e leite pasteurizado. Observaram ainda a predominância de bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Os autores concluíram que a adição destas culturas endógenas ao leite pasteurizado resultou em um produto final semelhante ao original fabricado a partir de leite cru e adição de fermento endógeno.

Diante do exposto, identificar e caracterizar a microbiota são de suma importância para a definição do papel de cada microrganismo dentro da microbiota endógena de cada queijo. Por isso, a importância de se identificar corretamente estes isolados, para que se possa conhecer seu papel no desenvolvimento das características sensoriais desses queijos.

## **2.4 Gênero *Enterococcus***

*Enterococcus* são bactérias classificadas dentro da definição geral das bactérias do ácido láctico (BAL) por serem Gram positivas e catalase negativa. São frequentemente isolados de queijos artesanais produzidos, principalmente, com leite cru. A fisiologia destes microrganismos, como a produção de compostos aromáticos e enzimas contribuem na textura, sabor e aroma destes queijos. Além disso, são produtores de enterocinas, que possuem grande espectro de inibição a diferentes patógenos, como *Listeria* spp e *Clostridium* spp (GIRAFÁ, 1997).

Anteriormente, *Enterococcus* eram classificados como um grupo pertencente ao gênero *Streptococcus*. Entretanto, técnicas modernas de classificação como o

sequenciamento do 16s rDNA resultaram em transferência de alguns membros do gênero *Streptococcus*, como alguns dos *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, ao novo gênero *Enterococcus* (GIRAFFA, 1997) que pertencem à família *Enterococaceae*, composto pelos gêneros *Atopobacter*, *Catelliococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (EUZÉBY, 2008).

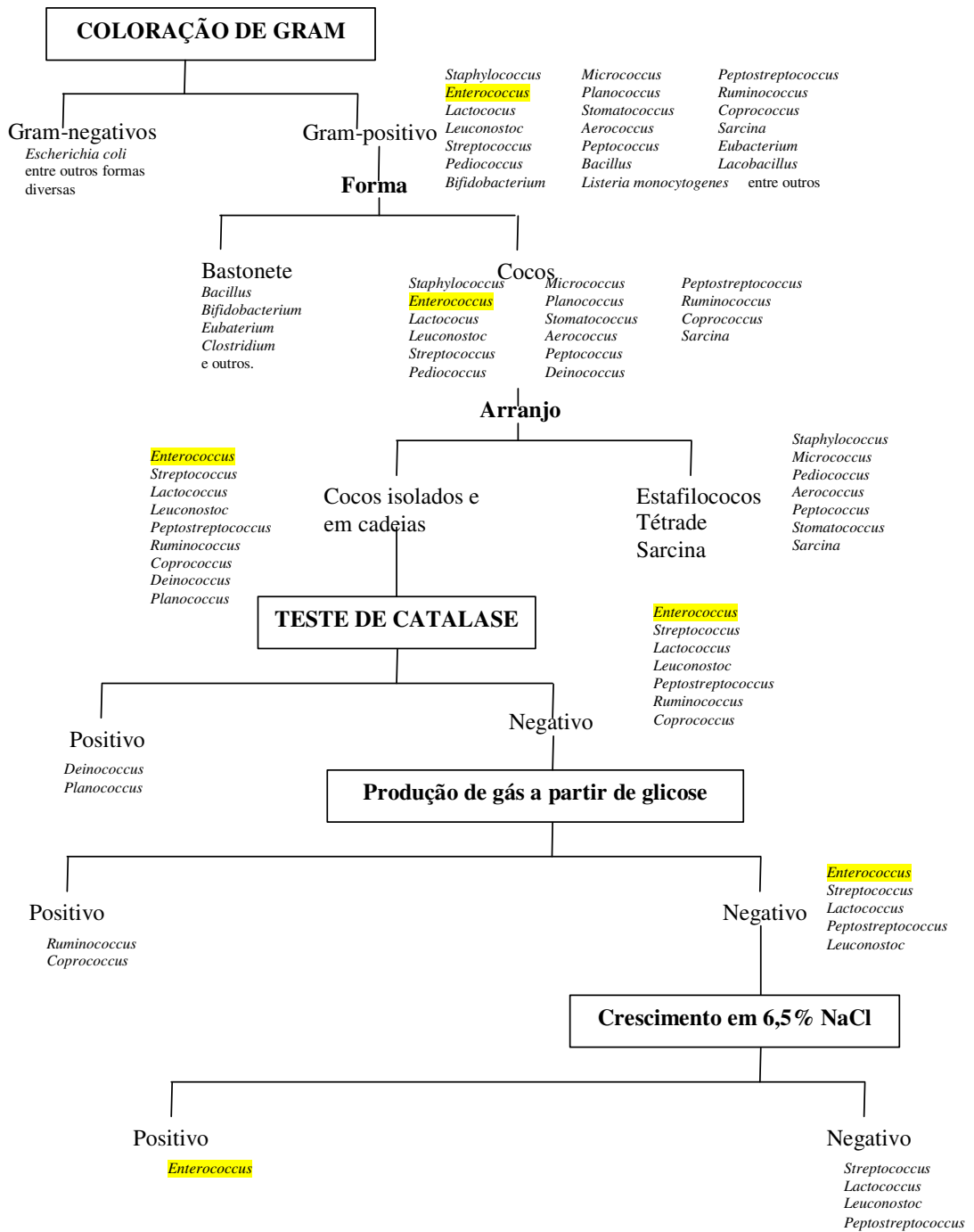
Entre outras características, *Enterococcus* podem ocorrer sob a forma de cocos isolados, em pares, ou em cadeias curtas, não esporulam, são oxidase negativo e anaeróbio facultativos, A maioria das espécies produzem uma enzima Pirrolidonicarilamidase (PYR) (HARDIE e WHILEY, 1997). Entretanto, esta característica é discutida, tendo em vista que algumas espécies não apresentam positividade para a síntese desta enzima (FORTIN et al, 2003).

*Enterococcus* crescem em uma temperatura ótima de 35 °C, embora a maioria das espécies do gênero cresçam em temperaturas que variam de 10 a 45 °C. A maioria apresenta crescimento em altas concentrações de NaCl (até 6,5 %), pH em torno de 9,6, e ainda pode sobreviver a 60 °C durante 30 min, sendo, portanto, termodúricos. Grande parte destes organismos consegue hidrolisar a esculina na presença de 40 % de sais biliares (FACKLAM et al, 1995; GIRAFFA, 1997; 2003; FACKLAM et al, 2002; FOLQUIE- MORENO, 2006).

### **2.5.1 Classificação e identificação**

A identificação de *Enterococcus* foi sempre problemática. Numerosos isolados especialmente de fonte ambiental, freqüentemente, não são identificados, quando considerados somente traços fenotípicos. É difícil identificar isolados de uma espécie de *Enterococcus* usando apenas testes fisiológicos, devido à heterogeneidade fisiológica observada nesse gênero. (DEVRIESE, 1993).

O problema com a taxonomia deste gênero ocorre devido ao fato de constituir um grupo bastante heterogêneo (cocos Gram positivos), além de compartilhar várias características com os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus* (GIRAFFA, 2003). Coloração de Gram, morfologia e arranjo, teste de catalase, produção de gás a partir da glicose e crescimento em 6,5 % de NaCl são teste utilizados rotineiramente para a identificação presuntiva do gênero *Enterococcus*.



**Figura 4.** Organograma para identificação presuntiva do gênero *Enterococcus* spp.

Atualmente, são conhecidas 39 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. (EUZÉBY, 2008) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

<b>Espécies</b>	<b>Referências</b>
<i>Enterococcus aquimarinus</i>	SVEC et al, 2005
<i>Enterococcus asini</i>	VAUX et al, 1998
<i>Enterococcus avium</i>	COLLINS et al, 1984
<i>Enterococcus caccae</i>	CARVALHO et al, 2006
<i>Enterococcus cameliae</i>	SUKONTASING et al, 2007
<i>Enterococcus canintestini</i>	NASER et al, 2005
<i>Enterococcus canis</i>	DE GRAEF et al, 2003
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	COLLINS et al, 1984
<i>Enterococcus cecorum</i>	WILLIAMS et al, 1989
<i>Enterococcus columbae</i>	DEVRIESE et al, 1993
<i>Enterococcus devriesei</i>	SVEC et al, 2005
<i>Enterococcus dispar</i>	COLLINS et al, 1991
<i>Enterococcus durans</i>	COLLINS et al, 1984
<i>Enterococcus faecalis</i>	SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984
<i>Enterococcus faecium</i>	SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984
<i>Enterococcus flavascens</i>	POMPEI et al, 1992
<i>Enterococcus gallinarum</i>	COLLINS et al, 1984
<i>Enterococcus gilvus</i>	TYRRELL et al, 2002
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	SVEC et al, 2001
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	KOOR et al, 2004
<i>Enterococcus hirae</i>	FARROW e COLLINS, 1985
<i>Enterococcus italicus</i>	FORTINA et al, 2004
<i>Enterococcus malodoratus</i>	COLLINS et al, 1984
<i>Enterococcus moraviensis</i>	SVEC et al, 2001
<i>Enterococcus mundtii</i>	COLLINS et al, 1986
<i>Enterococcus pallens</i>	TYRRELL et al, 2002
<i>Enterococcus phoniculicola</i>	LAW-BROWN e MEYERS, 2003
<i>Enterococcus porcinus</i>	TEIXEIRAS et al, 2001
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	COLLINS et al, 1989
<i>Enterococcus raffinosus</i>	COLLINS et al, 1989
<i>Enterococcus ratti</i>	TEIXEIRAS et al, 2001
<i>Enterococcus sacchalyticus</i>	RODRIGUES e COLLINS, 1991
<i>Enterococcus saccharominimus</i>	VANCANNEYT et al, 2004
<i>Enterococcus seriolitica</i>	KUSUDA et al, 1991
<i>Enterococcus silesiacus</i>	SVEC et al, 2006
<i>Enterococcus solitarius</i>	COLLINS et al, 1989
<i>Enterococcus sulfureus</i>	MARTINEZ-MURCIA e COLLINS, 1991
<i>Enterococcus termitis</i>	SVEC et al, 2006
<i>Enterococcus villorum</i>	VANCANNEYT et al, 2001

Fonte: Euzeby (2008) - Adaptado

A identificação das espécies de *Enterococcus* pode ser feita por meio de testes bioquímicos convencionais (crescimento à 10 e 45 °C, concentração 6,5 % NaCl, Gram positivo e catalase negativo), baseando-se na formação de ácidos em presença de alguns substratos como manitol, sorbose, arabinose, sorbitol, rafinose (teste de fermentação de carboidratos); na hidrólise da arginina (teste de descarboxilação da arginina) e na utilização de piruvato 1 %. Outras características fenotípicas como motilidade e pigmentação amarela também auxiliam na identificação (MANERO e BLANCH, 1999).

Entretanto, algumas espécies divergem quanto às características fenotípicas estabelecidas para o gênero. Por exemplo, *Enterococcus dispar* e *E. sulfureus* não apresentam crescimento à 45 °C, enquanto *Enterococcus cecorum* e *E. columbae* não crescem à 10 °C. *Enterococcus avium*, *E. cecorum* e *E. columbae* não crescem, ou crescem lentamente na presença de 6,5 % de NaCl (DEVRIESE et al, 1993).

Devido a essa diversidade fenotípica, não existem meios de cultivo que sejam suficientemente seletivos para *Enterococcus*. Este isolamento pode ser realizado utilizando-se de meios que contenham ázida sódica, kanamicina, sais biliares e NaCl. Os meios Kanamicina Esculina Azida (KAE) e Kenner Fecal (KF) são frequentemente utilizados para isolamento deste gênero (DEVRIESE et al, 1995; FACKLAM et al, 1999).

O meio Kanamicina Azida (KAA) é utilizado para o isolamento de bactérias do gênero *Enterococcus* spp. Dolci et al (2007) caracterizaram a microbiota endógena do queijo artesanal Raschera, produzido na região noroeste da Itália. Os autores concluíram que o meio KAA apresentou alta seletividade para *Enterococcus* quando incubados à 37 °C por 48 horas. Andrigheto et al (2001) isolando *Enterococcus* de queijos italianos utilizaram o meio KAA obtendo resultados satisfatórios.

Menéndez et al (2004) isolaram *Enterococcus* spp. do queijo Tetilla produzido com leite cru de vaca utilizando KF, constatando uma alta seletividade para o este meio. Do mesmo modo, Centeno et al (1996) utilizando este meio constataram alta seletividade no isolamento de *Enterococcus* em queijos artesanais.

González et al (2006) identificando BAL do queijo Genestoso consideraram as bactérias que apresentaram crescimento no ágar KF (Difco Laboratories, USA), com colônias rosas ou vermelhas, com halo amarelos como *Enterococcus* spp. Porém, estes isolados foram obtidos de diferentes meios: M17 ágar (Biokar, France) usado para isolamento de lactococos, MSE ágar (Biokar, France) leuconostoc e ROGOSA ágar para contagem e isolamento de lactobacilos. Foram obtidos cerca 140 isolados de BAL em cada meio, num total de 409 classificados como BAL. Entre esses microrganismos isolados, os autores classificaram como sendo pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. dos três meios nas seguintes proporções: 27,66 %, 22,86 % e 3,52 % respectivamente do meios M17, MSE e ROGOSA.

Devido a diversidade fenotípica apresentado pelo gênero *Enterococcus*, a utilização de meios seletivos nem sempre favorecem o crescimento de todas as estirpes, o que dificulta o isolamento de novas espécies.

## 2.5.2 Propriedades bioquímicas do gênero *Enterococcus*

### 2.5.2.1 Atividade acidificante

A capacidade acidificante das bactérias lácticas é de extrema importância em alimentos, principalmente, em produtos lácteos fermentados. A rápida redução do pH, pelo acúmulo de ácido lático, atua, principalmente no controle da microbiota contaminante. Assim, constituem um fator auxiliar no processo de conservação e segurança dos produtos lácteos. *Enterococcus* spp. são homofermentativos, tendo o ácido lático como principal produto da fermentação da glicose.

*Enterococcus* não apresentam rápida atividade acidificante quando inoculados em leite se comparado com outros gêneros de cocos Gram positivos catalase negativo como *Lactococcus* e *Streptococcus*, microrganismos presentes em diversos fermentos industriais.

Sarantinopoulos et al (2001) avaliaram 129 microrganismos identificados como *Enterococcus*, isolados de produtos lácteos, animal e humanos quanto à capacidade acidificante. O resultado demonstrou estirpes pobres quanto à capacidade de acidificação em leite. Alguns isolados de *E. faecalis* de origem alimentar apresentaram algum resultado satisfatório. Essa origem dos isolados interfere nas características expressadas pelo microrganismo. Pesquisas indicam que *Enterococcus* de origem alimentar apresentam melhores características tecnológicas e menos fatores de virulência do que isolados de origem clínica (GIRAFÁ, 1997; SARANTINOPOULOUS et al, 2001).

Villani e Coppola (1994) examinaram a capacidade acidificante de 24 estirpes de *E. faecium* e 60 *E. faecalis*, inoculando-os em leite por 6h à 37 °C. Grande parte das estirpes foi capaz de reduzir o pH do leite entre 0,4 e 0,8 unidades, tendo a predominância de estirpes de *E. faecalis*, indicando baixa atividade acidificante. Resultados semelhantes foram encontrados por Andrighetto et al (2001) em que as estirpes de *E. faecalis* também apresentaram baixa capacidade de acidificação. Entretanto, outros trabalhos associam um alto potencial acidificante de *E. faecalis* (SUZZI et al, 2000).

A produção de ácido favorece a coagulação e atua na prevenção e/ ou redução de crescimento de patógenos ou microrganismos contaminantes. Em função dos resultados apresentados por alguns trabalhos (VILLANI e COPPOLA, 1994; SARANTINOPOULOUS et al, 2001) os qual indicaram baixa capacidade acidificante,

*Enterococcus* não é recomendado como cultura *starter*; porém, sua utilização como cultura adjunta é de grande importância devido à produção de compostos aromáticos.

### 2.5.2.2 Atividade proteolítica

A degradação da caseína é o principal fator no desenvolvimento da textura de um queijo. Alguns peptídeos contribuem para a formação de flavour, outros podem conferir um gosto amargo, formando “*off flavours*”. Além disso, a degradação secundária dos aminoácidos também tem um impacto importante no desenvolvimento do sabor nos queijos. Assim como as enzimas proteolíticas indígenas presentes no leite e a renina usadas para a coagulação das proteínas, a parede celular das bactérias lácticas associadas à proteinases e peptidases intracelulares, que são liberados depois da lise celular durante a coalhada, são importantes na hidrólise da caseína durante a preparação do queijo (WILKINSON et al, 1994; SARANTINOPOULOS et al, 2001).

A atividade proteolítica de *Enterococcus* tem papel fundamental em queijos maturados pois, espécies dessas bactérias liberam na matriz destes alimentos, proteases e peptidases que contribuem para a textura e sabor desses queijos.

Ghrai et al (2008) avaliaram propriedades proteolíticas da estirpe *E. faecium* MMT21 isolada de queijo Rigouta. A estirpe apresentou uma alta atividade de peptidase e média atividade de proteases. Os mesmos autores indicam que estas características parecem ser vantajosas para o sabor e textura em leites fermentados.

Sarantinopoulos et al (2001) demonstraram que a maioria dos isolados de *Enterococcus* obtidos de produtos lácteos avaliados apresentaram baixa atividade proteolítica, sendo que *Enterococcus faecalis* apresentou uma atividade melhor em relação às espécies *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans*.

Arizcum et al (1997) analisaram a atividade proteolítica dos *Enterococcus* presentes no queijo Roncal e Idiazabal, e observaram uma grande variação desta atividade entre os isolados avaliados. Esses autores concluíram que estas atividades proteolíticas influenciaram na maturação dos queijos. Os mesmos autores relataram que o aumento de peptídeos e polipeptídeos em grande escala podem causar defeito no aroma dos queijos.

A capacidade proteolítica é uma propriedade tecnológica importante para o processamento de queijos maturados. Como *Enterococcus* são com frequência isolados deste tipo de queijo, e estas bactérias são capazes de produzir proteases e

peptidases, isso sugere uma provável contribuição destes organismos no desenvolvimento das características de textura e aroma destes queijos.

### **2.5.2.3 Metabolismo do citrato**

A utilização do citrato é uma importante característica tecnológica de BAL. O citrato presente no leite é metabolizado por várias BAL, como os *Enterococcus* e *Leuconostoc* com liberação de compostos como acetato, acetaldeído e diacetil (HUGENHOLTZ, 1993) que contribuem no flavour de produtos lácteos fermentados, como queijos.

O metabolismo do citrato por *Enterococcus* tem sido objeto de estudo, em função de seu efeito sensorial sobre os queijos (CENTENO et al, 1999; SARANTINOPOULOS et al, 2001). *E. faecium* e *E. faecalis* ocorrem com freqüência em grande número, em vários tipos de queijos. A degradação do citrato resulta na liberação de compostos aromáticos como o diacetil, componente do *flavour* em queijos. O catabolismo do citrato em leite por *Enterococcus* pode explicar, entre outros mecanismos, o papel destes organismos no desenvolvimento das propriedades organolépticas distintas destes queijos (FOLQUIE-MORENO, 2006).

Sarantinopoulos et al (2001) avaliando a capacidade de 56 isolados de *Enterococcus faecalis* verificaram que 53 metabolizaram acima de 84 % do citrato presente no leite em 6 horas. Já para a espécie de *Enterococcus faecium* somente quatro entre 57 isolados consumiram todo o citrato do meio. Este resultado indicou que a capacidade de metabolizar o citrato variou entre as espécies do gênero.

Centeno et al (1999) avaliaram a capacidade de *Enterococcus faecalis* isolados do queijo Cebreiro em metabolizar o citrato. Os resultados indicaram que os isolados avaliados produziram diacetil e acetoína, o que influenciou no aroma do queijo.

A capacidade dos *Enterococcus* em metabolizar o citrato acumulado demonstra sua importância no processo de maturação de queijos artesanais.

### **2.5.2.4 Bacteriocinas**

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são sintetizadas a partir de informação ribossômica, sendo caracterizadas por moléculas de pequenos peptídeos, catiônicas, anfifílicas e naturalmente produzidas pelos microrganismos, variando em

espectro, atividade, estrutura e massa molecular, estabilidade térmica, atividade em pH e determinantes genéticos (DE VUYST e VANDAMME, 1994; CLEVELAND et al 2001; FOLQUIE-MORENO et al, 2003; LEROY et al, 2003).

*Enterococcus* possuem habilidade de produzir enterocinas com atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas, incluindo esporos e bactérias patogênicas, tais como *Listeria* spp. (CLEVELAND et al, 2001; TEIXEIRAS et al, 2003). Um exemplo é a enterocina CRL35 da estirpe *E. faecium* CRL35, que foi capaz de inibir a multiplicação “*in vitro*” de células do vírus causador de herpes (WACHSMAN et al, 1999), o que indica seu potencial antagonístico frente à patógenos além de microrganismos bacterianos.

O mecanismo de ação inibitória das enterocinas, bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* é resultante da atuação sobre a membrana citoplasmática, com formação de poros na membrana celular, alterando o potencial da membrana e/ou gradiente do pH, com a saída de moléculas intracelulares, interferindo na permeabilidade da membrana e no funcionamento de funções celulares essenciais, como replicação do DNA e translocação (DE VUYST e VANDAMME, 1994; CLEVELAND et al, 2001).

Segundo Giraffa (1995), as enterocinas podem ser exploradas para conservação de alimentos, em função de sua atividade inibitória sobre patógenos por essas substâncias.

Ghraiiri et al (2008) avaliaram a atividade de enterocinas produzidas por *Enterococcus faecium* MMT21 e obtiveram resultados satisfatórios de inibição frente a *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* spp. Os autores citam o uso destas enterocinas como bons métodos de preservação frente a patógenos emergentes. Essa bacteriocina foi considerada termostável, o que possibilita a utilização em processos industriais que envolvem tratamentos térmicos.

Gonzáles et al (2006) avaliaram cinco *Enterococcus* isolados em meio ROGOSA obtidos do queijo Genestoso, que apresentaram atividade antagonística frente a *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011, *Enterococcus faecalis* CECT 481 e *Staphylococcus aureus* CECT 748.

Torri Tarelli et al (1994) observaram a inibição de patógenos como *L. monocytogenes* e *S. aureus* por bacteriocinas produzidas por bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas de derivados lácteos.

Observa-se que além da identificação de estirpes endógenas produtoras de enterocinas, a disponibilidade dessas estirpes possibilitaria sua utilização como

complemento em fermentos naturais e/ou comerciais utilizados na fabricação de queijos artesanais maturados de forma a contribuir para a garantia da segurança microbiológica desse produto. Essas bacteriocinas purificadas poderiam ser utilizadas como biopreservantes, protegendo diversas matrizes alimentares.

## **2.5 *Enterococcus* como probiótico**

Probióticos podem ser definidos como monoculturas ou culturas mistas de microrganismos vivos que sendo ingeridos pelo homem ou animal podem influenciar de forma positiva, melhorando as propriedades da microbiota endógena do hospedeiro. Frequentemente são constituídos de espécies que fazem parte do habitat intestinal (HAVENAAR et al, 1992; FRANZ et al, 1999; 2003).

O consumo de probióticos pode exercer, segundo pesquisas, uma série de efeitos benéficos, incluindo aumento da resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, efeitos adjuvante em vacinas, redução das enzimas fecais que podem resultar na iniciação dos cânceres, associação no tratamento da diarreia associado com terapias de antibióticos, controle do *Clostridium difficile* - causador da colite e prevenção de úlceras relacionadas ao *Helicobacter pylori*. Os probióticos também influenciam na redução do colesterol sérico, no antagonismo entre microrganismos patogênicos presentes em alimentos, na deterioração dos dentes, na melhora dos sintomas de má absorção da lactose, assim como em candidíase e infecções do trato urinário (FRANZ et al, 1999; SAAVEDRA et al, 2001).

*Enterococcus* contemplam praticamente todas as exigências definidas para um microrganismo probiótico como capacidade de aderência ao epitélio intestinal, o que reduz a aderência de patógenos, persistência e multiplicação, produção de ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas antagonistas ao crescimento de patógenos, ser seguro, não invasivo, não patogênico e não carcinogênico e ainda pertencer a microbiota normal (SALMINEN et al, 1996). Entretanto, este gênero é associado a certas patogenicidades como infecções do trato urogenital, além de carrear genes de resistência a antibióticos sendo portanto, seu uso como probiótico muito controverso entre a comunidade científica. *Enterococcus*, mesmo com essas ressalvas, têm sido usados em alguns países como probióticos (FRANZ et al, 1999; 2003).

A linhagem de *E. faecium* SF68 é alvo de pesquisa quanto à sua atividade probiótica com efeito positivo na resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, tratamento de colites e diarreias, antagonismo a patógenos veiculados por alimentos

contaminados e redução do colesterol sérico (FRANZ et al, 1999; ANDRIGHETTO et al, 2001).

Apesar das características que favorecem a utilização deste gênero como probióticos, sua utilização deve ser feita com cautela. Avaliações rigorosas quanto à presença de fatores de virulência e genes de resistência a antibióticos devem ser considerados antes da liberação de uma estirpe de *Enterococcus* como microrganismo probiótico.

## 2.6 *Enterococcus* em queijos

Numerosos microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras, estão presentes nos queijos e formam um ecossistema complexo. Entre estes organismos, as bactérias são responsáveis pela maioria das transformações físico-químicas e aromas que ocorrem durante o processo de fabricação (OGIER et al, 2002).

A microbiota de um queijo reflete a diversidade de microrganismos envolvidos desde a retirada, origem e processamento do leite, assim como do processo de produção, estocagem e maturação do queijo. Essa microbiota pode variar muito de uma região para outra, em decorrência das condições geográficas e climáticas da região no qual é produzido.

Anteriormente, a presença de *Enterococcus* em produto lácteos era considerada como indicador das condições sanitárias inadequadas durante a produção e processamento do leite (GIRAFÁ, 2002; SARANTINOPOULUS et al, 2001). Entretanto, sabe-se que estes microrganismos são com freqüência isoladas de água, plantas e alimentos, compondo diversas microbiotas, além de produtos lácteos e fermentados, limitando sua utilização como indicador de contaminação fecal em função da inespecificidade do hospedeiro (GIRAFÁ, 2002).

A importância de *Enterococcus* no desenvolvimento de importantes características sensoriais de queijos europeus como Muçarela, Feta e Cebreiro (SARANTINOPOULUS et al, 2001) Roncal e Idiazabal (ARIZCUM et al, 1997) e Rigouta (GHRAIRI et al, 2008) foi estudada. Tolerância a sal e ácidos são algumas propriedades bioquímicas desejáveis no processamento de alguns queijos (ANDRIGHETTO et al, 2001; GIRAFFA, 2002).

*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus. durans* são as espécies mais freqüentes encontradas em produtos lácteos associada a suas atividades metabólicas e tecnológicas sendo consideradas essenciais na determinação do sabor e textura de alguns queijos típicos produzidos a partir de leite

cru. Esse fato deve-se a sua alta atividade proteolítica e produção de compostos aromáticos como diacetil e acetoína (CENTENO et al, 1999).

A espécie *E. faecalis* é com frequência isolada em relação às outras espécies. Entretanto, *E. faecium* é mais utilizada como cultura adjunta e até mesmo como probiótico em função da menor frequência de fatores de virulência nesta espécie.

Centeno et al (1996; 1999) avaliaram o efeito da adição de *Enterococcus faecalis* variedade *liquefaciens* à fabricação do queijo Cebreiro, produzido a partir de leite de vaca na região noroeste da Espanha. Os autores concluíram que a espécie predomina neste tipo de queijo, quando fabricado a partir de leite cru. Os autores sugeriram que estirpes enterocócicas deveriam compor um fermento para ser utilizado no queijo feito com leite pasteurizado para reproduzir as características típicas do queijo tradicional.

Arizcum et al (1997) identificaram e caracterizaram a atividade proteolítica de *Enterococcus* spp. isolados de leite e dos queijos Idiazábal e Roncal, produzidos na Espanha. Foram isolados quatro espécies, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. avium*, que apresentaram papel importante na maturação destes queijos ao produzirem acetaldeído e diacetil, que contribuem para o *flavour* característico desses queijos.

O queijo Feta é tradicionalmente produzido utilizando-se leite cru de vaca (MANOLOPOULOU et al, 2003). Entretanto, grande parte dos queijos consumidos atualmente é produzido com leite pasteurizado e utilizando de culturas lácticas comerciais contendo *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus bulgaricus* na proporção de 1:3 respectivamente. Além destes microrganismos, a microbiota láctica deste queijo possui predominância de *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* (SARANTINOPOULOUS et al, 2002). Os autores indicaram duas diferentes estirpes de *E. faecium* para utilização como cultura adjunta para a produção do queijo Feta, que contribuíram para as características de textura e sabor deste queijo.

A grande diversidade de *Enterococcus* isolados de leite e derivados lácteos favorecem o isolamento e identificação de novas espécies. Jurkovic et al (2006) observaram uma variedade genética de isolados da espécie *Enterococcus faecium* obtidos do queijo Bryndza, relacionando esta diversidade com a origem geográfica das amostras obtidas.

Andrighetto et al (2001) analisaram o perfil fenotípico e genotípico de *Enterococcus* isolados de vários queijos italianos produzidos a partir de leites de vaca, búfala e cabra. Foi observada uma predominância da espécie *E. faecalis* e em menor quantidade *E. faecium*, *E. durans* e *E. gallinarum*.

Uma nova espécie de *Enterococcus*, *E. italicus*, foi recém isolada dos queijos artesanais Toma Piemontese e Robiola Piemontese (FORTINA et al, 2004) produzidos na Itália.

Psoni et al (2006) avaliou a heterogeneidade fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados do queijo Batzos, encontrando uma grande diversidade genética entre os *Enterococcus* avaliados

Assim, a presença de *Enterococcus* é de extrema importância na composição da microbiota natural de queijos artesanais, contribuindo nas características sensoriais destes queijos e na segurança em função principalmente para a produção de enterocinas. Identificar e verificar o papel destes organismos no processo de fabricação e maturação destes queijos possibilitará a seleção de estirpes que apresentem melhores propriedades tecnológicas para posteriormente, compor um fermento natural direcionado para a fabricação destes queijos feitos a partir de leite pasteurizado, e ainda sim, não descaracterizar o queijo Minas artesanal.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Caracterizar cocos Gram-positivos catalase negativos isolados do fermento endógeno usado na fabricação dos queijos artesanais, produzidos na região da Serra da Canastra, visando identificar bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

#### **3.2 Específicos**

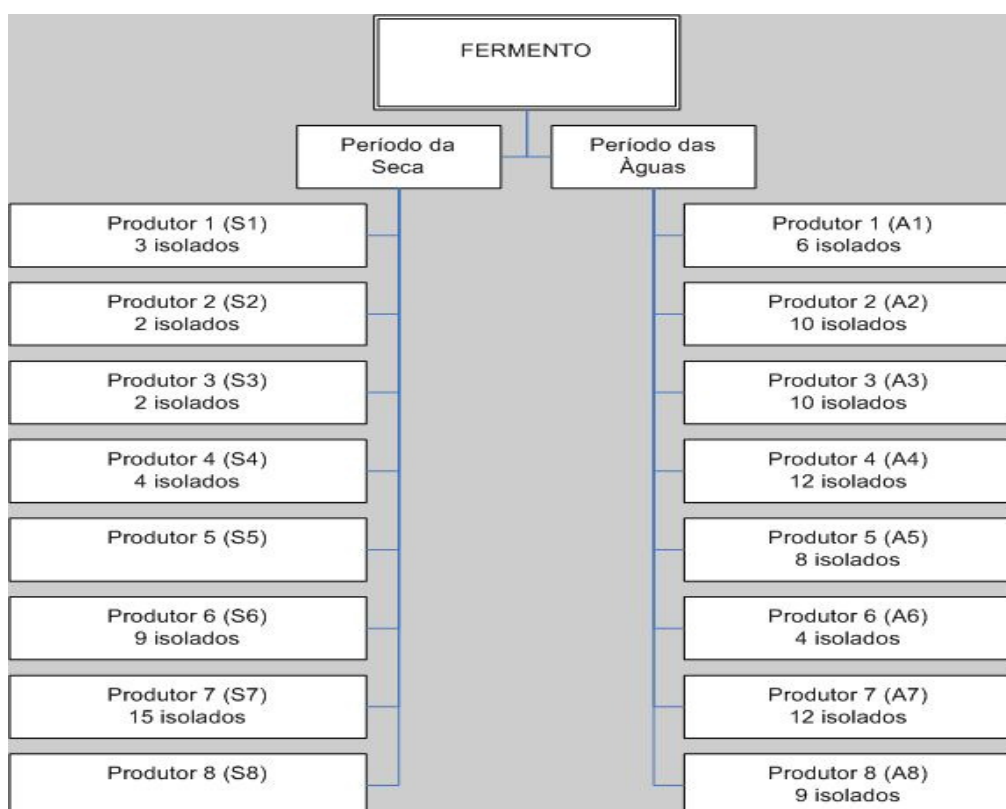
- Caracterizar fenotipicamente cocos Gram-positivos catalase negativos isolados do fermento endógeno;
- Identificar o perfil de fermentação dos cocos Gram positivos, catalase negativos;
- Identificar genotipicamente por meio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para confirmação dos isolados como pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp.

## 4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, sendo que as avaliações genóticas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Leite, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

### 4.1 Origem dos isolados

As bactérias utilizadas nesta pesquisa foram coletadas em dois períodos do ano (água e seca) a partir do fermento endógeno de oito unidades produtoras de queijo, selecionadas no município de Medeiros, região da Canastra, do crescimento em agar Kenner Fecal (KF, MicroMed, USA) totalizando 16 amostras. O número de isolados de cada produtor corresponde a raiz quadrada da contagem total das placas de KF (NOBREGA, 2007) nos períodos coletados (Figura 5).



**Figura 5.** Organograma para obtenção dos isolados avaliados a partir do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra da região de Medeiros, MG.

## **4.2 Manutenção e ativação dos isolados obtidos do fermento endógeno**

Após o isolamento, os microrganismos isolados foram transferidos para tubos contendo leite desnatado reconstituído a 10 % (LDR 10 %), adicionados de 30 % de glicerol e armazenados à temperatura de -80 °C, até o momento das análises. Antes de cada avaliação, os isolados foram repicados três vezes em Brain Heart Infusion (BHI) (Difco ®, USA) esterilizado e incubado à 37 °C por 24 horas.

## **4.3 Teste de catalase e morfotintorial dos isolados**

Após a ativação dos isolados, procedeu-se a coloração de Gram para avaliação da morfologia e pureza das células. Os isolados foram estriados com a utilização de alça de platina em ágar BHI (Difco®, USA) e incubados à 37 °C por 18 a 24 horas para o teste de catalase. Após esse período, foi adicionado peróxido de hidrogênio 3 % sobre as colônias crescidas e observada formação de bolhas, indicando resultado positivo. Após esta avaliação, foram selecionados os cocos Gram positivos e catalase negativos, para serem submetidos aos testes presuntivos: hidrólise da arginina, crescimento a 4 e 6,5 % de NaCl, 10 e 45 °C, pH 9.6 e bile esculina. Com o resultado desses testes, os isolados foram agrupados de acordo com o perfil fenotípico apresentado.

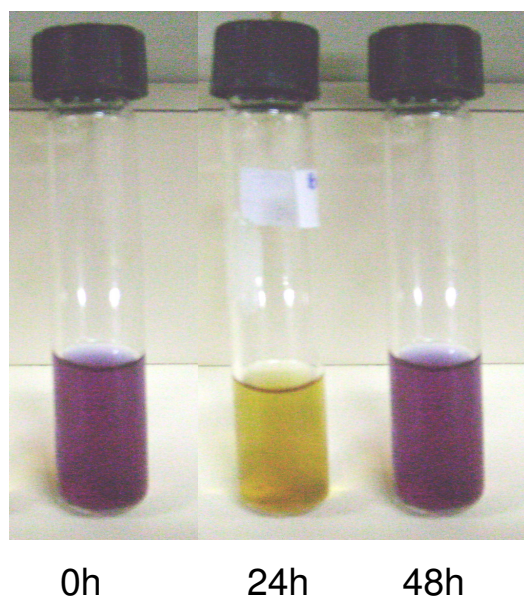
## **4.4 Teste bioquímicos**

Os meios para os testes foram preparados por ingredientes, salvo quanto indicado no texto a utilização de meios comercialmente prontos.

### **4.4.1 Hidrólise da arginina**

Após ativação, os isolados foram submetidos ao teste de hidrólise da arginina. Foram transferidos 30 µL da cultura para tubos contendo 3mL do Caldo Lisina Descarboxilase (MIKOLAJCIK, 1964) e incubados à 37 °C por 48 horas, sendo as leituras realizadas com 24 e 48 horas de incubação. O resultado positivo é observado

após o meio púrpura ter-se tornado amarelo e neutralizado novamente para a coloração púrpura (Figura 6).



**Figura 6.** Hidrólise da arginina nos tempos 0, 24 e 48 horas.

#### **4.4.2 Crescimento a 4 e 6,5% de NaCl**

A avaliação do crescimento em meio com diferentes concentrações de NaCl foi realizada ajustando-se a concentração no caldo Tryptic Soy Broth (TSB) pela adição de NaCl anidro e de 0,002g/100mL do indicador púrpura de bromocresol. Os meios foram preparados por ingredientes contendo 4 % e 6,5 % de NaCl. Após homogeneização, 3 mL de caldo com cada concentração foram transferidos para tubos de ensaio esterilizados. Em cada tubo foi inoculado 30  $\mu$ L de cultura ativa e incubados à 37 °C por 24 à 48 horas. Para resultado positivo, foi considerado a viragem do meio de coloração púrpura para amarela.

#### **4.4.3 Crescimento à 10 e 45 °C**

A avaliação dos isolados foi feito utilizando Caldo BHI (Difco®, USA) modificado pela presença de 0,002g/100mL do indicador púrpura de bromocresol. Após ativação, inoculou-se 30  $\mu$ L de cultura ativa em tubos contendo 3 mL de caldo. A incubação prosseguiu-se à 45 °C por 24 à 48 horas e à 10 °C por 7 dias. Para

resultado positivo, foi considerado a viragem do meio de coloração púrpura para amarela.

#### **4.4.4 Crescimento em meio com ajuste para pH 9,6**

O crescimento em meio com ajuste do para pH 9,6 foi feito ajustando-se o pH do meio TSB utilizando-se solução de NaOH 0,1N esterilizado de maneira asséptica após a esterilização do meio, modificado pela adição de 0,002g/100mL de púrpura de bromocresol. Em cada tubo esterilizado contendo 3 mL de caldo foi inoculado 30 µL de cultura ativa e incubando-se à 37 °C por 24 à 48 horas. Para resultado positivo, foi considerado a viragem do meio de coloração púrpura para amarela.

#### **4.4.5 Teste Bile Esculina**

Os isolados foram transferidos utilizando (alça de platina) para tubos contendo 3 mL de agar inclinado Bile Esculina (ANVISA, 2004) inoculando-se em superfície. Posteriormente, os tubos foram incubados à 37 °C por 24-48 horas. Para resultado positivo, foi considerado a formação de pigmento escuro no meio (Figura 7).



**Figura 7** - Teste de Bile Esculina.

#### **4.5 Atividade acidificante**

A capacidade de acidificação foi verificada com a inoculação de 1,0 % de cada cultura ativa em 100 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10 % estéril. O pH foi

mensurado utilizando-se pHmetro (PG1400, GEHAKA, USA) no tempo 0 e depois de 6, 16 e 24 horas de incubação à 37 °C (PSONI et al, 2006). Foram realizadas duas repetições com duplicata, sendo consideradas as médias dos resultados.

#### **4.6 Caracterização fenotípica utilizando o kit API® 20 STREP**

Para a verificação do perfil de fermentação e produção de enzimas, utilizou-se o kit API® 20 STREP (BioMerieux® S.A, Marcy L' Etoile, França), seguindo-se recomendações do fabricante. As bactérias ativas foram estriadas em ágar BHI (Difco®, USA) e incubadas a 37 °C por 48 horas, ou até a formação de colônias visíveis. Em seguida, as colônias foram repassadas para uma ampola de API Suspension Medium (2 mL) até que fosse atingida uma densidade superior a 4 pela escala de McFarland. Essa solução foi utilizada nos testes Voges Proskauer (VP) para a produção de acetona; Hidrólise do ácido hipúrico (HIP); hidrólise da esculina (ESC); Pyrrolidoniil Arilamidase (PYRA);  $\alpha$ -Galactosidase ( $\alpha$ GAL);  $\beta$ -Glucuronidase ( $\beta$ GIU);  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ GAL); Fosfato alcalina (PAL); Leucina amino peptidase (LAP); Arginina Dihidrolase (ADH). Em seguida, foi transferido 0,5 mL da solução anterior para uma ampola API GP Medium e distribuído entre as 10 cúpulas para os testes de Ribose (RIB); Arabinose (ARA); Manitol (MAN); Sorbital (SOR); Lactose (LAC); Trealose (TER); Inulina (INU); Rafinose (RAF); Amido (AMD); Glicogênio (GLYG). Óleo de parafina foi adicionado nas cúpulas para os testes de fermentação. A incubação foi feita à 36 °C em aerobiose e as leituras foram feitas entre 4 à 24h.

#### **4.7 Reação da Polimerase em Cadeia**

Para a identificação de gênero foi utilizado o par de *primers* específicos para o gene *tuf* descrito por Nandakumar et al, (2007) e para a identificação de três espécies (*E. durans*, *E. faecalis* e *E. faecium*), os *primers* descritos por Jackson et al (2004) para o gene *sodA* como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Primer para identificação do gênero e espécies de *Enterococcus*

Primers (5' – 3')	Gene alvo	Tamanho (pb)	Identificação de:
DU1 - CCTACTGATATTAAGACAGCG DU2 - TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	<i>sodA</i>	295 pb	<i>E. durans</i> ATCC 19432
FL1 - ACTTATGTGACTAACTTAACC FL2 T - AATGGTGAATCTTGTTTGG	<i>sodA</i>	360 pb	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433
FM1 - GAAAAACAATAGAAGAATTAT FM2 - TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	<i>sodA</i>	215 pb	<i>E. faecium</i> ATCC19434
Ent1- TACTGACAAACCATTTCATGATG Ent2- AACTTCGTCACCAACGCGAAC	<i>tuf</i>	112 pb	Gene <i>tuf</i> (gênero)

Como controles positivos, foram utilizadas as estirpes de referência *E. faecalis* ATCC 19433, *E. durans* ATCC 6056 e *E. faecium* ATCC 6569, obtidas por meio de doação da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde (INCQS), Rio de Janeiro.

#### 4.7.1 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi feita de acordo com a metodologia descrita por ROSEC e GIGAUD (2002) com modificações. A cultura foi crescida em 3mL de caldo BHI a 35 °C/ 18 à 24h. Retirou-se uma alíquota de 1mL da cultura pura que foi centrifugada 12.000 x g/ 10 min (Micromax, IEC, MA, USA). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) e centrifugado por 10 minutos. As células bacterianas foram suspensas com 200µL de tampão TE acrescido de 15 µL de lysostafina (L7386-5MG, Sigma, Aldrich, USA) (1mg/mL) , seguindo-se de agitação vortex e incubação por 30 minutos a 37 °C. Após essa etapa adicionou-se 10µL de proteinase K (P6556, 10mg, Sigma, Aldrich, USA) (20mg / mL), seguindo-se de agitação e incubação a 60 °C / 20 min. Após a incubação, a suspensão foi aquecida a 100 °C / 10 min. Em seguida, foi centrifugado a 12.000 x g/ 2 min e o sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf identificado e estocado a -20 °C.

##### 4.7.1.1 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada no espectrofotômetro (NanoDrop® 1000m, USA) no laboratório de Genética Molecular (CNPGL, EMBRAPA, Juiz de Fora, MG), , utilizando-se 1 µL da solução de DNA. Após a quantificação do DNA, a solução foi

padronizada para cerca de 100ng/100ml de DNA. Essa solução padronizada foi utilizada para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

#### 4.7.2 Reação da PCR

A composição da reação (mix) PCR está descrita na tabela 3.

**Tabela 3.** Composição do mix utilizado na PCR para identificação do gênero *Enterococcus*.

Reagentes	Quantidades
Tampão (Phoneutria), 10X	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (Phoneutria), 50 mM	1,5 µL
dNTPs (10 mM, Sigma)	1 µL
Ent1 (Promega), 20 pmol	1 µL
Ent2 (Promega), 20 pmol	1 µL
Taq polimerase (Phoneutria)	0,3 µL
DNA (100ng/mL)	3 µL
H <sub>2</sub> O MiliQ	37,2 µL
<b>Total</b>	<b>50 µL</b>

Foram feitas PCR Multiplex, no qual avaliou em uma mesma reação a identificação do gênero e para a espécie. Para esta reação acrescentou-se mais 1µL de cada primer específico para a espécie (Tabela 3), com redução de 2µL no volume de água MiliQ utilizada, mantendo um volume final de 50 µL por reação. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) programado para um ciclo inicial a 94 °C/5 min, seguido de 30 ciclos (amplificação a 94°C/1 min - anelacão a 55°C/1 min - extensão a 72°C/1 min), e extensão final à 72°C/5 min.

#### 4.7.3 Separação e visualização dos produtos amplificados

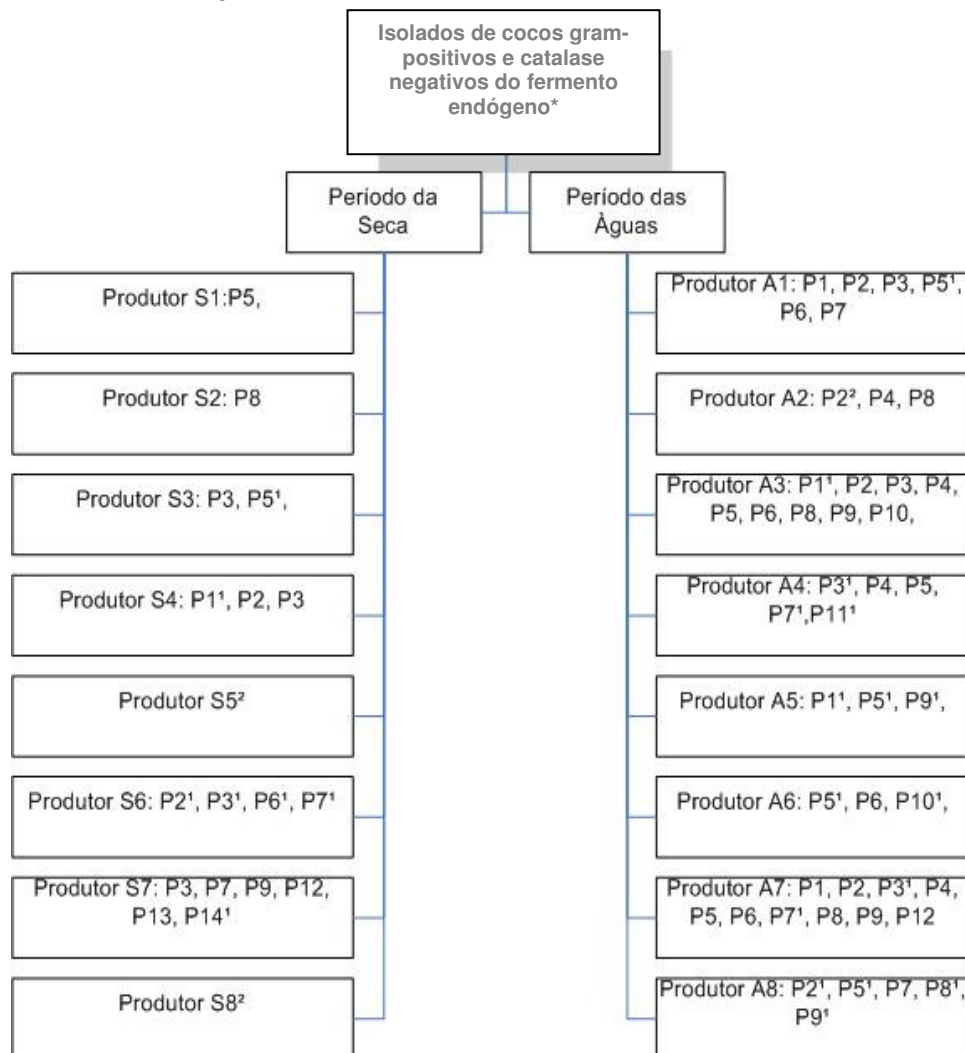
A separação dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese (Power Pac 3000, BioRad, USA) em gel de agarose a 2 %. Após o término da amplificação foram adicionados 5µL da solução Azul de Bromofenol a cada tubo e a seguir, 15µL desta solução foi utilizada para a corrida de eletroforese juntamente com o marcador (DNA marker D – 100 a 2000pb – BioBasic, CAN). O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts por 60 min. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta Eagle Eye® II (Stratagene).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização fenotípica

Entre os 106 microrganismos isolados (Figura 4) submetidos aos testes de coloração de Gram e teste de catalase, 27 foram descartados por motivo de dificuldade de crescimento nos meios modificados para os testes e KF e pureza. Desta forma, esta pesquisa foi conduzida com 79 isolados que foram agrupados de acordo com suas características fenotípicas.

A origem dos 79 isolados selecionados por coloração de Gram e catalase estão apresentados na Figura 8.



\* Utilizado como fermento na produção de queijo artesanal.

<sup>1</sup> Foram selecionadas duas colônias na mesma placa.

<sup>2</sup> Após avaliação da coloração de Gram e catalase não foram selecionados isolados deste produtor.

**Figura 8.** Origem dos isolados dos fermentos endógenos utilizados na produção de queijo Minas artesanal provenientes de oito unidades produtoras da região de Medeiros, Serra da Canastra, Minas Gerais.

Cada produtor de queijo foi identificado por seu número e período no qual o pingo foi coletado. O período da seca foi representado pela letra “S”, o período das águas pela letra “A”. A letra “P” seguido de um número representa o isolado obtido do pingo de cada respectivo produtor.

Foram obtidos 60 isolados no período das águas e 19 no período das secas (Figura 8). Estes valores resultaram do somatório da raiz quadrada do número de colônias obtidas da placa de KF de cada produtor, nos períodos avaliados. Observam-se maior número de isolados no período das águas. Nesta época do ano, as condições climáticas de altas temperaturas associadas à umidade excessiva favorecem o crescimento dos microrganismos, incluindo bactérias do grupo dos coliformes. Neste período, de forma empírica, os produtores tendem a aumentar a concentração de sal no momento da salga, o que para eles, contribuem para garantir um produto final de melhor qualidade. O aumento da concentração de sal permite reduzir o crescimento de coliformes, que em função da produção de gás, provoca o estufamento precoce dos queijos. Devido a esse processo, além de evitar o crescimento desta microbiota, favorece o crescimento daqueles que toleram altas concentrações de sal, como *Enterococcus*. Esse fato pode justificar a obtenção de um número maior de isolados no período das águas.

Os isolados foram agrupados de acordo com o perfil fenotípico em 15 grupos distintos (Tabela 4). Entre os 79 isolados avaliados, observou-se ampla variação no perfil fenotípico. Considerando-se os critérios estabelecidos pela maioria dos autores como característico do gênero *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*), apenas quatro isolados seriam classificados como típicos por apresentarem características fenotípicas semelhantes às espécies *tipo*, sendo os demais considerados atípicos por apresentarem características fenotípicas diversas.

**Tabela 4.** Agrupamento dos isolados obtidos do fermento endógeno utilizado na fabricação de queijo Canastra da região de Medeiros, MG, de acordo com avaliação fenotípica presuntiva.

Grupos e espécies tipo	ARG	4%	6,5%	10°C	45 °C	BE	pH 9,6	Total de Isolados com mesmo perfil
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	4
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	4
1	+	+	+	+	+	+	+	4
2	-	+	+	+	+	+	+	22
3	+	+	-	+	+	+	+	1
4	-	+	+	-	+	+	+	21
5	-	+	+	+	-	+	+	3
6	-	+	-	+	+	+	+	1
7	+	+	+	-	-	+	+	5
8	-	-	-	+	+	+	+	2
9	-	+	-	-	+	+	+	2
10	+	-	-	-	+	+	+	4
11	-	+	+	-	-	+	+	2
12	-	-	-	-	+	+	+	5
13	-	+	+	+	+	-	+	5
14	-	+	-	+	+	-	+	1
15	-	+	-	-	+	-	+	1
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>68</b>	<b>62</b>	<b>39</b>	<b>69</b>	<b>72</b>	<b>79</b>	<b>79</b>

A avaliação da capacidade de hidrolisar a arginina auxilia na classificação dos *Enterococcus* spp. em relação a outros cocos Gram-positivos e catalase negativa. *E. faecalis* e *E. faecium*, espécies tipo, conseguem utilizar a arginina como fonte de carbono (DEVRIESE et al, 1986). Inicialmente, o microrganismo degrada a glicose, convertendo-a em ácido láctico, o que leva a alteração da coloração púrpura para amarelo. Entretanto, se o microrganismo hidrolisar a arginina pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador de amarelo para coloração púrpura, o que indica reação positiva.

Apenas 17,72 % (n=79) dos isolados avaliados hidrolisaram a arginina. Esta baixa positividade também foi observada por Cavalcante et al (2003) ao caracterizarem cocos Gram-positivos catalase negativa oriundos de leite cru da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, no qual apenas nove isolados (n=30) hidrolisaram a arginina. Esse teste, complementa a identificação desse gênero, no qual permite eliminar as espécies que não seguem o fenótipo das estirpes tipo que apresentam esta enzima.

A capacidade de crescimento em meio com 6,5 % de sal é uma das principais características deste gênero. Nóbrega (2007) relatou que a concentração de NaCl e

baixos pH atuam como agentes moduladores da microbiota no fermento endógeno, considerando que restringem o crescimento de coliformes e da própria microbiota láctica, o que permite selecionar os organismos mais adaptados a esse ambiente com menor atividade de água ( $a_w$ ). Essa  $a_w$  reduz durante o período de maturação, o que restringe o crescimento da microbiota láctica, selecionando aqueles mais adaptados a esta condição ambiental, o que explica a presença dos *Enterococcus* em queijos maturados ao longo do processo de maturação.

Entre os isolados, 78,48 % (62) cresceram a uma concentração de 6,5 % de NaCl e 86,07 % (68) a 4 % de NaCl. Onze isolados não cresceram em nenhuma das concentrações avaliadas. Os resultados demonstraram que os isolados em sua maioria, crescem na presença de 6,5 % de NaCl. Swan (1954) ao avaliar 64 isolados de *Enterococcus* provenientes de queijos obtiveram 97 % de isolados capazes de crescer à 6,5 % de NaCl.

De acordo com Berguey's Manual (1994) o crescimento em meio com 6,5 % de NaCl é uma característica fundamental para a identificação do gênero. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, os principais representantes deste gênero, toleram altas concentrações de sal.

Entretanto, espécies como *Enterococcus avium*, *Enterococcus cecorum* e *Enterococcus columbae* não crescem a 6,5 % de NaCl (DEVRIESE et al, 1993), assim como espécies recentemente isoladas: *Enterococcus camelliae* (SUKONTASING et al, 2007), *Enterococcus asini* (VAUX et al, 1998) e *Enterococcus italicus* (FORTINA et al, 2004). Isto indica que apesar das estirpes referências como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* serem resistente a altas concentrações de sal, não se deve excluir a possibilidade de isolados obtidos de fontes endógenas não apresentarem esta característica.

A capacidade de crescimento em altas concentrações de sal garante que os *Enterococcus* sejam isolados de alimentos como queijos frescos ou maturados, carnes secas e embutidos, sobrepujando outros gêneros, contribuindo para as características sensoriais do produto final. Além disso, é um critério utilizado para a diferenciação deste gênero com as espécies pertencentes aos *Streptococcus* ssp.

Outra característica utilizada para caracterizar este gênero é o crescimento a 10 °C e a 45 °C (GIRAFFA, 2003). Em geral, *E. faecalis* e *E. faecium* apresentam crescimentos nessas temperaturas. Entre os isolados avaliados 46,75 % apresentaram crescimento à 10 e a 45 °C; 87,34 % cresceram à 45 °C e 50,64 % cresceram quando incubados à 10 °C. Entretanto, espécies como *E. dispar* e *E. sulfureus* não crescem a 45 °C e *E. cecorum* e *E. columbae* não apresentam crescimento à 10 °C (DEVRIESE, et al, 1993).

A temperatura tem uma grande influência sobre o crescimento dos microrganismos, considerando as reações que ocorrem durante o crescimento são, em sua maioria, enzimáticas (PELCZAR, 1996). A capacidade de um microrganismo crescer em condições extremas torna-o mais favorecido quando presente em uma microbiota composta por diferentes gêneros, tornando-o predominante nesta microbiota.

Outro fator que interfere no crescimento microbiano é o pH. Em geral, cada espécie apresenta um pH ideal para o seu desenvolvimento. Entretanto, os microrganismos tendem a apresentar melhor crescimento quando presentes em meios com pH próximo a neutralidade (PELCZAR, 1996). Entre os isolados avaliados 100 % apresentaram crescimento em pH 9.6. Essa característica, portanto, sugere ser compartilhada por todas as espécies deste gênero. Franzetti et al (2004) ao avaliarem características fenotípicas e genotípicas de *Enterococcus* spp. de diferentes origens como queijos, leite cru, fezes de crianças e farinha de trigo observaram resultados semelhante ao obtida na presente pesquisa.

O teste de Bile Esculina (BE) é descrito como um meio de isolamento de referência para a identificação do gênero *Enterococcus* (ANVISA, 2004). Vários autores (FORTIN et al, 2003; CAMARGO, 2005) utilizaram este meio, não apenas como um teste presuntivo para a identificação deste gênero, mas também como meio seletivo para o isolamento. Para reação positiva foi observada a formação de pigmento preto, resultado da capacidade de hidrolisar a esculina formando glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos em função da presença do citrato férrico, o que resulta na formação de um complexo negro (ANVISA, 2004).

De acordo com o DEVRIESE et al (1993) todas as espécies de *Enterococcus* são capazes de hidrolisar a esculina e crescer na presença de 40% de sais biliares. Entre os isolados avaliados, 72 apresentou reação positiva, o que corresponde a 91,13 % (n=79).

Os resultados demonstraram uma diversidade fenotípica entre os isolados avaliados. Isso sugere que o período no qual foram isolados, assim como o produtor, influenciam nas características bioquímicas apresentadas pelos microrganismos. A Tabela 5 apresenta a relação dos isolados, com seus respectivos códigos de origem.

**Tabela 5.** Relação dos códigos atuais para nomenclatura dos isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação de queijo Canastra da região de Medeiros, MG, identificados presuntivamente como *Enterococcus* spp.

Numeração	Código de origem	Numeração	Código de origem
1	S1P5	41	A4P3.1
2	S3P3	42	A4P3.2
3	S3P5.1	43	A4P4
4	S3P5.2	44	A4P7
5	S4P1.1	45	A4P5
6	S4P1.2	46	A5P1.1
7	S4P2	47	A5P1.2
8	S4P3	48	A5P5.1
9	S6P2.1	49	A5P5.2
10	S6P2.2	50	A5P9.1
11	S6P3.1	51	A5P9.2
12	S6P3.2	52	A6P5.1
13	S6P6.1	53	A6P5.2
14	S6P6.2	54	A6P6
15	S6P7	55	A6P10.1
16	S7P7	56	A6P10.2
17	S7P9	57	A7P1
18	S7P14.1	58	A7P2
19	S7P14.2	59	A7P3.1
20	A1P1	60	A7P3.2
21	A1P2	61	A7P4
22	A1P3	62	A7P5
23	A1P5.1	63	A7P6
24	A1P5.2	64	A7P7.1
25	A1P6	65	A7P7.2
26	A1P7	66	A7P8
27	A2P2.1	67	A7P9
28	A2P2.2	68	A7P12
29	A3P1.1	69	A8P2.1
30	A3P1.2	70	A8P2.2
31	A2P4	71	A8P7
32	A2P8	72	A8P5.1
33	A3P2	73	A8P5.2
34	A3P3	74	A8P8.1
35	A3P4	75	A8P8.2
36	A3P5	76	A8P9.1
37	A3P6	77	A8P9.2
38	A3P8	78	A2P1
39	A3P9	79	A2P6
40	A3P10		

A = período das águas

S = período das secas

P = produtor

A partir desses resultados, quatro isolados pertencentes ao agrupamento 1 apresentaram características 100 % semelhantes com as estirpes *tipo*. Estes isolados foram obtidos no período das águas de três fermentos endógeno provenientes de três produtores diferentes. Os grupos 2 e 3 (23 isolados) apresentaram 85,71 % de semelhança com o gênero *Enterococcus*, de acordo com os testes realizados.

Os grupos 4, 5, 6 e 7 (28 isolados) e 8, 9, 10 e 11 (10 isolados) apresentaram, respectivamente, cerca de 71,42 % e 57,14 % de semelhança com o gênero *Enterococcus* spp. . Vale destacar que os isolados do grupo 10 foram todos obtidos no período da seca.

Os isolados do grupo 13, 14 e 15, apesar de se tratar de *Enterococcus* atípico, não apresentaram crescimento em agar Bile-Esculina, o que torna estes isolados mais distantes de pertencerem ao gênero *Enterococcus*. Já os isolados do grupo 12 apresentaram a menor porcentagem de semelhança com as espécies de referências para o gênero *E. faecium* e *E. faecalis* (42,85 %).

O agrupamento dos isolados dentro dos 15 perfis fenotípicos está apresentado na tabela 6.

**Tabela 6.** Agrupamento após os resultados fenotípicos dos isolados do fermento endógeno utilizado no queijo Canastra da região de Medeiros, MG.

Grupos	Isolados
1	A5P9.1, A7P7.1, A7P6, A8P9.1 / -
2	A1P1, A1P5.1 , A1P7; A2P2.1; A2P4; A2P2.2, A3P1.1, A3P1.2,A4P5, A5P5.1; A6P6; A6P10.2, A8P2.2; A7P1, A7P2, A7P3.1, A7P7.2, A7P9; A7P12, A8P5.2, A8P8.1 / S4P1.1
3	A7P5 / -
4	A1P2; A1P6, A1P3, A2P1;A2P6, A3P2; A3P4, A3P10, A4P3.1, A4P3.2, A4P4, A4P7, A5P1.1, A6P5; A7P3.2 / S1P5, S3P5.1,, S4P1.2; S4P3, S6P3.1
5	A3P3, A3P8 A7P8 / -
6	A1P5.2; A6P10.1, A8P7, A8P9.2 / S6P6.2,
7	A2P8 / -
8	A5P5.2 / S6P3.2,
9	- / S6P6.2; S7P14.1
10	- / S4P2, S6P2.1, S6P2.2,S7P7
11	A3P6, A3P9 / -
12	S3P3, S6P7, S7P9 / A5P1.2; A6P5.2
13	A3P5, A8P2.1, A8P5.1, A8P8.2 / . S7P14.
14	A7P4
15	A5P9.2

A = período das águas

S = período das secas

P = produtor

Os isolados com maior semelhança fenotípica com as estirpes *tipo Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) são originados principalmente do períodos das águas. Os isolados de origem do período da seca estão dispostos nos grupos 4, 6, 12, sendo os grupos 8, 9 e 10 compostos somente de isolados desse período. Os isolados do produtor 7 foi entre os demais que apresentou maior número de colônias fenotipicamente semelhantes ao gênero *Enterococcus*.

Estes resultados demonstraram uma diversidade quanto ao perfil fenotípico dos isolados avaliados. Entretanto, a maioria não apresentou o perfil esperado para o

gênero. Entretanto, por se tratar de isolamento a partir de uma microbiota endógena, deve-se considerar a possibilidade de identificação de novas espécies.

### 5.1.1 Seleção dos isolados

Após a realização dos testes presuntivos, foram selecionados 45 isolados, mantendo-se pelo menos um representante de cada grupo. A maior frequência de isolados nos grupos 2 e 4 deve-se ao fato destes isolados apresentarem maior grau de semelhança com as características típicas já citadas para o gênero *Enterococcus* spp. (Tabela 7).

**Tabela 7.** Seleção após os resultados fenotípicos dos isolados do fermento endógeno utilizado no queijo Canastra da região de Medeiros, MG.

Grupos	Isolados
1	A5P9.1, A7P6, A7P7.1, A8P9.1
2	A4P5; A2P2.1; A1P7; A2P4; A2P2.2; A3P1.1; A8P2.2; A7P7.2; A7P2; A6P6; A5P5.1
3	A7P5
4	A1P2; A6P5; A4P7; A1P3; A3P2; A1P6; S4P3; S3P5.1; S4P1.2; S6P3.1; A5P1.1; A4P3.2; A2P1; A2P6
5	A3P8
6	A1P5.2; A6P10.1
7	A2P8
8	S6P3.2
9	S6P6.2; S7P14.1
10	S4P2
11	A3P6
12	A5P1.2; A6P5.2
13	S7P14.2; A3P5
14	A7P4
15	A5P9.2

A = período das águas

S = período das secas

P = produtor

Verificou-se uma média de cinco isolados por produtor, sendo o produtor 7 com um maior número de isolados para avaliação (8 isolados) e o produtor 8 com apenas dois isolados. O grupo 2 possui pelo menos um isolado de cada produtor, sendo todos obtidos do período das águas. Este grupo apresentou 85,71 % de semelhança com as espécies referências. Os isolados do produtor 8 encontra-se nos grupos 1 e grupo 2.

De acordo com a período de isolamento, somente 9 foram selecionados no período da seca, sendo o restante (36 isolados) obtidos no período das águas. Isto sugere uma maior diversidade no período das águas, sendo justificado pelos fatores climáticos característicos desta época do ano.

### 5.1.2 Capacidade acidificante

Os resultados obtidos pela avaliação do potencial acidificante em leite estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10.

**Tabela 8.** Diferença de pH em relação ao tempo 0 dos 45 isolados crescidos em leite desnatado reconstituído 10 % (LDR 10 %) esterilizado, após 6 horas de incubação.

FAIXA DE VARIAÇÃO DE pH	QUANTIDADE DE ISOLADOS
0,02 – 0,04	2
0,0041 – 0,06	8
0,061 – 0,08	4
0,081 – 0,1	4
0,11 – 0,14	27
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>

**Tabela 9.** Diferença de pH em relação ao tempo 0 dos 45 isolados crescidos em leite desnatado reconstituído 10 % (LDR 10 %) esterilizado, após 6 horas de incubação.

FAIXA DE VARIAÇÃO DE pH	QUANTIDADE DE ISOLADOS
0,1 – 0,3	16
0,31 – 0,6	26
0,61 – 0,9	3
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>

**Tabela 10.** Diferença de pH em relação ao tempo 0 dos 45 isolados crescidos em leite desnatado reconstituído 10 % (LDR 10 %) esterilizado, após 6 horas de incubação.

FAIXA DE VARIAÇÃO DE pH	QUANTIDADE DE ISOLADOS
0,1 – 0,3	3
0,31 – 0,5	4
0,51 – 0,7	11
0,71 – 0,9	22
0,9 – 1,2	5
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>

A produção de ácido por microrganismos que compõem fermentos industriais ou fermentos naturais é de extrema importância em produtos lácteos fermentados, pois a rápida redução de pH inibe o crescimento de culturas contaminantes, além de favorecer a coagulação.

Considerando-se que o pH inicial do leite variou entre 6,37 e 6,46 nenhum dos 45 isolados reduziu o pH abaixo de 6,0 (0,14 à 0,02 unidades) após 6 h de incubação. Após 16 h, o isolado A3P5 foi o que mais reduziu o pH (0,62 unidades). Em 24 h, a maior redução foi de 1,04 (S3P5.1) e menor 0,19 (isolado A8P9.1). Os grupos 2 e 4

concentraram um número maior de isolados que conseguiram reduzir o pH inicial do leite em 0,8 a 0,9 unidades.

De acordo com a Tabela 8, 27 isolados apresentaram uma redução na faixa de 0,11 a 0,14 unidades. *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* são utilizadas como culturas produtoras de ácidos, pois apresentam alta capacidade de acidificação, reduzindo o pH para 4,6 em até 6 horas e atingem o ponto isoelétrico das proteínas, ocorrendo a coagulação. Este resultado indica uma baixa atividade acidificante dos microrganismos avaliados..

Após 16 horas a faixa de 0,31 a 0,6 de variação do pH inicial concentrou cerca de 57,77 % dos isolados avaliados. Apenas três foram capazes de reduzir o pH entre 0,61 a 0,9. Em 24 horas, a maior redução foi observada em cinco isolados classificados na faixa entre 0,9 a 1,2. Cerca de 48,88 % do total dos isolados apresentaram redução entre 0,71 a 0,9 unidades

VILLANI e COPPOLA (1994) ao examinarem a capacidade acidificante de estirpes de *E. faecium* e *E. faecalis*, inoculada em leite por 6h a 37°C observaram baixa redução de pH, variando o pH do leite entre 0.4 a 0.8 do pH inicial.

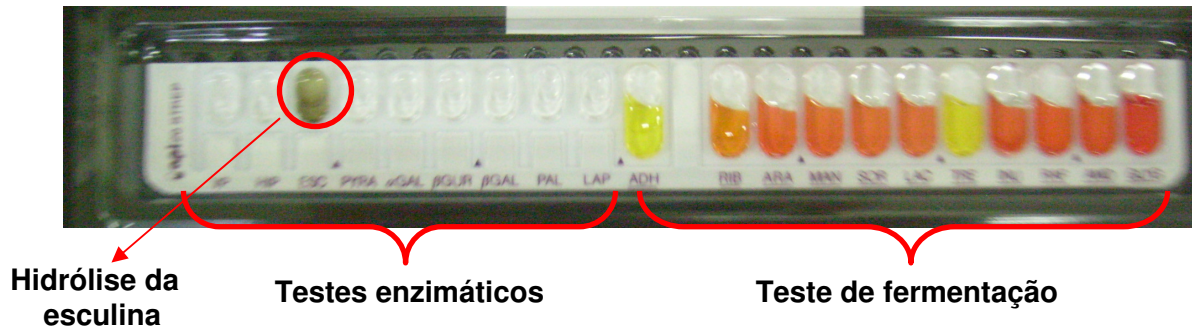
Estes resultados são semelhantes ao encontrados por Sarantinopoulos et al (2001) que avaliaram 129 isolados de *Enterococcus*, provenientes de produtos lácteos, animal e humanos quanto à capacidade de produção de ácidos. Esses autores concluíram a baixa capacidade destes isolados em produzir ácido quando crescido em leite.

A capacidade de acidificação é uma boa característica no auxílio para diferenciação dos *Enterococcus* de outros cocos Gram-positivos, catalase negativas, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis subs. Lactis*, visto que os gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* produzem ácido de forma mais rápida.

Os resultados confirmaram que os isolados identificados presuntivamente como *Enterococcus* não são bons acidificantes, corroborando sua utilização como cultura maturadora, no qual contribui para à formação de flavour e textura de queijos.

### 5.3 Caracterização fenotípica pelo kit API 20 STREP®

O kit API 20 STREP® é composto por provas bioquímicas enzimáticas e fermentação de açúcares. O kit é composto por 20 galerias no qual se observa o perfil de fermentação de açúcares e a capacidade de produção de algumas enzimas (Figura 9 e 10).



**Figura 9.** Galeria do Kit API 20 STREP® antes da adição dos reagentes na 1ª parte da galeria



**Figura 10.** Galeria do Kit API 20 STREP® após a adição dos reagentes na 1ª parte da galeria

Após a seleção dos isolados baseando-se nos resultados apresentados nos testes utilizando-se da metodologia clássica, foi analisado o perfil fenotípico dos 45 isolados pelo kit API 20 STREP®. Os resultados positivos e negativos estão expressos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados do API 20 STREP® dos 45 isolados obtidos do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra, MG.

Isolados	VP	HIP	ESC	PYRA	$\alpha$ GAL	$\beta$ GUR	$\beta$ GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
S3P5.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
S4P2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
S4P1.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S6P6.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
S4P3	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S6P3.1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
S6P3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
S7P14.1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
S7P14.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A1P2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A1P3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A1P5.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
A1P6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
A1P7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
A2P2.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A2P2.2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A3P1.1	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A2P4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A2P8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A3P2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A3P5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A3P6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
A3P8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
A4P3.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A4P7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A4P5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
A5P1.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A5P1.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-

VP – Voges Proskauer (produção de acetona); HIP – Hidrólise (ácido hipúrico); ESC- Hidrólise esculina; PYRA- Pyrrolidonil Arilamidase;  $\alpha$ GAL-  $\alpha$ -Galactosidase;  $\beta$ -Giucuronidase;  $\beta$ -Galactosidase; PAL- Fosfato alcalina; LAP- Leucina amino peptidase; ADH - Arginina Dihidrolase; RIB- Ribose; ARA- Arabinose; MAN - Manitol; SOR - Sorbitol; LAC - Lactose; TRE -Trealose; INU - Inulina; RAF - Rafinose; AMD - Amido; GLYG - Glicogênio.

A = período das águas      S = período das secas      P = produtor

Isolados	VP	HIP	ESC	PYRA	$\alpha$ GAL	$\beta$ GUR	$\beta$ GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
A5P5.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A5P9.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A5P9.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
A6P5.1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
A6P5.2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A6P6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
A6P10.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
A6P10.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A7P4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
A7P5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
A7P6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A7P7.1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
A7P7.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
A8P2.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
A8P9.1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A2P1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
A2P6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-

VP – Voges Proskauer (produção de acetona); HIP – Hidrólise (ácido hipúrico); ESC- Hidrólise esculina; PYRA- Pyrrolidonil Arilamidase;  $\alpha$ GAL-  $\alpha$ -Galactosidase;  $\beta$ -Giucuronidase;  $\beta$ -Galactosidase; PAL- Fosfato alcalina; LAP- Leucina amino peptidase; ADH - Arginina Dihidrolase; RIB- Ribose; ARA- Arabinose; MAN - Manitol; SOR - Sorbitol; LAC - Lactose; TRE -Trealose; INU - Inulina; RAF - Rafinose; AMD - Amido; GLYG - Glicogênio.

A = período das águas      S = período das secas      P = produtor

Para o teste de Voges Proskauer (VP), no qual é observado a capacidade de produção de acetona e o teste de hidrólise do ácido hipúrico (HIP), cerca de 97,43 % dos isolados apresentaram resultados positivos para estes testes. Outro teste que apresentou grande porcentagem na positividade foi a capacidade de hidrolisar a esculina (ESC) pela presença da enzima  $\beta$ -glucosidase, no qual observou-se essa capacidade em 92,30 % dos isolados.

Nos testes que verificam a presença de enzimas como Pyrrolidonil Arilamidase (PYRA),  $\alpha$ -Galactosidase ( $\alpha$ GAL),  $\beta$ -Glucuronidase ( $\beta$ GUR),  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ GAL), Fosfato Alcalina (PAL), Leucina AminoPeptidase (LAP), Arginina Dihidrolase (ADH) apenas 25,64 % foram considerados positivos em ao menos um dos testes citados. Não foi observada a capacidade de hidrolisar L-arginina (ADH) nos isolados avaliados.

Foi observado um alto índice de fermentação para os açúcares TRE (100 %) RIB (97,43 %) , MAN (95,55 %) e LAC (82,22 %). Para os teste de inulina (INU), D-rafinoose (RAF), amido (AMD) e glicogênio (GLYG), apenas 38,46 % fermentaram pelo menos um dos açúcares citados. A fermentação da ribose é característica deste gênero. Estes resultados corroboram a identificação presuntiva para o gênero *Enterococcus*.

O resultado obtido com a identificação dos isolados pelo kit API 20STREP<sup>®</sup>, estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 12.** Espécies de *Enterococcus* isoladas do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra identificadas através do kit API 20STREP®.

Isolados	Espécie	% de acerto	Classificação
S3P5.1	<i>Aerococcus viridans</i>	97.2 %	Muito boa identificação
S4P2	<i>Aerococcus viridans</i>	99.9 %	Excelente identificação
S4P1.2	<i>Aerococcus spp.</i>	60.3 %	Aceitável para o gênero
S6P6.1	nd		
S4P3	<i>Enterococcus avium</i>	14.3 %	Fraca discriminação
S6P3.1	<i>Enterococcus avium</i>	24.4 %	Fraca discriminação
S6P3.2	<i>Aerococcus viridans 2</i>	79.3 %	Fraca discriminação
S7P14.1	nd		
S7P14.2	<i>Aerococcus spp.</i>	60.3 %	Aceitável para o gênero
A1P2	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A1P3	<i>Enterococcus avium</i>	25.0 %	Fraca discriminação
A1P5.2	<i>Enterococcus avium</i>	20.1 %	Fraca discriminação
A1P6	<i>Enterococcus avium</i>	20.1 %	Fraca discriminação
A1P7	<i>Enterococcus avium</i>	20.1 %	Fraca discriminação
A2P2.1	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A2P2.2	<i>Enterococcus avium</i>	99.0 %	Muito boa identificação
A3P1.1	<i>Aerococcus viridans 1</i>	95.3 %	Boa identificação
A2P4	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A2P8	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A3P2	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A3P5	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A3P6	<i>Aerococcus viridans</i>	97.2 %	Muito boa identificação
A3P8	<i>Enterococcus avium</i>	24.4 %	Fraca discriminação
A4P3.1	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A4P7	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A4P5	<i>Aerococcus viridans 2</i>	76.1 %	Boa identificação no gênero
A5P1.1	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A5P1.2	<i>Aerococcus viridans 1</i>	98.6 %	Boa identificação
A5P5.1	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A5P9.1	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A5P9.2	<i>Enterococcus avium</i>	36.5 %	Fraca discriminação
A6P5.1	<i>Aerococcus viridans</i>	98%	Boa identificação
A6P5.2	<i>Aerococcus viridans 1</i>	98.8 %	Boa identificação
A6P6	<i>Aerococcus viridans 1</i>	78.5 %	Muito boa identificação no gênero
A6P10.1	<i>Aerococcus viridans 3</i>	68.8 %	Boa identificação no gênero
A6P10.1	<i>Aerococcus viridans 3</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A7P4	<i>Enterococcus avium</i>	24.4 %	Fraca discriminação
A7P5	<i>Aerococcus viridans 3</i>	68.8 %	Boa identificação no gênero
A7P6	<i>Enterococcus avium</i>	46.5 %	Fraca discriminação
A7P7.1	<i>Aerococcus viridans 3</i>	98%	Boa identificação
A7P7.2	<i>Aerococcus viridans 1</i>	78.5 %	Muito boa identificação no gênero
A8P2.2	<i>Enterococcus avium</i>	4.2 %	Fraca discriminação
A8P9.1	<i>Enterococcus avium</i>	21.9 %	Fraca discriminação
A2P1	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero
A2P6	<i>Aerococcus viridans 2</i>	60.3 %	Identificação aceitável no gênero

A = período das águas S = período das secas P = produtor

Cerca de 48,71 % foram classificados como pertencentes ao gênero *Aerococcus* spp. sendo as espécies *A. viridans 1*, *A. viridans 2* e *A. viridans 3* frequentemente identificadas. *Enterococcus avium* foi identificado em 43,58 % dos

isolados avaliados. Porém, todas classificações para esta espécie foi dita como “fraca discriminação”. Testes como ADH, VP e PYRA separam este gênero dos *Enterococcus*. Os *Aerococcus* em sua maioria são VP, ADH e PYRA negativos; Já os *Enterococcus* apresentariam positividade para os três testes. Entre os resultados obtidos somente dois são PYRA positivos, nenhum ADH positivo e 44 positivos para o teste VP. *Enterococcus avium*, seria o único entre as espécies de *Enterococcus* identificadas ADH negativa. Dois isolados não foram identificados pelo kit.

Apenas nove isolados (S3P5.1, S4P1.2, A2P2.2, A3P1.1, A3P6, A5P1.2, A6P5.1, A6P5.5, A7P7.1) apresentaram acima de 90 % de acerto. O isolado S4P1.2 foi identificado com 99,9 % como *Aerococcus viridans* 1 e o isolado A2P2.2 foi classificado como *Enterococcus avium* com 99,0 % de acerto.

As bactérias identificadas por *Enterococcus avium* foram isoladas em sua maioria entre os produtores 1 e 2 no período das águas.

*Aerococcus* pertencentes ao grupo de bactérias lácticas, apresentam um perfil fenotípico muito semelhante ao gênero *Enterococcus*. Porém, diferem-se quanto ao arranjo morfológico: *Enterococcus* dispõe suas células em cocos isolados, em pares ou em cadeias; já espécies de *Aerococcus* apresentam-se em tétrades. Nas avaliações de coloração de Gram dessa pesquisa, não foi observada arranjo em tétrades entre os isolados avaliados.

Outro fator é a condição de isolamento: bactérias do gênero *Aerococcus* não são comumente isoladas de queijos e derivados lácteos, o que diverge ainda mais dos resultados obtidos. A frequência de *Enterococcus avium* em queijos também não é muito observada.

Devriese et al (1995) utilizaram metodologia clássica, Rapid ID32 STREP, o kit API 20STREP® e SDS PAGE para identificação de *Enterococcus* de alimentos de origem animal, no foram observadas divergências entre as metodologias avaliadas e correlação existente entre elas. Entre os 94 isolados identificados como *E. faecium* somente 71 foram corretamente identificados pelo kit API 20STREP® e 85 pela metodologia clássica. Estes resultados demonstraram a dificuldade de estabelecer-se uma relação entre diferentes metodologias.

O kit API 20STREP® foi desenvolvido para a identificação de bactérias de origem clínica. Entretanto, considerando a sua praticidade, tem sido utilizado para a identificação de microrganismos de diversas origens. Considerando que cada microrganismo reflete em sua fisiologia as condições ambientais as quais são submetidos, nesta pesquisa em que se utilizou este kit para a identificação de

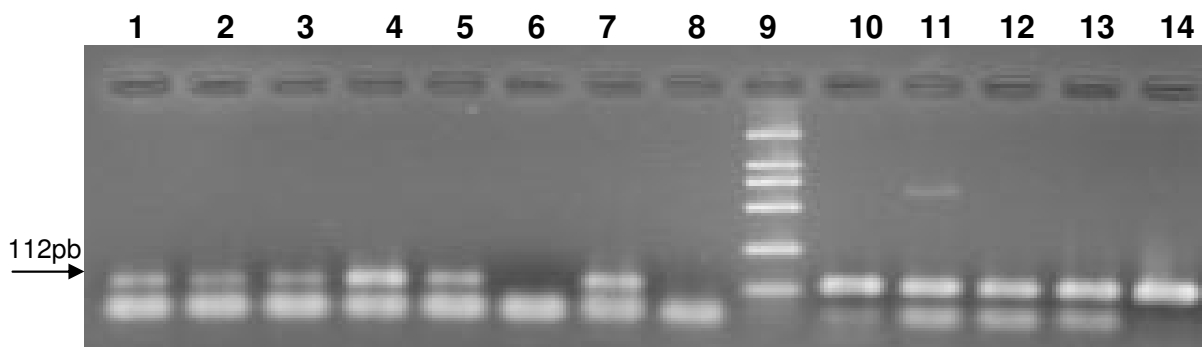
bactérias selvagens, oriundas de um habitat único, os resultados não foram satisfatórios para a identificação das bactérias avaliadas.

## 5.4 Caracterização genotípica

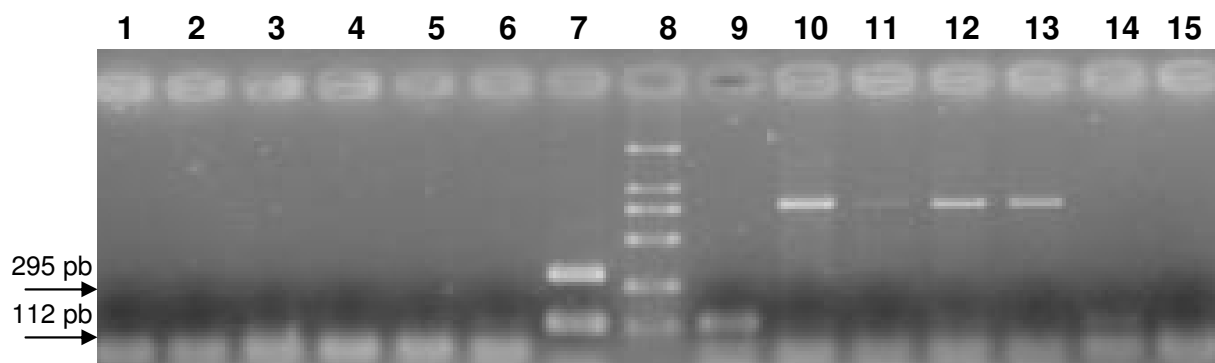
### 5.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto a presença do gene *tuf* por meio da técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR). Na seqüência, pesquisou-se a presença do gene *sodA* utilizando-se primers específicos para as espécies *E. faecalis*, *E. durans* e *E. faecium*.

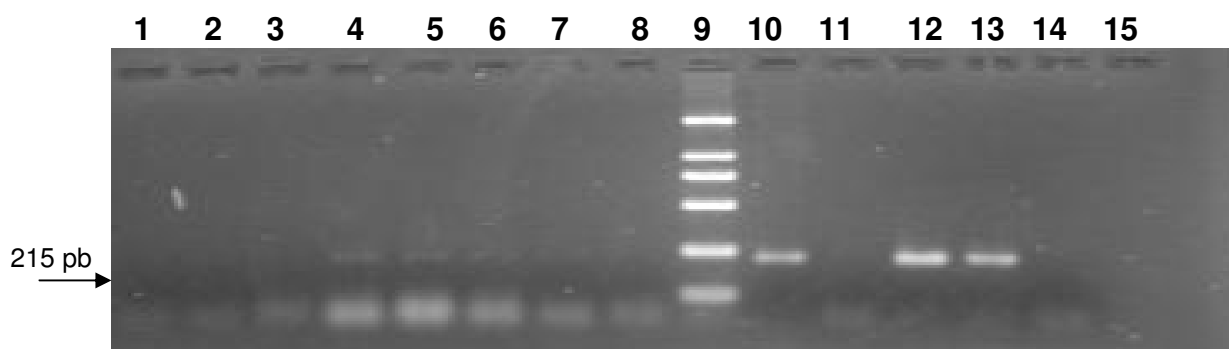
Para a identificação do gênero, foi usado um par de *primers* que gera um amplicon de 112 pares de bases (bp) do gene *tuf*. Vários autores (KE et al, 1999; NANDAKUMAR et al, 2007) recomendam este par de *primers* para identificação molecular do gênero *Enterococcus*. Os resultados estão apresentados nas figuras 11, 12, 13 e 14.



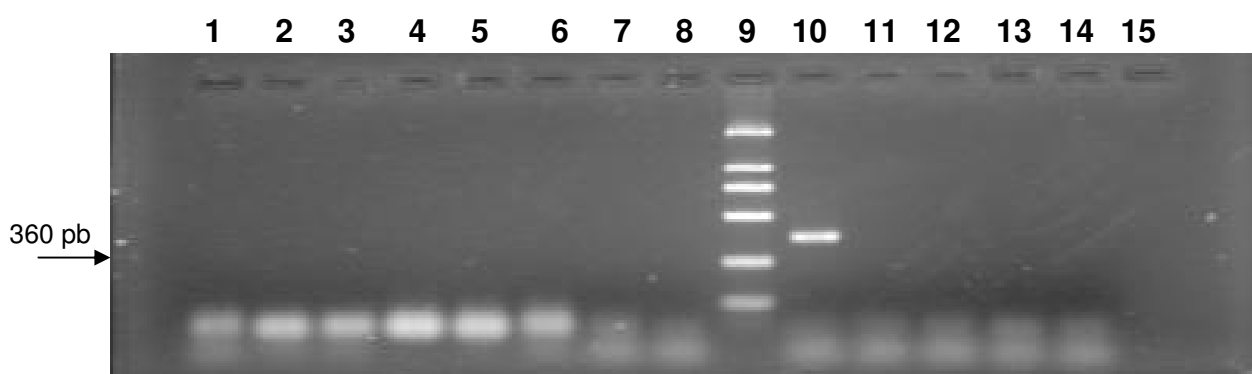
**Figura 11.** Foto ilustrativa do gel de agarose 2 % com os produtos da PCR Multiplex (112pb) para a identificação do gênero *Enterococcus* spp. 1) isolados A5P1.2; 2) S3P5.1; 3)A5P9.2; 4) A5P5.1; 5) A4P3.1; 6) A3P6; 7) A7P6; 8) controle negativo; 9) marcador 100pb; 10) controle positivo *E. faecium* ATCC 19434; 11) A8P2; 12) A6P5; 13)A2P6; 14) A2P1.



**Figura 12.** Foto ilustrativa do gel de agarose 2 % com os produtos da PCR Multiplex para a identificação da espécie *E. durans*: 1) isolados A5P1.2; 2) S3P5.1; 3) A5P9.2; 4) A5P5.1; 5) A4P3.1; 6) A7P6; 7) controle positivo *E. durans* ATCC 19434; 8) marcador 100pb; 9) A6P5.1; 10) A8P2.1; 11) S4P1.2; 12) A2P6; 13)A2P1; 14) A3P6; 15) Controle negativo.



**Figura 13.** Foto ilustrativa do gel de agarose 2 % com os produtos da PCR para a identificação da espécie *E. faecium*: 1) isolados A5P1.2; 2) S3P5.1; 3)A5P9.2; 4) A5P5.1; 5) A4P3.1; 6) A7P6; 7) A8P2.1; 8) A6P5.1; 9) marcador 100pb; 10) controle positivo *E. faecium* ATCC 19434; 11)S4P1.2; 12) A2P6; 13)A2P1; 14) A3P6; 15) Controle negativo.



**Figura 14.** Foto ilustrativa do gel de agarose 2 % com os produtos da PCR para a identificação da espécie *E. faecalis*: 1) isolados A5P1.2; 2) S3P5.1; 3)A5P9.2; 4) A5P5.1; 5) A4P3.1; 6) A7P6; 7) A8P2.1; 8) A6P5.1; 9) marcador 100pb; 10) controle positivo *E. faecium* ATCC 19434; 11)S4P1.2; 12) A2P6; 13)A2P1; 14) A3P6; 15) Controle negativo.

Entre os 45 isolados avaliados presuntivamente como pertencente ao gênero em estudo, 11 apresentaram *amplicons* de tamanho esperado de 112 pb (S3P5.1, S4P1.2, A4P3.1, A5P1.2, A5P5.1, A5P9.2, A6P5.1, A7P6, A8P2.1, A2P1 e A2P6) para o gene *tuf* (Figura 11). Nove desses microrganismos foram isolados do período das águas, sendo três do fermento utilizado pelo produtor 5, dois do produtor 2 e um dos produtores 4, 6, 7 e 8. Esses resultados sugerem que a biodiversidade entre os próprios produtores, que apesar de utilizarem da mesma tecnologia de fabricação do queijo Minas artesanal, as condições durante o processamento, incluindo a qualidade do leite resultam em uma microbiota única em cada queijo produzido nessa região.

Em seguida, os isolados positivos para a presença do gene *tuf* foram submetidos a reação de PCR utilizando-se de primers específicos para o gene *sodA*, para a identificação das espécies *E. durans*, *E. faecium* e *E. faecalis* (Figura 12, 13 e 14). Entre os isolados avaliados, dois foram identificados como *Enterococcus faecium* (Figura 13) por apresentarem os *amplicons* corretos.

Os resultados obtidos pela PCR para identificação de gênero e espécie estão apresentados na Tabela 13, comparando com os resultados obtidos pelo kit 20 STREP®

**Tabela 13.** Identificação dos isolados bacterianos obtidos do fermento endógeno da região da Canastra, MG, identificadas através do kit API 20 STREP e PCR

Isolados	API 20 STREP®	PCR
S3P5.1	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
S4P2	<i>Aerococcus viridans</i>	n.i
S4P1.2	<i>Aerococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
S6P6.1	nd	n.i
S4P3	<i>Enterococcus avium</i>	na
S6P3.1	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
S6P3.2	<i>Aerococcus viridans</i> 2	n.i
S7P14.1	nd	na
A2P6	<i>Aerococcus viridans</i> 2	<i>Enterococcus faecium</i>
A1P2	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A1P3	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A1P5.2	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A1P6	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A1P7	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A2P2.1	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A2P2.2	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A3P1.1	<i>Aerococcus viridans</i> 1	n.i
A2P4	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A2P8	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A3P2	<i>Aerococcus viridans</i> 2	n.i
A3P5	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A3P6	<i>Aerococcus viridans</i>	n.i
A3P8	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A4P3.1	<i>Aerococcus viridans</i> 2	<i>Enterococcus</i> spp.
A4P7	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A4P5	<i>Aerococcus viridans</i> 2	n.i
A5P1.1	<i>Aerococcus viridans</i> 2	n.i
A5P1.2	<i>Aerococcus viridans</i> 1	<i>Enterococcus</i> spp.
A5P5.1	<i>Aerococcus viridans</i> 2	<i>Enterococcus</i> spp.
A5P9.1	<i>Aerococcus viridans</i> 2	n.i
A5P9.2	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
A6P5.1	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
A6P5.2	<i>Aerococcus viridans</i> 1	n.i
A6P6	<i>Aerococcus viridans</i> 1	n.i
A6P10.1	<i>Aerococcus viridans</i> 3	n.i
A6P10.1	<i>Aerococcus viridans</i> 3	n.i
A7P4	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A7P5	<i>Aerococcus viridans</i> 3	n.i
A7P6	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
A7P7.1	<i>Aerococcus viridans</i> 3	n.i
A7P7.2	<i>Aerococcus viridans</i> 1	n.i
A8P2.1	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
A8P9.1	<i>Enterococcus avium</i>	n.i
A2P1	<i>Aerococcus viridans</i> 2	<i>Enterococcus faecium</i>

Na = não avaliado

n.i = ausência de amplicons

n.d = não determinado

Houve grande discordância entre as metodologias avaliadas (Tabela 13). Observou-se que os isolados A1P2, A4P5, A6P5.2, A4P7, A1P3, A2P2.1 e A1P7 divididos entre os grupos 2 e 4, são classificados presuntivamente como *Enterococcus* spp. Os organismos presentes nestes dois grupos possuem 85,71 % e 71,42 % de características semelhantes, respectivamente, com as espécies tipo. Pelo kit API 20 STREP® os isolados A1P2, A1P3, A1P7, A2P2.1, A2P8, A3P5 e A4P7 que foram

identificados como *Enterococcus avium*, não foram confirmados pelo PCR como pertencentes ao gênero *Enterococcus*. Os isolados A4P5 e A6P5.2 foram identificados como *Aerococcus viridans 2* e *A. viridans 1* respectivamente.

O grupo 1, composto pelos isolados A5P9.1, A7P6, A7P7.1 E A8P9.1 apresentaram 100 % de semelhança pelos testes bioquímicos tradicionais, podendo ser considerados *Enterococcus* típicos. O kit API 20 STREP<sup>®</sup> identificou como *Aerococcus viridans 2*, *Enterococcus avium*, *Aerococcus viridans 3* *Enterococcus avium*, respectivamente. Na reação de PCR, somente o isolado A7P6 foi identificado como *Enterococcus*.

A identificação dos isolados por meio do kit API 20 STREP<sup>®</sup> não apresentou resultados satisfatórios. A classificação de alguns microrganismos como pertencentes ao gênero *Aerococcus* spp. não corresponde à morfologia encontrada nos isolados em questão. Os resultados indicam que a PCR apresentou melhor identificação que o kit. Entre os isolados avaliados somente três (A5P9.2, A7P6, A8P2.2) foram identificados como *Enterococcus* por ambas as metodologias.

Os isolados S3P5.1 e S4P2 foram classificados como *Aerococcus* spp com 97,2 e 99,9 % de acerto pelo kit. Os isolados A4P3.1, A5P1.2, A5P5.1 e A6P5.1 também foram classificados como *Aerococcus* spp. . Entretanto, todos foram classificados pelo PCR como pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. Estes resultados demonstraram que os microrganismos de acordo com a pressão ambiental podem expressar características fenotípicas que não correspondem ao seu gênero, sendo muitas vezes, classificados de forma equivocada como membro de outro gênero.

Por meio desses resultados, a morfologia, e principalmente o arranjo das células demonstram que os isolados S3P5.1, S4P2, A4P3.1, A5P1.2, A5P5.1, A6P5.1 não poderiam ser classificados como *Aerococcus*, o que foi confirmado pela PCR, sendo estes organismos *Enterococcus*. Nessa pesquisa, apesar da obtenção de colônias isoladas de um meio seletivo para *Enterococcus*, entre os isolados avaliados, somente 11 foram identificados como pertencentes ao gênero *Enterococcus*. A origem dos grupos destes isolados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 14.** Origem dos *Enterococcus* obtidos do fermento endógeno da região da Canastra, MG, quanto ao agrupamento fenotípico.

Grupo	Isolados
1	A7P6
2	A5P5.1
2	A8P2
4	S3P5.1
4	S4P1.2
4	A4P3.1
4	A2P6
4	A2P1
12	A5P1.2
12	A6P5.1
15	A5P9.2

O isolado A7P6 corresponde 100% de semelhança de acordo com teste fenotípicos utilizados nesta experimentação como membro do gênero *Enterococcus*, apresentando características fenotípicas correspondentes às espécies de *E. faecalis* e *E. faecium*. Entretanto, ao serem avaliados com *primers* específicos para estas espécies, o mesmo não gerou *amplicons* de tamanho esperado para estas espécies.

Como representante do grupo 2, o isolado A5P5.1 não hidrolisa arginina, sendo positivo para os outros testes avaliados (Tabela 8). Também, ao ser avaliado pelos *primer* das espécies de *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, não foi possível identificá-lo como pertencentes a uma dessas espécies.

Os isolados S4P2, A4P3.1, A2P1, A2P6 não hidrolisaram arginina e não cresceram à 10 °C, sendo positivos para os outros testes avaliados (Tabela 11). Os isolados A2P1 e A2P6 foram confirmados como *Enterococcus faecium* (Figura 14).

Os isolados A5P1.1 e A6P5.1 foram positivos apenas para os testes de crescimento a 45 °C, BE, e pH 9,6. Também não foram identificados quanto à espécie pelos *primers* utilizados. Este grupo diverge em grande parte do fenótipo esperado para os membros do gênero *Enterococcus* (Tabela 11).

O representante do grupo 15 (A5P9.2) apresentou crescimento em meio com 4 % de NaCl, a 45 °C e pH 9,6. A espécie não foi identificada com os *primers* utilizados. Uma característica importante é que diferente dos outros isolados, este não foi capaz de crescer em Bile Esculina. Como já apresentado neste trabalho, está é uma característica compartilhada com grande parte das espécies de *Enterococcus*.

Outro fato relevante deve-se ao resultado negativo de todos os isolados identificados como *Enterococcus* pela técnica de PCR quanto à produção da enzima PYRA. Collins et al (1989) destacaram o teste PYRA fundamental para uma correta identificação dos *Enterococcus* spp. pois todos são PYRA positivos. Esta característica, associada com outros perfis de crescimento como em meio com 6,5 % de NaCl e resistência a 40 % de sais biliares, caracterizariam membros deste gênero.

Os resultados obtidos neste trabalho divergiram da literatura citada, pois apenas dois isolados apresentaram reação positiva pelo teste do kit API 20STREP®. Além disso, os isolados que foram considerados como *Enterococcus* não possuem esta enzima, o que demonstrou que a utilização do teste PYRA para identificação de *Enterococcus* de origem endógena, não foi efetivo para garantir a identificação correta do organismo como pertencente ao gênero em estudo.

Diante dos resultados, observou-se a dificuldade de estabelecer-se um perfil fenotípico para o gênero *Enterococcus*, considerando que os organismos apresentaram diferentes características fenotípicas, divergindo dos resultados esperados para microrganismos desse gênero. A avaliação presuntiva por meio de testes bioquímicos não foi confirmada em sua totalidade pela técnica molecular. Apesar de frequentemente serem isolados de queijos fabricados com leite cru, não foi identificado *Enterococcus faecalis*, o que diverge da literatura citada. A espécie *E. faecium* também considerada referência foi identificada, mas seu resultado fenotípico divergiu da literatura citada. (CENTENO et al, 1999 CLEVELAND et al, 2001; SARANTINOPOULOS et al, 2001; GHRAIRI et al 2008).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos testes bioquímicos sugeriram a classificação de 41 % dos isolados como pertencentes ao gênero *Enterococcus* atípico, pois apenas quatro dos isolados avaliados foram semelhantes aos resultados esperados para as espécies de referência. Porém, com a descoberta de novas espécies que não apresentam resultados positivos para todos os testes e a própria heterogeneidade já citada dentro do gênero, não se exclui a possibilidade de identificação de novas espécies.

Em função da heterogeneidade do gênero *Enterococcus*, a utilização exclusiva de testes bioquímicos clássicos pode induzir a uma identificação incorreta. Entretanto, pode ser considerada uma metodologia válida, pois seus resultados podem sugerir um grupo a ser identificado, direcionando para a realização da técnica molecular.

Concluiu-se que pelo Kit API 20STREP® não foi possível identificar de forma efetiva os isolados. Vale destacar que os mesmos não apresentaram reações positivas para alguns testes característicos como PYRA e LAP, o que dificultou a identificação dos isolados para o gênero. O kit não leva em consideração a morfologia, o que poderia explicar a grande quantidade de isolados pertencentes ao gênero *Aerococcus* spp.

Entre os isolados avaliados por PCR para o gene *tuf*, apenas 11 foram identificados como *Enterococcus* spp., sendo que dois foram identificados como *E. faecium* pela presença do gene *sodA*. Entre esses, nove isolados não foram identificados quanto à espécie para os *primers* específicos para *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*. Este resultado indica a baixa correlação entre fenótipo e genótipo, pois o microrganismo comporta-se de maneira diferente quando submetido a diferentes condições ambientais.

O fermento endógeno é composto por diversos grupos microbianos, no qual interagem entre si, estabelecendo diversas relações ecológicas e conseqüentemente, apresentam fisiologia diferente daquela quando o microrganismo é isolado deste ecossistema. Esse fato pode justificar a diversidade fenotípica apresentada pelos microrganismos isolados desta pesquisa.

Devido à diversidade desta microbiota endógena, não se pode descartar a possibilidade da identificação de novas estirpes, considerando que os isolados apresentaram características fenotipicamente entre os gêneros *Aerococcus* e

*Enterococcus*. Sugere-se que o *amplicon* de 112pb do gene *tuf* seja seqüenciado para a identificação definitiva desses organismos.

Após a confirmação da identificação definitiva destes microrganismos, será possível estabelecer o papel destes isolados dentro da microbiota do queijo, relacionando sua fisiologia e metabolismo na contribuição do aroma e flavour, assim como na inocuidade alimentar deste produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E. F. L. Queijo artesanal: alternativa de Minas Gerais para a agricultura familiar. In: **6º ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO LEITEIRO F1: AVANÇOS TECNOLÓGICOS**, Belo Horizonte, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 225p, p 215-225, 2008.
- ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; LOMBARDI, A.; TORRIANI, S.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. **Journal Dairy Research**, v. 68, p. 303 – 316, 2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecções em serviços de saúde. Módulo 4: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. Brasília; 2004.
- ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal da região de Araxá**. Viçosa: UFV. 148 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- ARIZCUN, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. **International Journal Food Microbiology**, v. 38, p. 17 – 24, 1997.
- BORELLI, B. M., **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus* enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG. 119p. Tese de doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.2006
- CAMARGO, I. B. C. **Estudos de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. isolados no Brasil**. Ribeirão Preto: USP. 2005. 106 p. Tese de doutorado Biociências Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, 2005.
- CAVALCANTE, J. F. M.; FONSECA, C. R.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, C. L.L.F. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru da Região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 106-109, 2003.
- CENTENO, J. A.; MENENDEZ, S.; HERMIDA, M. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, p. 97 – 111, 1999.

- CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (northwest Spain). **International Journal Food Microbiology**, v. 33, p. 307-13, 1996.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 01 – 20, 2001.
- COLLINS, M. D.; FACKLAN, R. R.; FARROW, J. A. E.; WILLIAMSON, R. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudovium* sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, v. 57 (3), p. 283 – 288, 1989.
- DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L.; Vandamme, E. J. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology, Genetics and Applications**, p. 91–142, 1994.
- DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ J.; KILPPER-BAELZ R.; SCHLEIFER K-H. *Streptococcus canis* sp. nov.: a species of group G streptococci from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 422-425, 1986.
- DEVRIESE, L. A.; POT, B.; COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 399 – 408, 1993.
- DEVRIESE, L. A. B.; POT, B.; VAN DAMME, P.; KERSTERS, K.; HAESEBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26(2), p. 187-197, 1995
- DOLCI P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSI, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 25 (2), p.392 - 9, 2007.
- EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#Enterococcaceae>>. Acesso em: 30 de junho, 2008.
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore, M. S.; Clewell, D. B.; Courvalin, P.; Dunny, G.M.; Murray, B. E. & Rice, L. B. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, **ASM Press**, p. 1-9, 2002.
- FACKLAM, R. R.; SAHM, D. F. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R.; BACON, E. T.; PFALLER, M.A.; TENOVEN, F. C.; YOLKEN, R. H. Manual of clinical microbiology. Washington, **ASM Press**, p. 308–314, 1995.

- FORTIN M.; MESSIER, S.; PARÉ, J. ; HIGGINS, R. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. **Journal of Clinical Microbiology**. 41: 106-109. 2003
- FORTINA, M. G.; RICCI, G.; MORA, D.; MANACHINI, P. L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54: 1717-1721, 2004.
- FOULQUIE-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST. L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 01 – 24, 2006.
- FOULQUIE-MORENO, M.R.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; DE VUYST, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocinas produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 214 – 229, 2003.
- FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.105 – 122, 2003.
- FRANZ, C.M.A.P., HOLZAPFEL, W.H., STILES, M.E., Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, 47, 1 –24. 1999.
- FRANZETTI, L.; POMPEI, M.; SCARPELLINI, M.; GALLI, A. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. **FEMS Microbiology Letter**, v. 236 (2), p. 257 – 260, 2004.
- GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J. M; MANAI, M. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v.19, p.162 -169, 2008.
- GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potencial as anti-Listeria factors in dairy tecnology. **Food Microbiology**, v. 12, p. 291 – 299,1995.
- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732 – 738, 1997.
- GIRAFFA, G. Enterococci in food. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 163 – 171, 2002.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal Food Microbiology**, v. 88, p. 215–222, 2003.
- GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 716 – 722, 2006.

- HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Society for Applied Bacteriology Symposium**. Series, v. 26, p. 1S – 11S, 1997.
- HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Probiotics, general view. In: Wood, J.B.J. (Ed.), **Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. Elsevier, London, United Kingdom, p.151– 170, 1992.
- HERREROS, A, M. A.; ARENOSA, R.; SANDOVALB, M. H.; CASTROB, J. M.; FRESNOA, J. M.; TORNADIJO, M. E. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **International Dairy Journal**, v. 17(4), 328 – 335, 2006.
- HOLT, J. G; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS. **BERGEY'S manual of determinative bacteriology**. S.T. 3<sup>a</sup> ed., Willians & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. International Edition,1994.
- HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 165 –178, 1993.
- IMA(Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 818, de 12 dezembro de 2002, baixa o regulamento técnico de produção do queijo minas artesanal e dá outras providências.
- JACKSON, R. C.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3558 – 3565, 2004.
- JURKOVIC,D.; KREZKOVA, L.; DUSINSKY, R.; BELICOVA, A.; SOJKA, M.; KRAJCOVIC, J.; EBRINGER, L. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. **Letters of Applied Microbiology**, v. 42, p. 553-559, 2006.
- KE, D. ; PICARD, F. J. ; MARTINEAU, F.; MENARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3497-3503, 1999.
- LEROY, F., FOULQUIE´ MORENO, M.R., DE VUYST, L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, 235 – 240, 2003.
- MADRAU, M. A.; MANGIA, M. A.; MURGIA, N. P; SANNA, M. A.; GARAU, M. G.; LECCIS, G.; CAREDDA, M., DEIANA, P. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 876 – 885, 2006.

- MANERO, A.; BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4425 – 4430, 1999.
- MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 153 -161, 2003.
- MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Characteristics of “Tetilla” pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. **Food Microbiology**, v. 21, p. 97–104, 2004.
- MIKOLAJCIK, E. M. Single broth for the differentiation of *Streptococcus lactis* from *Streptococcus cremoris*. **Journal Dairy Science**, v. 47, p. 437 - 438, 1964.
- NANDAKUMAR, R.; MIRCHANDANI, R.; FOUAD, A. Primers sensitivity: can it influence the results in Enterococcus faecalis prevalence studies? **Oral Surgery Oral Medical Oral Pathology Oral Radiology Endod**, v. 103, p. 429 – 32, 2007.
- NOBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. Viçosa: UFV. 2007. 82 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007.
- OGIER, J. C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis, **Applied Environment Microbiology**, v. 68, p. 3691–3701, 2002.
- ORNELAS, E. A., **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG. 2005. 65p. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- OUADGHIRI, M.; MOHAMED, A.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 267–271, 2005.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Caracterização dos Microrganismos. In: **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed. vol.1. São Paulo: Mc Graw Hill do Brasil. Cap.3. p. 75-99, 1996.
- PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. Viçosa: UFV. 2004. 133 p. Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

- PSONI, L., KOTZAMANIDES, C., ANFRIGUETTO, A., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, 109, p. 109–120, 2006.
- RANDAZZO C. L.; VAUGHAN, E. E.; CAGGIA, C. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. **International Journal Food Microbiology**. v. 25, p.01-08, 2006.
- ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**, The Microbiology of Milk and Milk Products, 3ª edição, 2002.
- ROSEC, J. P., GUIRAUD, J. P., DALET, C., NICOLE RICHARD. Enterotoxin production by staphylococci isolated from food in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 213-221, 2002.
- RUOFF, K. L. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other infrequently isolated aerobic catalase-negative, gram-positive cocci. In **Manual of Clinical Microbiology** 8th edition. Edited by: Murray PR. Washington, D.C., 2003.
- SAAVEDRA, L.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; FONTE DE VALDEZ, G. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 241– 245, 2001.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 347 – 358, 1996.
- SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 621-647, 2001.
- SARANTINOPOULOUS, P., KALANTZOPOULOUS, G., TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. **International Journal Food Microbiology**, v. 76, p. 93– 105, 2002.
- SCHLEIFER, K.H. & KLIPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis*. comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.
- SUKONTASING, S.; TANASUPAWAT, S.; MOONMANGMEE, S.; LEE, JS.; SUZUKI, HI. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermentead tea leaves in

- Thailand. **International Journal Systematic Evoluotinary Microbiology**, v. 57, p. 2151 – 2154, 2007.
- SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M. T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 267 – 274, 2000.
- SWAN, A. 1954. The use of a bile-aesculin medium and of Maxted's technique of Lancefield grouping in the identification of enterococci (group D streptococci). **Journal Clinical Pathology**, v. 7, p.160-163, 1954.
- TEIXEIRA, L.M. & FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. et al (eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 422-33, 2003.
- TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M.; BERNARDO, A.; MARTIN-SARMIENTO, R.; CARBALLO, J. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). **Lait**, 75, 551–570, 1995.
- TORRES, N. CHANDAN, R.C. Latin America white cheese. A review. **Journal of Dairy Science**. v. 64. p. 552-557, 1981.
- TORRES-LLANEZ, M.J.; VALLEJO-CORDOBA, B.; DÍAZ-CINCO, M. E.; MAZORRA MANZANO, M. A.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. **Food Control**, v. 17, p. 683–690, 2006.
- TORRI TARELLI, G.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, v.11, p. 243–252, 1994.
- VAUX. A.; LAGUERRE, G.; DIVIÈS, C.; PRÉVOST, H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*).**International Journal Systematic Bacteriology**, v. 48 p. 383-387. 1998.
- VILLANI, F.; COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for waterbuffalo Mozzarella cheese manufacture. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 44, p. 97–105, 1994.
- WACHSMAN, M. B.; FARÍAS, M. E.; TAKEDA, E.; SESMA, F.; HOLGADO, A. P. R.;TORRES, R. A.; COTO, C. E. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12(4), p. 293-299, 1999.
- WILKINSON, M.G.; GUINEE, T. P.; O'CALLAGHAN, D. M.; FOX, P. F. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. **Journal of Dairy Research**, v. 61, p. 249–262, 1994.

# Anexo

## Anexo A: Meios utilizados nos testes bioquímicos

### Reagentes para o preparo do Caldo Descarboxilase (Teste da arginina)

REAGENTES	QUANTIDADES PARA 1000 mL
Bacto protease peptona	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Púrpura de Bromocresol	0,02g
Dextrose	1,0g
Arginina	5,0g
Água destilada	1000mL

### Reagentes para o preparo do Caldo TSB modificado

REAGENTES	QUANTIDADES PARA 1000 mL
Peptona de caseína	17,0g
Peptona de soja	3,0g
Fosfato dipotássio	2,5g
Dextrose	2,5g
Púrpura de Bromocresol	0,02g
Cloreto de sódio	40g (4 %) e 65g (6,5 %)
Água destilada	1000mL

### Reagentes para o preparo do àgar Bile Esculina

REAGENTES	QUANTIDADES PARA 1000 mL
Peptona de carne	5,0g
Extrato de carne	3,0g
Bílis de boi	40,0g
Esculina	1,0g
Citrato férrico	0,5g
Agar	14,5g
Água destilada	1000mL