



## METAGENOMICA NA IDENTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS PRESENTES NA PRODUÇÃO DO QUEIJO CANASTRA COM INTUITO NO DESENVOLVIMENTO DE SANITIZANTES

**Autores:** Saulo Nascimento Melo; Alcilene de Abreu Pereira

**Palavras-chave:** BACTERIA, METAGENOMICA, CONTAMINAÇÃO, ALIMENTOS

**Campus:** Bambuí

**Área do Conhecimento (CNPq):** MICROBIOLOGIA APLICADA

### RESUMO

A produção de queijos artesanais é uma tradição no estado de Minas Gerais, e a região da Serra da Canastra se destaca pela comercialização do “queijo da canastra”. Este é fabricado por produtores rurais com técnicas tradicionais e utiliza o leite cru, cujo processo é altamente suscetível a diversos tipos de contaminações. O uso de sanitizantes oriundos de óleos essenciais pode ser uma alternativa interessante para melhoria da qualidade microbiológica de utensílios, dos locais de manipulação, e equipamentos utilizados na fabricação dos queijos artesanais. Nesse contexto, o objetivo desse projeto é desenvolver um produto sanitizante, baseado em óleos essenciais, que seja eficaz no controle de microrganismos contaminantes de alimentos presentes nas instalações onde ocorre a produção do “queijo canastra”. A análise metagenômica das comunidades bacterianas presentes no processo de produção do Queijo Artesanal tipo Canastra permitiu a identificação de uma grande diversidade de grupos bacterianos: identificação de 849 diferentes gêneros, agrupados 219 famílias. O projeto está em sua fase final de execução, faltando apenas a proposição do protótipo a partir dos grupos bacterianos contaminantes encontrados.

### INTRODUÇÃO

A produção de queijos artesanais é uma tradição no estado de Minas Gerais, e a região da Serra da Canastra se destaca pela comercialização do “queijo da canastra”, que é fabricado por produtores rurais em pequena escala, com técnicas tradicionais e utiliza o leite cru. As características propícias dessa região fornecem condições para o desenvolvimento de um queijo com características sensoriais peculiares e muito apreciada pelos consumidores (NOBREGA, 2007).

Os derivados de leite, particularmente os queijos, são alimentos susceptíveis à diversos tipos de contaminações. E por não existir muito controle de fabricação, os queijos artesanais podem veicular diversos microrganismos patogênicos, ocasionando em surtos de infecção ou intoxicação de origem alimentar. Esses problemas tendem a agravar quando os queijos são processados com leite cru ou sem emprego de tecnologia e higiene adequados (OLIVEIRA et al., 2010).

Patógenos emergentes têm sido relatados como importantes causadores de prejuízos e intoxicações alimentares. Dentre eles destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (TORTORA, 2002). A adequação dos parâmetros que estabelecem padrões de qualidade e higiene no processamento do queijo minas artesanal torna possível a comercialização segura desse



produto, que por meio do decreto 42.645 de 5 de junho de 2002 foi tombado como o primeiro bem imaterial do Estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2010).

Para garantir aos consumidores, produtos saudáveis e seguros, a utilização de sanitizantes oriundos de óleos essenciais pode ser uma alternativa interessante para melhoria da qualidade microbiológica dos locais de manipulação, utensílios e equipamentos utilizados na fabricação dos queijos artesanais. Esses óleos, extraídos dos vegetais por arraste de vapor de água ou outras técnicas, são compostos de grande importância em pesquisas, por possuírem funções biológicas de perpetuação e defesa e serem potencialmente úteis no controle de microrganismos, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais livres e microrganismos que causam prejuízos nas indústrias alimentícias (ANDRADE & MACÊDO, 1996). A utilização de metabólitos secundários de plantas vem crescendo e conquistando o mercado e a preferência dos consumidores por apresentarem benefícios à saúde, bem como menores impactos ao meio ambiente. As propriedades antimicrobianas dos princípios ativos dos óleos essenciais de plantas aromáticas, inclusive as condimentares, têm despertado o interesse do setor alimentício por constituírem alternativa para o desenvolvimento de novos sanitizantes utilizados no controle e remoção de biofilmes (SAITO & SCRAMIN, 2000). Biofilmes esses que podem ser definidos como comunidades microbianas que se aderem a superfícies. Dessa forma, o desenvolvimento de um produto a base de óleo essencial que seja utilizado como sanificante em fábricas de queijos artesanais possuem potencial para geração de patente e utilização comercial.

## **METODOLOGIA**

Os locais de amostragem foram definidos com o auxílio da Prefeitura Municipal de Medeiros e da Associação de Produtores de Queijo Canastra de Medeiros (APROCAME). Foram definidos dois tipos de locais de amostragem: (1) três locais de produção de queijos classificados com o padrão de qualidade da APROCAME (alto valor agregado); (2) três locais de produção de queijos classificados como do tipo rendado (baixo valor agregado).

Nestes locais foram coletadas amostras de material microbiológico presente nas superfícies das estações de trabalho bem como a superfície dos equipamentos utilizados utilizando swabs estéreis. Para cada ponto serão coletadas quatro réplicas. Além das análises de superfícies, amostras da matéria-prima (leite cru) e do produto final (queijo) serão também coletadas para a caracterização dos grupos bacterianos presentes. A caracterização dos grupos bacterianos será realizada pelo método de análise metagenômica, na qual é extraído o DNA total presente em cada amostra coletada e cada grupo bacteriano presente é identificado por diferenças únicas no seu DNA.

A relação das comunidades de microrganismos identificados é uma parte de um projeto ainda maior que busca com esses grupos de microrganismos encontrados desenvolver um produto sanitizante a partir de óleos essenciais para ser utilizado nas instalações de produção.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A análise metagenômica das amostras de cada etapa do processo de produção do Queijo Minas Artesanal tipo Canastra bem como as principais portas de entrada de novos microrganismos no processo (tratadas aqui como “fonte de microrganismos”) gerou cerca de um milhão de sequências de DNA de



qualidade adequada para análise (Tabela 1). Das sequências geradas, cerca de 10 mil não puderam ser classificadas pelo menos ao nível de família e não foram incluídas na análise. A análise metagenômica apresentou resultados de rendimento similares aos encontrados em outros estudos desta natureza já desenvolvidos (ERCOLINI et al., 2012; DELCENSERIE et al., 2014; DALMASSO et al., 2016).

Com relação a amplitude taxonômica caracterizada nesta análise, foram encontrados 35 diferentes filos pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria. Dentre os filos mais representativos, cerca de 87% das sequências identificadas correspondiam a 2 filos e 3 classes: Firmicutes (Classe Bacilli) e Proteobacteria (Classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria). Estes grupos também foram predominantes em outros estudos de análise metagenômica de comunidades bacterianas presentes em queijos, revelando a típica capacidade de adaptação de determinadas famílias destes filos a este ambiente como por exemplo as bactérias do ácido láctico (*Lactic acid bacteria - LAB*) (MASSOUD et al., 2011; FUKA et al., 2013; RIQUELME et al., 2015; DALMASSO et al., 2016).

**Tabela 1. Rendimento da análise metagenômica das comunidades encontradas no processo de produção do queijo Canastra.**

<b><i>Categoria taxonômica</i></b>	<b><i>Nº total</i></b>
Sequências de DNA analisadas (reads)	1005119
Filos identificados	35
Classes identificadas	60
Ordens identificadas	113
Famílias identificadas	219
Gêneros identificados	849

A identificação de 849 diferentes gêneros, agrupados 219 famílias, permitiu a realização de estimativas da riqueza das comunidades bacterianas de cada etapa do processo, bem como estimativas de riqueza de cada potencial fonte de novos microrganismos para a comunidade bacteriana presente nos queijos. A comparação entre as riquezas médias entre produtos de maior e menor valor agregado revelou que as comunidades dos queijos de menor valor agregado são mais ricas em microrganismos na massa dessorada e no queijo fresco (Tabela 2). A análise ainda revelou que uma potencial explicação para esta diferença nestas etapas finais de produção do queijo pode estar no utensílio de pano utilizado para remover o excesso de líquidos totais da massa, uma vez que a única fonte de microrganismos que apresentou diferenças entre os grupos foi justamente em amostras do pano utilizado. Embora as diferenças na riqueza não tenham permanecido da etapa de queijo fresco para o produto final, estes microrganismos adicionais podem ter gerado alterações na composição do produto ainda antes da maturação resultando em produtos finais com características sensoriais que conferem menor valor agregado. Dessa forma, análises adicionais de identificação devem ser realizadas a fim de se buscar alguma relação de causa e efeito entre a presença de determinado grupo bacteriano e a determinação de características sensoriais que desagregam valor ao produto.



Tabela 2. Análise comparativa da riqueza de gêneros entre queijos de maior e menor valor agregado.

Amostra	Queijo maior valor				Queijo menor valor			
	Prod 1	Prod 3	Prod 4	Média	Prod 2	Prod 5	Prod 6	Média
<i>Etapa do processo</i>								
Leite	169	158	155	160,7a	106	134	146	128,7a
Massa quebrada	109	139	96	114,7a	161	148	151	153,3a
<b>Massa dessorada</b>	<b>66</b>	<b>103</b>	<b>100</b>	<b>89,7a</b>	<b>121</b>	<b>136</b>	<b>134</b>	<b>130,3b</b>
<b>Queijo Fresco</b>	<b>89</b>	<b>102</b>	<b>105</b>	<b>98,7a</b>	<b>126</b>	<b>154</b>	<b>158</b>	<b>146,0b</b>
Queijo Maturado	21	24	27	24,0a	31	74	36	47,0a
<i>Fonte de microrganismos</i>								
Latão	100	102	138	113,3a	128	138	72	112,7a
Pá	91	80	59	76,7a	104	90	125	106,3a
Pingo	54	35	36	41,7a	97	87	44	76,0a
Bancada	38	84	69	63,7a	66	72	53	63,7a
Mão	96	91	105	97,3a	83	172	54	103,0a
<b>Pano</b>	<b>62</b>	<b>69</b>	<b>74</b>	<b>68,3a</b>	<b>96</b>	<b>111</b>	<b>119</b>	<b>108,7b</b>
Prateleira	113	92	118	107,7a	135	90	93	106,0a

## CONCLUSÕES

A análise metagenômica das comunidades bacterianas presentes no processo de produção do Queijo Artesanal tipo Canastra permitiu a identificação de uma grande diversidade de grupos bacterianos: identificação de 849 diferentes gêneros, agrupados em 219 famílias. O projeto está em sua fase final de execução, e essa caracterização das comunidades microbianas vai possibilitar o desenvolvimento de sanitizantes a partir das comunidades encontradas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996, 182 p.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. M.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. **Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers**. Journal of Applied Microbiology, Oxford.

DALMASSO, Alessandra et al. Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 490-496, 2016.

DELCENSERIE, Véronique et al. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 10, p. 6046-6056, 2014.

ERCOLINI, Danilo et al. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8142-8145, 2012.



FUKA, Mirna Mrkonjić et al. Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80734, 2013.

LANE, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. Em E. STACKEBRANDT e M. GOODFELLOW (eds.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.

MASOUD, Wafa et al. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 3, p. 142-148, 2011.

NÓBREGA, 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. 82p. Dissertação demostrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.A.; PICCOLI, R.H. Disinfectant action of Cymbopogon sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010.

RIQUELME, Cristina et al. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). **International journal of food microbiology**, v. 192, p. 86-94, 2015.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMPRABA, 2000. 48 p. Empraba meio ambiente. Documentos, 20.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

### **Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:**

Os dados ainda não foram apresentados ou publicados.