

**NATÁLIA FERREIRA DE ARAUJO**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA PRELIMINAR DE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL  
PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

**GARANHUNS-PE**

**2019**

**NATÁLIA FERREIRA DE ARAUJO**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA PRELIMINAR DE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO DE COALHO  
ARTESANAL PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Medicina  
Veterinária da Unidade Acadêmica de  
Garanhuns, Universidade Federal Rural  
de Pernambuco como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção do  
título de graduação em Medicina  
Veterinária**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Pinheiro Franque**

**GARANHUNS-PE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns-PE, Brasil

A662c

Araujo, Natália Ferreira de

Caracterização genotípica preliminar de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal produzido no agreste de Pernambuco / Natália Ferreira de Araujo. – 2019.

35 f. : il.

Orientadora: Marcelo Mendonça.

TCC (Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, BR-PE, 2019.

Inclui referências

1. Probióticos 2. Bacteriocinas 3 Rep-PCR 4. 16s Rrna 5. Queijo coalho I. Mendonça, Marcelo, orient. II. Título

CDD 637

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA PRELIMINAR DE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL  
PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Trabalho de conclusão de curso elaborado por:

**NATÁLIA FERREIRA DE ARAUJO**

Aprovada em 05/07/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

---

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Pinheiro Franque

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

---

*MSc.* Ana Erudina de Luna Moraes Leite

Médica Veterinária e Responsável Técnica do Laticínio LETA



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**

**IDENTIFICAÇÃO DO ESO**

**I. ESTAGIÁRIO**

NOME: Natália Ferreira de Araujo

MATRÍCULA Nº: 200668374

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2019.1

ENDEREÇO PARA CONTATO: Rua Luís Mendes, nº. 110, Aloísio Pinto,  
Garanhuns-PE.

FONE: (87) 99631-4329

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Prof. Dr. Luís Augusto Nero

FORMAÇÃO: Medicina Veterinária

**II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO**

NOME: Universidade Federal de Viçosa

ENDEREÇO: Avenida Peter Henry Rolfs

BAIRRO: Campus Universitário

CIDADE: Viçosa

ESTADO: Minas Gerais

CEP: 36571.000

FONE: (31) 3899-2317

**III. FREQUÊNCIA**

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 12/03/2019 a 26/04/2019

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 272 horas



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**

**IDENTIFICAÇÃO DO ESO**

**I. ESTAGIÁRIO**

NOME: Natália Ferreira de Araujo

MATRÍCULA Nº: 200668374

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2019.1

ENDEREÇO PARA CONTATO: Rua Luís Mendes, nº. 110, Aloísio Pinto,  
Garanhuns-PE.

FONE: (87) 99631-4329

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

SUPERVISOR: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

FORMAÇÃO: Medicina Veterinária

**II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO**

NOME: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de  
Garanhuns

ENDEREÇO: Rua São Miguel, nº. 614, Garanhuns - PE

BAIRRO: Boa Vista

CIDADE: Garanhuns

ESTADO: Pernambuco

CEP: 55292-270

FONE: (87) 3764-5505

**III. FREQUÊNCIA**

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 29/04/2019 a 22/05/2019

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 133 horas

## RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) ajudam a prolongar a vida útil de alimentos e têm ação probiótica e bacteriostática. Com o objetivo de iniciar a identificação e caracterização molecular de BAL de queijo de coalho artesanal do agreste de Pernambuco. Para isso, foram utilizadas cepas provenientes do banco de microrganismos do Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns. Para o estudo molecular, foram empregadas técnicas de extração de DNA pelos métodos de pérolas de vidro e Kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen) e técnicas de Rep-PCR e ampliações do gene 16s rRNA com primers universais foram realizadas. A eletroforese no gel de agarose do Rep-PCR não obteve uma separação adequada das bandas, não permitindo uma discriminação ideal na realização da construção do dendrograma. A amplificação do gene 16s rRNA foi exitosa e as amostras foram armazenadas a -20 °C, para posteriormente ser realizado o sequenciamento, a fim de ter a identificação taxonômica e estabelecer um possível monitoramento das BAL isoladas de queijo de coalho no agreste de Pernambuco.

**Palavras-chave:** probióticos, bacteriocinas, molecular, Rep-PCR, 16s rRNA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) da Universidade Federal de Viçosa - MG.....	13
<b>Figura 2</b> Sala de manipulação microbiológica e das estufas microbiológicas da Universidade Federal de Viçosa - MG.....	13
<b>Figura 3</b> Exemplo de eletroforese em gel de agarose do produto de DNA amplificado pela técnica de Rep-PCR de BAL, isoladas de queijo minas do Serro.....	21
<b>Figura 4</b> Fases do sobrenadante do clorofórmio e das pérolas de vidro.....	24
<b>Figura 5</b> Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA extraído através do método de pérolas de vidro.....	26
<b>Figura 6</b> Eletroforese do DNA extraído através do kit PureLink Genomic DNA. ....	27
<b>Figura 7</b> Perfil de eletroforese em gel de agarose dos produtos de Rep-PCR de BAL.....	28
<b>Figura 8</b> Dendrograma das amostras de BAL derivado da análise de Rep-PCR .....	28
<b>Figura 9</b> Eletroforese em gel de agarose de produtos de rRNA 16S amplificados por PCR .	29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Descrição das atividades realizadas e acompanhadas no INSPOA .....	14
<b>Tabela 2</b> Atividades realizadas no LAPEMI .....	16
<b>Tabela 3</b> Numeração, nome e morfologia das BAL no dendrograma a partir da análise de Rep-PCR. ....	28

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BAL** - Bactérias ácido lácticas

**PCR** - Polymerase chain reaction

**TBE** - Tris/Borate/ EDTA

**EDTA** - Ultrapure Ethylenediaminetetraacetic Acid

**ESO** - Estágio Supervisionado Obrigatório

**INSPOA** - Inspeção de Produtos de Origem Animal

**LAPEMI** - Laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunodiagnóstico

**UV** - Ultra Violeta

**MRS** - Man, Rogosa e Sharpe

**DTA** - Doença Transmitida por Alimento

**BHI** - Brain Heart Infusion

**RNA** - Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**B.O.D.** - Biochemical Oxygen Demand

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS .....</b>	<b>12</b>
<b>1 – LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS.....</b>	<b>12</b>
1.1 Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) - LOCAL 1.....	12
1.1.1 Atividades desenvolvidas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) na UFV .....	14
1.1.1.1 Procedimento para as análises microbiológicas: .....	15
1.2 Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns .....	16
<b>CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA PRELIMINAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO .....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Bactérias Ácido Láticas.....	19
2.2 Métodos de Identificação de Bactérias Ácido Láticas .....	20
2.3 Técnicas Moleculares aplicadas a identificação de Bactérias Ácido Láticas .....	20
2.4 REP-PCR .....	21
2.5 Sequenciamento de DNA.....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Cultivo de Bactérias Ácido Láticas .....	23
3.2 Extração de DNA genômico .....	23
3.2.1 Protocolo de Extração pelo Método de Pérolas de Vidro.....	23
3.2.2 Protocolo de Extração pelo Kit PureLink Genomic DNA .....	24
3.3 Rep-PCR e Amplificação do gene 16S rRNA por PCR.....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>26</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIA .....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>34</b>

## **CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS**

### **1 – LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS**

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado em dois locais, durante o período de 12/03/2019 a 22/05/2019, com carga horária total de 405 horas, sob orientação acadêmica do prof. Dr. Marcelo Mendonça da UAG/UFRPE.

#### **1.1 Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) - LOCAL 1**

A primeira etapa do ESO foi realizada no departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, em Minas Gerais, no laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA). O estágio foi realizado no período de 12/03/2019 a 26/04/2019, com carga horária total de 272 horas, sob supervisão do Prof. Dr. Luís Augusto Nero.

A estrutura física do laboratório conta com três salas, onde uma é realizada a maioria das manipulações microbiológicas e lavagem de vidrarias, numa outra sala ficam as geladeiras que armazenam todos os materiais que necessitam de refrigeração, sendo separado por geladeiras de materiais contaminados e de não contaminados, a última sala é de incubação, onde são dispostas estufas do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com diferentes temperaturas constantes para a realização dos experimentos.

Além dos laboratórios dispostos no INSPOA, no Departamento da Medicina Veterinária ainda se localizam outras estruturas físicas e equipamentos, os quais são utilizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Nero, como o Laboratório de Biologia Molecular, Laboratório de Imunologia e o Laboratório de Microscopia.



**Figura 1.** Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) da Universidade Federal de Viçosa - MG.



**Figura 2.** Sala de manipulação microbiológica e das estufas microbiológicas da Universidade Federal de Viçosa - MG.

### 1.1.1 Atividades desenvolvidas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) na UFV

Durante o período de estágio supervisionado obrigatório no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (INSPOA) na UFV, foram acompanhadas as rotinas do laboratório e diferentes experimentos desenvolvidos pelos pós-graduandos orientados pelo prof. Luís Augusto Nero. Entretanto, o que mais pôde ser acompanhado e auxiliado foram atividades relacionadas às pesquisas de microrganismos totais presentes (microbiomas) em queijos minas artesanais do Serro, assim como, a avaliação da inocuidade frente a bactérias patogênicas dos queijos artesanais produzidos em Minas Gerais. Além disso, foram realizadas avaliações de protocolos alternativos para enumeração de bactérias ácido lácticas (BAL) em queijos minas artesanais. Atividades realizadas e acompanhadas estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Atividades realizadas e acompanhadas no INSPOA

Atividades realizadas e acompanhadas no INSPOA	
Atividade	Material/Equipamento
Rep-PCR	Termociclador, eletroforese
PCR em tempo real	Magnetic induction cycler (MIC)
Limpeza do material para a execução das pesquisas	Ponteiras, vidrarias, alças bacteriológicas, tubos de ensaio
Preparo de meios de cultura	BHI, LIA, TSB, MRS, HRS, Mueller Hinton
Descontaminação e esterilização de materiais utilizados	Autoclave
Contagem padrão em placa	Contador de colônias manual
Técnica de <i>Pour plate</i>	Placa de petri, micropipeta, ponteiras, meio de cultura
Técnica de <i>Spread plate</i>	Placa de petri, alça de Drigalski, meio de cultura, micropipeta, ponteiras
Técnica de diluição seriada das amostras de queijo Minas do Serro	Tubo Falcon, tubo de ensaio, micropipeta, ponteiras, citrato de sódio
Utilização de petrifilm da 3M	Petrifilm
Eutanásia de roedores para pesquisa de cisticerco nos mesmos	Fenol-clorofórmio

### **1.1.1.1 Procedimento para as análises microbiológicas:**

Os meios de cultura utilizados para as análises são preparados de acordo com a orientação do fabricante. O processamento das amostras era realizado na sala de manipulação microbiológica, onde se encontram as capelas de fluxo laminar. Ao receber as amostras, as embalagens eram higienizadas com álcool 70% e na sequência eram levadas para a capela, a qual já estava devidamente higienizada com álcool 70% e luz ultravioleta (UV). Na capela a embalagem é aberta com material estéril (faca) e posteriormente posto na balança de precisão eletrônica para serem pesados 25 gramas (g) da amostra a ser utilizada para análise e 40 gramas para serem armazenados. Os 25g são inseridos dentro de saco de homogeneização (saco de *Stomacher*) estéril contendo 225 mL de citrato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) e, em seguida, levado para o homogeneizador de amostra *Stomacher*. Em seguida, é pipetado 1 mL da amostra com micropipeta mecânica para fazer a diluição seriada em solução salina, que é utilizada para fazer a técnica de *Pour Plate* e também no Petrifilm (3M), para contagem de bactérias.

Após as leituras, os materiais são descontaminados e descartados nos lixos específicos, onde aguardam serem recolhidos pela empresa especializada. Os materiais utilizados reutilizáveis são higienizados e desinfetados, a fim de serem reutilizados posteriormente.

É importante salientar que na Portaria Estadual Nº 1305 de 30 de abril de 2013, que estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas Artesanal, no Art. 2º reza que é permitida a fabricação de queijo minas artesanal maturado pelo tempo necessário indicado pela pesquisa científica, visando a garantia da qualidade e inocuidade dos produtos, por isso a grande importância dessas pesquisas no âmbito acadêmico.

### **1.1.1.2 Procedimento para as análises em biologia molecular**

Após o isolamento dos microrganismos, foi realizado o protocolo de extração de DNA bacteriano utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA), para realizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica utilizada para amplificação de DNA de microrganismos. Posteriormente, o produto amplificado foi submetido à técnica de eletroforese em gel de agarose para separar fragmentos de DNA de acordo com o tamanho ou peso molecular. Os produtos amplificados foram purificados com o objetivo de realizar o sequenciamento de DNA e assim identificar exatamente quais são os microrganismos isolados.

## 1.2 Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns

A segunda etapa do ESO foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns. O estágio foi realizado no período de 29/04/2019 a 21/05/2019, perfazendo uma carga horária de 133 horas, sob supervisão do professor Marcelo Mendonça.

### 1.2.1 Atividades desenvolvidas - Laboratório de Pesquisas em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI).

Foram realizados diferentes experimentos para a caracterização genômica de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijo de coalho comercializados no agreste de Pernambuco (PE). Inicialmente, os isolados congelados de BAL, pertencentes ao banco de bactérias do LAPEMI, foram reativados no caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) por aproximadamente 18h, a 37 °C. Em seguida, o protocolo de extração de DNA genômico bacteriano foi realizado pelo método de pérolas de vidro, adaptado de Sambrook e Russel (2001). Após verificação do DNA genômico em gel de agarose 1%, pôde ser notado que a extração de DNA de BAL com esse protocolo não obteve resultado satisfatório, sendo possível a verificação de pouca quantidade de DNA nas amostras. Desta forma, realizou-se um novo cultivo e outra extração de DNA dos isolados de BAL, utilizando-se o kit PureLink Genomic DNA Extraction (Invitrogen). Após verificação da extração, os DNA's genômicos das BAL foram utilizados para a realização das técnicas de Rep-PCR e amplificação do gene 16S rRNA. As atividades realizadas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Atividades realizadas no LAPEMI.

Atividades realizadas no LAPEMI	
Atividade	Material/Equipamentos
Rep-PCR	Termociclador, eletroforese
Limpeza de material	Alças bacteriológicas, tubos de Falcon, tubos de ensaio
Extração de DNA pelo método de pérolas de vidro	Eppendorfs, micropipeta, pérolas de vidro, tampões
Extração de DNA pelo Kit PureLink Genomic DNA	Kit PureLink Genomic DNA
Descontaminação e esterilização de materiais	Autoclave
Preparação de meios de cultura	BHI, MRS

## **CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA PRELIMINAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

### **1 INTRODUÇÃO**

A busca por alimentos mais saudáveis tem sido cada vez mais comum, com isso a demanda por novos produtos alimentícios tem se tornado cada vez mais desafiador e inovador. Os consumidores buscam alimentos atrativos, que tenham uma boa palatabilidade e que sejam saudáveis (KOMATSU et al., 2008). Alimentos que trazem efeitos benéficos para o corpo são considerados como alimentos funcionais, que além de contribuir com a nutrição, podem conter substâncias biologicamente ativas, como os probióticos, que ajudam na promoção de saúde, com alguns mecanismos próprios do metabolismo (PARVEZ et al., 2006; KOMATSU et al., 2008).

Os probióticos são microrganismos vivos capazes de favorecer o equilíbrio do microbioma intestinal, favorecendo a saúde do hospedeiro (KLAENHAMMER, 2000). Um dos mecanismos de ação destes microrganismos é a colonização do epitélio intestinal, produzindo substâncias bacteriostáticas. Também contribuem para a proliferação de outras bactérias benéficas, inibindo patógenos prejudiciais (MATOS, 2010; ANVISA, 2018). O conhecimento do microrganismo é um fator essencial para que seja utilizado pelas indústrias alimentícias e farmacológicas.

Dentre os microrganismos probióticos, um dos mais utilizados são as bactérias lactoacidófilas, que inclui o gênero *Lactobacillus*, os quais são pertencentes ao grupo de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) (GHASEMIAN et al., 2018). As BAL contribuem para prolongar a vida útil dos alimentos, diversificam o sabor e textura de produtos alimentícios, tem ações probióticas e bacteriostáticas e são capazes de diminuir o pH do meio, tornando um ambiente inóspito para microrganismos deteriorantes e patogênicos (LUONGO, 2013). Isso as tornam importantes e essenciais na indústria, por sua grande capacidade de influenciar positivamente o produto final (MACEDO, 2004).

As bactérias ácido lácticas são divididas em homofermentativas, que produzem ácido láctico como exclusivo ou principal produto da fermentação da glicose, que pode estar presente no alimento; em homolácticas, que possuem comportamento homofermentativo e produzem ácido acético e láctico, como exemplo, alguns *Lactobacillus*; e nas heterofermentativas, que

produzem lactato, dióxido de carbono e etanol na mesma quantidade, sendo as mais importantes na influência de aroma e sabor (JAY, 2005).

Visando aumentar a vida útil dos alimentos e ainda garantir a inocuidade do mesmo, técnicas de biopreservação vêm sendo empregadas há muitos anos em diferentes alimentos, sendo utilizadas tanto as próprias BAL, como as bacteriocinas, substâncias produzidas principalmente por BAL (COSTA, 2016; GHASEMIAN et al., 2018). As bacteriocinas podem, além de inibir e destruir patógenos indesejáveis, proporcionar alimentos seguros e com maior prazo de prateleira.

Um fator que preocupa os consumidores atualmente é o fato de ter tantos produtos químicos utilizados como aditivos que funcionam como conservantes. Com o conhecimento sobre as características das BAL, que podem ser utilizadas como aditivos naturais, esta preocupação é diminuída (SILVA, 2011). Assim, a realização do presente trabalho teve como objetivo iniciar a identificação molecular por Rep-PCR e amplificação do gene 16S rRNA, a fim de ter a identificação taxonômica e estabelecer um acompanhamento das bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal, comercializados na região do Agreste Pernambucano.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bactérias Ácido Láticas

Bactérias ácido láticas (BAL) são microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, em geral não móveis, catalase negativos e produtora de ácido lático como o principal produto do metabolismo no alimento (JAY, 2005). Constituem um grande grupo de microrganismos, geralmente associados a laticínios devido a alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como queijo, carne, leite, frutas e estão amplamente distribuídas na natureza. São largamente empregadas na indústria de alimentos em processos de fermentação, em alguns casos, as BAL podem se tornar desejáveis ou indesejáveis, pois contribuem para produção de sabores, aromas, textura e odor, que alteram o alimento positivamente ou negativamente (EMBRAPA, 2011).

Os microrganismos BAL também podem ser classificadas como homofermentativas e heterofermentativas, que vai depender do produto final de fermentação. As homofermentativas tem como produto do seu metabolismo o ácido lático, devido a fermentação da glucose, já as heterofermentativas produzem diversas substâncias como dióxido de carbono, etanol, aldeído, diacetil, ácido acético, além de ácido lático que são substâncias com potencial antimicrobiano (CARR et al., 2002). Também podem ser classificadas quanto ao crescimento por temperatura em termofílicas, que são os microrganismos que crescem em altas temperaturas a 42 °C, e mesofílicas, que crescem em temperatura ambiente por volta de 30 °C (EMBRAPA, 2009).

Entre as bactérias ácido láticas existem algumas com potencial probiótico, que nada mais é que microrganismos vivos administrados com o objetivo de manter um equilíbrio na microbiota intestinal, seja por produção de bacteriocinas ou por competição com outros patógenos e suas toxinas, impedindo a fixação no epitélio intestinal. Então, são comprovados seus efeitos positivos, sobretudo na saúde humana (MATOS, 2010). Além da capacidade de auxiliar na inocuidade de alimentos pelo mesmo mecanismo de ação inibitória sob microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes nos alimentos (NERO et al., 2008). Deve haver um controle e conhecimento sobre a espécie de BAL e suas funções, ao serem aplicadas em alimentos pelas indústrias, que comercializam produtos contendo os microrganismos. Segundo Perin (2016), muitas BAL que constituem a microbiota própria do leite possuem genes associados a virulência e algumas cepas possuem resistência a

antimicrobianos, que adquirem genes de resistência através dos animais tratados com antibióticos, sendo transferidos na cadeia alimentar.

A utilização de BAL na fabricação de leite acidificado, iogurte e queijos se dá principalmente na forma de fermento láctico, que tem como função a acidificação rápida durante a fermentação, garantindo a segurança do alimento pelo controle, inibição e prevenção da multiplicação de patógenos (EMBRAPA 2009, ROSSI et al, 2018). As BAL são os principais microrganismos responsáveis pela acidificação de queijos, as mais comuns encontradas são *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Os lactococcus e os enterococos são bem comuns em queijos frescos, sem cozimento, advindo da matéria prima e do ambiente (CARVALHO, 2007).

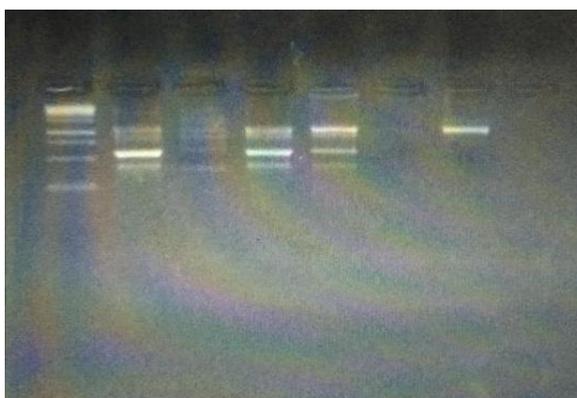
## **2.2 Métodos de Identificação de Bactérias Ácido Lácticas**

A identificação de BAL é realizada através de meios de cultura seletivos com subsequente reconhecimento fenotípico, através da técnica de coloração de Gram e posteriormente a bacterioscopia, que possibilita a verificação das características morfológicas, ou seja, se são cocos ou bacilos, permitindo uma identificação presuntiva de triagem ou confirmatório (PEREIRA, 2017). Teste de catalase também é de suma importância na triagem de BAL, pois são catalase negativa. Apesar de ser um método relativamente sensível, tem suas limitações devido a dificuldade de discriminar espécies e cepas. Dessa forma, outros testes são necessários para classificar em gênero e espécie, como a PCR espécie-específica, esta técnica tem sido a mais empregada para confirmar a identificação bioquímica de microrganismos (EMBRAPA, 2011).

## **2.3 Técnicas Moleculares aplicadas a identificação de Bactérias Ácido Lácticas**

Diversos métodos moleculares têm sido aplicados na detecção e caracterização de microrganismos. Dentre essas, a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) se destaca, pois tem sido bastante utilizada para confirmação e identificação de BAL (GANDRA et al., 2008, PERIN, 2016). A reação de PCR é altamente sensível, por meio do qual ocorre uma amplificação enzimática de um determinado segmento de DNA pela extensão de oligonucleotídeos, obtendo milhões de cópias da sequência alvo. Vários ciclos com sucessivas alternâncias de temperatura permitem a desnaturação da fita de DNA, hibridização e extensão dos primers. Com o passar de vários ciclos, o segmento de DNA limitado pelos primers vai sendo amplificado, de modo que aquela região fica com um acúmulo exponencial. Essa região amplificada pela ação da limitação do primer deve ser submetida a reação de eletroforese,

onde as bandas do produto são mostradas através da coloração do gel de agarose, utilizando corantes, chamado intercalante, que ao ser exposto à luz ultravioleta (UV) absorve a energia, evidenciando a posição de cada banda. A eletroforese é possível através da ação de um campo elétrico por meio do gel de agarose, que faz com que ocorra o deslocamento de biomoléculas nos poros do gel, demonstrado na Fig. 3. É importante saber que moléculas pequenas tendem a migrar mais rapidamente que moléculas grandes (ALMEIDA et al., 2004).



**Figura 3.** Exemplo de eletroforese em gel de agarose do produto de DNA amplificado pela técnica de Rep-PCR de BAL, isoladas de queijo minas do Serro. Técnica realizada durante o estágio na UFV. Fonte: Arquivo Pessoal, 2019.

## 2.4 REP-PCR

A Rep-PCR é uma técnica empregada para agrupar os microrganismos de acordo com a similaridade genética, ou seja, as bactérias possuem cópias exatas de sequências de DNA no seu genoma. Esta técnica é baseada no uso de primer de consenso, o qual é sintetizado a partir de elementos repetitivos de DNA específicos, chamada assim de palindrômica extragênica repetida (REP). O primer tem sido desenhado para amplificar regiões entre elementos repetitivos através da PCR, que se anelam nas sequências REP, gerando os fingerprinting (impressões digitais), que são utilizados para tipagem e identificação de diferentes microrganismos e de BAL. Os fragmentos gerados são de diferentes tamanhos, desta forma, podem ser realizadas análises comparativas para com os diferentes agentes bacterianos e chegar ao nível de gênero ou espécie (GANDRA et al., 2008, CHAPAVAL et al., 2006).

Os fragmentos amplificados de elementos repetitivos de DNA pela Rep-PCR são submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose e posteriormente são utilizados para a digitalização dos fingerprintings através de programas específicos para a produção do dendrograma de similaridade, como exemplo o Bionumerics 6.6. O dendrograma vai

identificar diferentes clusters, que vão fornecer informações a respeito da dinâmica e diversidade dos organismos da mesma espécie (COCOLIN et al., 2011).

## **2.5 Sequenciamento de DNA**

O sequenciamento vai revelar exatamente a composição dos nucleotídeos de DNA, através dos produtos que são obtidos por PCR. Existem dois métodos de sequenciamento: o método químico e o método enzimático. O método químico vai se utilizar de agentes químicos como o dimetil sulfato, ácido fórmico e hidrazinas, que vão degradar o DNA. Esses agentes se ligam em pontos específicos gerando inúmeros fragmentos, que ao serem combinados, revelam a sequência do fragmento. O método enzimático se utiliza do desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) e de uma pequena quantidade de desoxirribonucleotídeos trifosfato (ddNTPs), que é agregado à fita que está sendo sintetizada, mas em certo ponto ocorre uma interrupção, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. É feita a amplificação do fragmento de interesse utilizando o ddNTP, dNTP, tampão de reação, enzima polimerase e um primer, que posteriormente é submetido a reação de eletroforese em gel de poliacrilamida, que vai revelar a sequência através de marcação fluorescente (ALMEIDA et al., 2004). A identificação molecular por sequenciamento do gene 16s rRNA de BAL está cada vez mais aceita. O gene 16s rRNA está presente em todos os microrganismos bacterianos, é uma região bem conservada e possui diferenciações suficientes entre espécies (PERIN, 2016).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Cultivo de Bactérias Ácido Láticas**

O cultivo das bactérias ácido láticas isoladas de queijo de coalho foi realizado através do caldo de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e o caldo BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de extrato de levedura a 0.6%. Para o cultivo foi utilizado 3 mL de cada meio, que foram obtidos através de congelados de BAL, os quais tiveram origem de queijos de coalho da região do agreste Pernambucano.

A incubação para o crescimento se deu na temperatura de 37 °C por 24 ou 48h. Após o cultivo foram empregados os métodos moleculares, que têm sido uma alternativa para identificação e classificação desses microrganismos. Foi utilizada a técnica de Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic elements - Reação em Cadeia da Polimerase), a qual se utiliza de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas, que estão presentes em grandes números no genoma de várias bactérias.

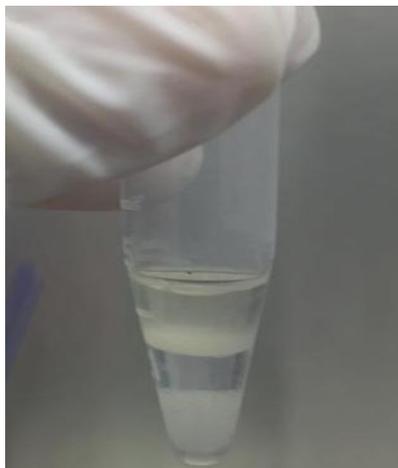
### **3.2 Extração de DNA genômico**

Um total de 23 isolados de BAL do banco de microrganismos do LAPEMI foram cultivados em caldo MRS e BHI. Após o tempo de cultivo, 1,5 mL dos cultivos foram colocados em eppendorfs para centrifugação a uma velocidade de 13.000 rpm, por 5 min, para a obtenção do pellet formado pela sedimentação dos microrganismos. Foram utilizados dois métodos de extração de DNA bacteriano, o método de pérolas de vidro (adaptado a partir de Sambrook e Russel, 2001) e a extração usando o Kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

#### **3.2.1 Protocolo de Extração pelo Método de Pérolas de Vidro**

Inicialmente, 1,5 mL de cultura de bactérias ácido láticas foi centrifugado por 5min a 13.000 rpm em temperatura ambiente. O pellet formado foi ressuspensionado em 150 µL do tampão STES (Tris-HCL 0,2M; NaCl 0,5M; SDS 0,1%; EDTA 0,01M; pH 7,6) e então foram adicionados à mistura de aproximadamente 50 µL de pérolas de vidro e 150 µL de clorofórmio, sendo homogeneizada no vortex e centrifugada por 5 min a 13.000 rpm. Os sobrenadantes, demonstrado na Fig. 4, foram coletados e adicionados a 200 µL de álcool 96% e mais 10 µL de acetato de Potássio, posteriormente foi incubados a -20°C por 1h. Passado o tempo, foi realizada uma centrifugação a 13.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet aderido à parede do eppendorf lavado 2 vezes com álcool 70%, desprezando o álcool e deixando-o secar. O DNA foi eluído em 45 µL de tampão de eluição

TE (Tris-EDTA; Tris-HCL 100mM pH 7,4; EDTA 10mM pH 8). Ao final, foram adicionados a 1  $\mu\text{L}$  de RNase ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nas amostras. A qualidade do DNA extraído foi avaliado através da eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo o corante intercalante DNA Sybr Safe 10.000X Gel Stain (Invitrogen, USA).



**Figura 4.** Fases do sobrenadante do clorofórmio e das pérolas de vidro. Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

### 3.2.2 Protocolo de Extração pelo Kit PureLink Genomic DNA

Inicialmente 1,5 mL de cultura de bactérias ácido lácticas foi centrifugada por 5 min a 13.000 rpm em temperatura ambiente. O pellet formado foi ressuspenso em 180  $\mu\text{L}$  do digestion lysosyme buffer, depois foi incubado a 37°C por 30min e então foram adicionados a mistura 20  $\mu\text{L}$  da Proteinase K e 200  $\mu\text{L}$  PureLink™ genomic lysis, os quais foram homogeneizados no vortex e incubado a 55°C por 30min. Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol 96%. Toda a solução aproximadamente 640  $\mu\text{L}$  preparado com o PureLink™ Genomic Lysis foi coletado e este foi adicionado a um tubo de coleta do pacote que continha filtro (Spin Column) e centrifugado posteriormente a 10.000 x g por 1 min. A solução filtrada foi descartada e apenas o Spin Column foi posto em um novo tubo para ser adicionado 500  $\mu\text{L}$  do Wash Buffer 1 no Spin Column e levado para centrifuga por 10.000 x g por 1min. O mesmo procedimento foi realizado com o Wash Buffer 2. O Spin Column foi colocado em um eppendorf onde foi acrescido de 50  $\mu\text{L}$  de PureLink™ Genomic Elution Buffer, depois foi incubado por 1min em temperatura ambiente. Passado este período foi realizada nova centrifugação a 10.000 x g por 1,5 min. A qualidade do DNA extraído foi avaliado através da eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo o SYBR Safe (Invitrogen).

### 3.3 Rep-PCR e Amplificação do gene 16S rRNA por PCR

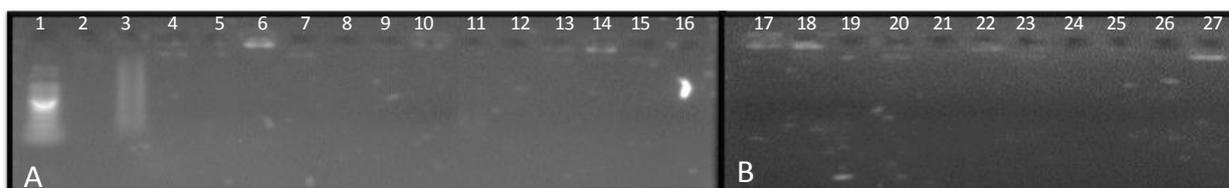
As reações de PCR tiveram como alvo o gene do Rep-PCR, padrão ouro da taxonomia molecular microbiana. Foi utilizado 2  $\mu\text{L}$  do primer único (GTGGTGGTGGTGGTG), com concentração de 25 pmol/ $\mu\text{L}$ , mais 12,5  $\mu\text{L}$  de GoTaq Green Master Mix® (Promega, Madison, USA), mais 8,5  $\mu\text{L}$  de água nuclease free (NF), mais 2  $\mu\text{L}$  do DNA, com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . A reação final foi levada para o termociclador, onde a primeira fase foi a desnaturação a 94 °C por 5 min, e 30 ciclos de desnaturação e anelamento por 94 °C por 30 segundos, 40 °C por 20 segundos, 72 °C por 2 min e por fim a extensão 72 °C por 10 min.

Foi realizada também a reação de PCR do gene 16s rRNA com o primer universal (For- GCGGCGTGCCTAATACATGC; Rev- ATCTACGCATTCACCGCTAC), o qual gera amplicons em aproximadamente 900 bp. Foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  de primer forward e 1  $\mu\text{L}$  de primer reverse mais 12,5  $\mu\text{L}$  de GoTaq Green Master Mix® (Promega, Madison, USA), mais 8,5  $\mu\text{L}$  de água nuclease free (NF), mais 2  $\mu\text{L}$  do DNA, com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . A reação de amplificação ocorreu com a desnaturação inicial de 94 °C por 4min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento a 63 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e 30s e a extensão final 72 °C por 7 min.

Os produtos das PCR foram submetidos a eletroforese utilizando gel de agarose 1,5% (0,5% TBE), acrescido de 5  $\mu\text{L}$  do intercalante de DNA Sybr Safe 10.000X Gel Stain (Invitrogen, USA). Um total de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra das amplificações da PCR foi carregado em cada poço. Como marcador de peso molecular, 10  $\mu\text{L}$  do 1Kb Ladder (Invitrogen). As amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de 80v por 1:30h e, após esse tempo, o gel foi levado sob luz UV no fotodocumentador (Dyna Light Gel logic 112, Kodak). O resultado da Rep-PCR amplificado foi utilizado para a construção do dendograma através do programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Belgium).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Um total de 23 isolados de BAL foram submetidos a extração e purificação de DNA, pelo método de pérolas de vidro (Sambrook e Russel, 2001). Além dessas, foram realizadas simultaneamente a extração de DNA de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Rhodococcus equi*. Na figura 5 é demonstrada a eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de DNA. Como pode ser visualizado, embora possa ser visualizado DNA com a utilização da metodologia de pérolas de vidro, os resultados para extração de DNA para BAL não foram satisfatórios, uma vez que algumas amostras não obtiveram uma boa visualização das bandas de DNA. Nas amostras 6, 14, 17, 18, 22, 27 (Figura 5A) pode ser visualizada uma banda de DNA mais fraca. Entretanto, essa metodologia também não foi eficiente para os demais microrganismos usados como controle e submetidos a extração ao mesmo tempo das BAL (Figura 5A e B).

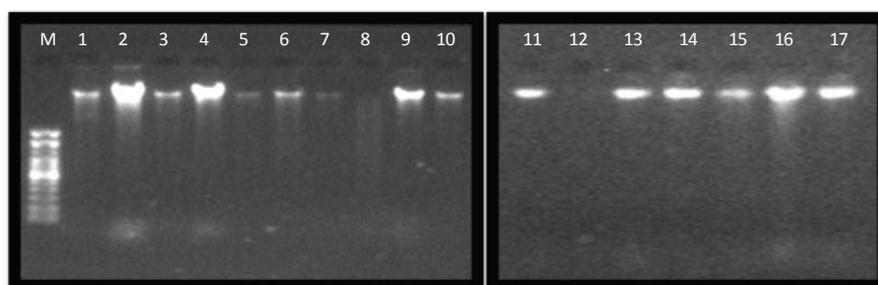


**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA extraído através do método de pérolas de vidro. A- 1. Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 2- *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 (controle); 3- *E. coli* ATCC 8739 (controle); A- 4 a 16 isolados de BAL; B-17 a 26 isolados de BAL; 27- *Rhodococcus equi* isolado LAPEMI (controle).

A metodologia de extração por pérolas de vidro para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tem sido relatada por diferentes autores, pelo fato de ser mais barata e eficiente. Rosa et al. (2017) e Ferrasso (2015) relataram a extração de DNA e utilização em PCR para as bactérias Gram-negativas, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* spp., respectivamente. Para bactéria Gram-positiva, Mendonça (2008) relatou o uso dessa metodologia para obtenção de DNA de *Listeria monocytogenes*, para em seguida utilizar em ensaios de amplificação gênica por PCR. Diante desses estudos citados, pode se verificar a eficácia deste protocolo de extração. Porém, será necessário realizar novas extrações e/ou adaptações no protocolo para tentar melhorar eficiência desta metodologia para extração de DNA de bactérias ácido lácticas e as demais patogênicas extraídas.

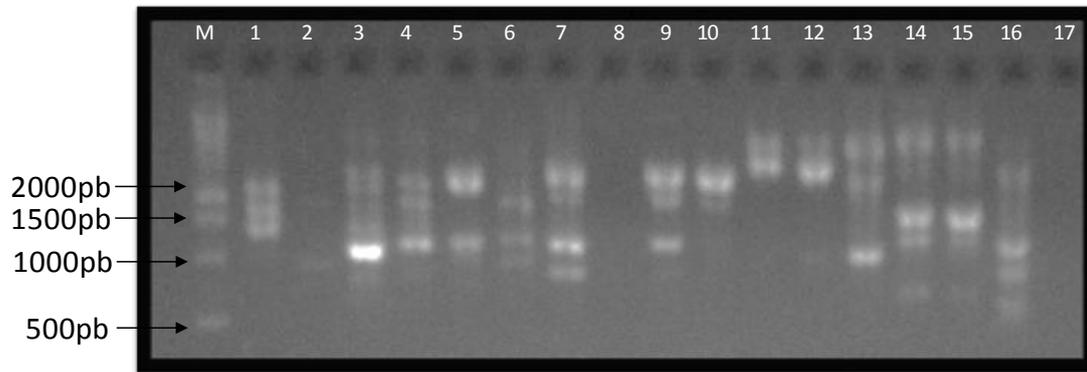
Após a tentativa de extração de DNA pela metodologia de pérolas de vidro, foi utilizado o kit comercial PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Califórnia, USA) de extração

de DNA genômico. Entretanto, foram escolhidas as amostras de isolados de BAL de queijos de coalho, as quais tiveram resultados de inibição de outras bactérias (antagonismo), realizado em outro ensaio em paralelo (SILVA, 2011, SILVA, 2019). Desta forma, foram utilizadas 13 amostras dos isolados de BAL e mais cinco cepas padrão, duas (2) *L. delbrueckii*; duas (2) *L. casei* Shirota, um (1) *Lactobacillus* spp., totalizando 16 amostras. Após o cultivo das amostras, as mesmas foram submetidas a extração pelo kit. Conforme visualizado no gel de agarose (figura 6), a extração de DNA obteve resultado satisfatório e os mesmos foram armazenados congelados a -20°C, para subsequente análise por PCR.



**Figura 6.** Eletroforese do DNA extraído através do kit PureLink Genomic DNA. M- Marcador 100pb (Ludwig, Porto Alegre, Brasil); canaletas: 1- Q5.2; 2- *Lactobacillus* spp.; 3- Q10.1; 4- *L. delbrueckii*; 5- Q12.2; 6- Q11.1; 7- Q12.3; 8- *L. casei* Shirota; 9- *L. delbrueckii*; 10- Q1.3; 12- *L. casei* Shirota; 13- Q13.1; 14- Q10.2; 15- Q5.1; 16- Q6.1; 17- Q9.2.

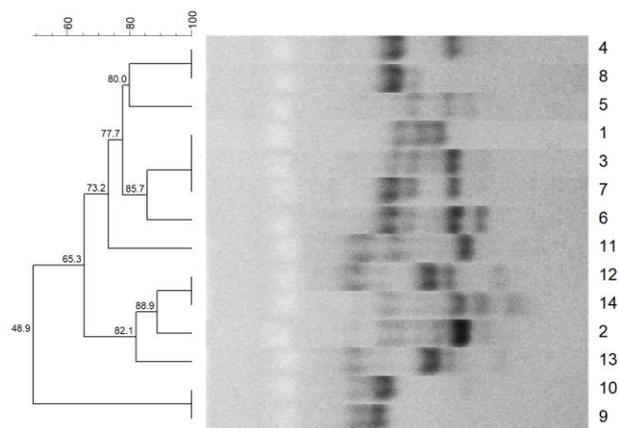
As amostras de DNA de BAL foram utilizadas para realizar a análise genética por Rep-PCR. Os padrões de amplificação das BAL estão demonstrados na eletroforese em gel de agarose (Fig. 7). Com exceção das amostras Q12.1 (canaleta 2) e Q1.3 (canaleta 8), todas tiveram amplificação esperada por Rep-PCR. Entretanto, a eletroforese no gel de agarose não obteve uma separação das bandas adequada (Fig. 7). Assim, não propiciou que se tivesse uma discriminação ideal quando foi realizada a construção do dendrograma (Fig. 8, Tab.3). As canaletas 2 e 8, amostras Q12.2 e Q1.3, não foi visualizado amplificação pela técnica de Rep-PCR, desta forma, possivelmente as mesmas não sejam bactérias ácido lácticas, em face da especificidade do primer utilizado. Em trabalhos publicados com análises por Rep-PCR de BAL isolados de queijos por Perin (2016) e Martins (2018), foram verificados similaridade genéticas entre os microrganismos, gerando *fingerprints* específicos para cada grupo de bactérias.



**Figura 7.** Perfil de eletroforese em gel de agarose dos produtos de Rep-PCR de BAL. M - Marcador de peso molecular de 1Kb Ladder (Invitrogen); 1- *Lactobacillus* spp.; 2- Q12.2; 3- Q10.1; 4- Q5.2; 5- Q11.1; 6- Q12.3; 7- Q10.2; 8- Q1.3; 9- Q9.2; 10- Q5.1; 11- Q11.2; 12- Q13.1; 13- Q6.1; 14- *L. delbrueckii* ATCC 8739; 15- *L. delbrueckii* ATCC 8739; 16- *L. casei* cepa Shirota (Controle negativo).

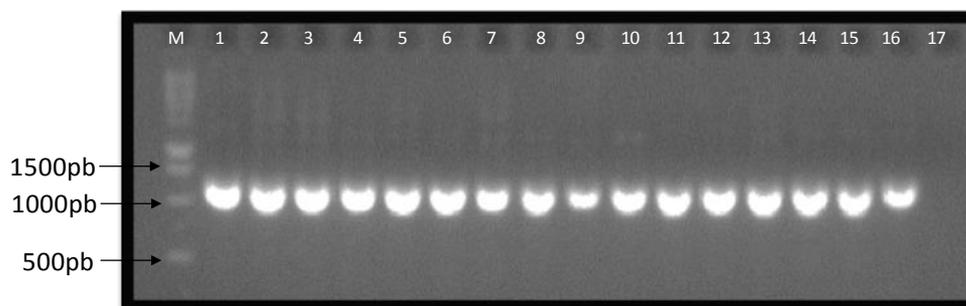
**Tabela 3.** Numeração, nome e morfologia das BAL no dendrograma, a partir da análise de Rep-PCR.

Número/Nome	Morfologia	Morfologia
1. <i>Lactobacillus</i> spp.	Bacilos	8. Q5.1
2. Q10.1	Bacilos	9. Q11.2
3. Q5.2	Cocos	10. Q13.1
4. Q11.1	Bacilos	11. Q6.1
5. Q12.3	Bacilos	12. <i>L. delbrueckii</i>
6. Q10.2	Bacilos	13. <i>L. delbrueckii</i>
7. Q9.2	Bacilos	14. <i>L. casei</i> Shirota



**Figura 8.** Dendrograma das amostras de BAL derivado a partir da análise de Rep-PCR.

Visando o futuro sequenciamento e identificação das BAL isoladas de queijos de coalho do agreste de Pernambuco, foram realizadas as ampliações gênicas do rRNA 16s por PCR, utilizando primers universais. Na figura 9 são demonstradas as ampliações (amplicon de 900 pb) de 16 isolados de BAL, sendo doze (12) isolados de queijos de coalho, três (3) cepas padrões (*L. delbrueckii* e *L. casei*) e um (1) isolado de BAL (*Lactobacillus* spp.). As mesmas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para serem enviadas futuramente para realização de sequenciamento e identificação dos microrganismos. Em trabalho publicado por Costa (2016), é relatado que o sequenciamento de gene rRNA 16S de BAL é um método eficaz para identificação de bactérias ácido lácticas, visto a similaridade e as dificuldades encontradas para realização da identificação fenotípica de BAL.



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose de produtos de rRNA 16S amplificados por PCR. M- Marcador 1 Kb Ladder (Invitrogen); 1 a 16- Amostras de BAL; 17- Controle negativo.

Diante dos dados gerados neste estudo, ainda não se pôde ser concluído a identificação final dos microrganismos isolados a partir de amostras de queijos de coalho. Entretanto, os dados obtidos servirão para seguir na identificação das bactérias. Desta forma, a partir de novas análises por PCR e sequenciamento, a identificação final dos isolados poderá ser realizada. A técnica de Rep-PCR possibilitou a construção do dendrograma, porém este não foi discriminatório devido a não separação eletroforética das bandas, não sendo possível estabelecer uma maior similaridade e identificação das BAL. No entanto, a Rep-PCR possibilitou que as mesmas fossem caracterizadas como pertencentes ao grande grupo de BAL, tendo uma diversidade genética entre elas.

## **5 CONCLUSÃO**

Diante dos dados obtidos no presente estudo foi possível realizar a caracterização inicial de bactérias ácido lácticas, a fim de ter a identificação taxonômica e estabelecer um monitoramento das BAL isoladas de queijo de coalho do agreste de Pernambuco, com interesse de descobrir seu potencial probiótico e outros aspectos benéficos para a saúde humana.

## REFERÊNCIA

ALMEIDA, M.E.; SERAFIM, R.C.; EÇA, L.P.M. Apresentação de algumas técnicas utilizadas na biologia molecular. In: EÇA, L.P., et al. **Biologia Molecular, Guia Prático e Didático**, Rio de Janeiro: Revinter, 2004, p. 145-176.

ANVISA. **Probióticos**. 2018. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset\\_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/5409406](http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/5409406)>. Acesso em: 17 jun 2019.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, 28(4): 281-285, 2002.

CARVALHO, J.D.G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. São Paulo, 2007. Originalmente apresentado como Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2007.

CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; COMES, J.E.; DUARTE, F.R.; TSAI, S.M.; Aplicação da técnica de REP-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. **Revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 43(3): 309-320, 2006

COCOLIN, L.; DOLCI P.; RANTSIOU, K.; Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. **Meat Science**, 89: 296-302, 2011.

COSTA, A.C.C.C., **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistema de bioconservação de produto lácteo**. Originalmente apresentado como Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Goiás, Goiás, Goiânia, 2016.

EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico Microbiota Láctica de Queijos Artesanais**. dezembro de 2009. Disponível em: <[www.cnpat.embrapa.br/download\\_publicacao.php?id=268](http://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=268)>, Acesso em: 17 de junho de 2019.

EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico Caracterização Molecular de Bactérias Lácticas Endógenas de Queijo de Coalho**. novembro de 2011. Disponível em:

<[www.cnpq.br/embrapa.br/download\\_publicacao.php?id=345](http://www.cnpq.br/embrapa.br/download_publicacao.php?id=345)>. Acesso em: 17 de junho de 2019.

FERRASSO, M.M. **Rastreamento de Salmonella no fluxograma de abate de suínos**. Pelotas. Originalmente apresentado como Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

GANDRA, E.A., T.K.V; MELLO, W.S.; GODOI, H.S.; Técnicas moleculares aplicadas a microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology.**, 30(1): 111-112, 2008.

GHASEMIANA, A.; ESLAMIB, M.; SHAFIEIC, M.; NAJAFIPOURA, S.; RAJABID, A. Probiotics and their increasing importance in human health and infection control. **Reviews in medical microbiology**, 29(4): 153-158, 2018.

JAY, M.J. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 131p.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotic Bacteria Today and Tomorrow. **The Journal of Nutrition**, 130(2): 415-416, 2000.

KOMATSU, T.R. et al., Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(3), p.3, 2008.

LUONGO, D.; MIYAMOTO, J.; BERGAMO, P.; NAZZARO, F; BARUZZI, F.; SASHIHARA, T.; TANAABE, S.; ROSSI, M.; Differential Modulation of innate immunity in vitro by Probiotic Strains of *Lactobacillus gasseri*. **Revista BMC Microbiology**: 13(298): 2, 2013.

MENDONÇA, M. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra InIA de *Listeria monocytogenes***. Originalmente apresentado como Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MACEDO, A.C.; TAVARES, T.G.; MACATA, F.X.; Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Revista Food Microbiology**, 21(2):233-240, 2004.

MARTINS, M.C.F.; FREITAS, R.; DEUVAUX, M.R.E.; NERO, L.A.; CARVALHO, A.F.C. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Elsevier**, 108, p.295-300, 2018.

MATOS, P.M.S. **Probióticos**. Universidade de Porto, Porto, 2010. Disponível em: <<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/53386/2/ProbiticosPedro%20MSM.pdf>>.

Acesso em: 05 de julho de 2019.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R; BARROS, M.A.F.; ORTOLANI, M.B.T.; BELOTI, V.; FRANCO, B.D.G.M.; *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**. 55(2):299-305, 2008.

PARVEZ, S., Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, 100(6): 1171-1185, 2006.

PEREIRA M.E.S.P., **A realização de práticas na identificação de bactérias ácido-láticas**. In: II Congresso Internacional das Ciências Agrárias, COINTER, 2017.

PERIN, L.M. **Diversidade molecular da microbiota Láctica bacteriocinogênica de Leite de cabra e caracterização de seu potencial bioconservador para a produção de queijo minas**. Minas Gerais, 2016. Originalmente apresentado como Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2016.

ROSA, J.V.; CONCEIÇÃO, N.V.; PEREZ, I.; TIMM, C.D.; Formação de biofilme após estresse subletal por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de camarão-rosa. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, 18(1):3, 2017.

ROSSI, G.A.M.; VIDAL, A.M.C.; NETTO, A.S.; AGUILAR, C.E.G. Fluxograma de produção de leite e derivados. VIDAL, A. M. C.; NETTO, A. S.; **Obtenção e Processamento do Leite e Derivados**. São Paulo: Editora da Universidade São Paulo, 2018. p.147-217.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor**, New York, 2001.

SILVA, L.J.M., **Isolamento e caracterização bioquímica das Bactérias ácido láctica do queijo São Jorge DOP**. Angra do Heroísmo, 2011. Originalmente apresentado como Dissertação de Mestrado, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

SILVA, J.B. **Ação antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas a partir de queijo de coalho artesanal**. Originalmente apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, Pernambuco, 2019.

## **ANEXOS**

### **Protocolo de Extração pelo Método de Pérolas de Vidro (adaptado a partir de Sambrook e Russel, 2001):**

1. Pellet de 1,5 mL do cultivo de BAL, overnight 24 ou 48h (dependendo do crescimento microbiano);
2. Ressuspender em 150  $\mu$ L do tampão STES;
3. Adicionar aproximadamente 50  $\mu$ L de pérolas de vidro;
4. Adicionar 150  $\mu$ L de feno-clorofórmio, utilizando somente o clorofórmio;
5. Homogeneizar por vortex vigorosamente por 1 min;
6. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min;
7. Coletar o sobrenadante (~100  $\mu$ L) e precipitar com álcool (~ 200  $\mu$ L) e acetato de potássio (~ 10  $\mu$ L);
8. Colocar durante 20 min a -20°C;
9. Centrifugar durante 20 min a 13.000 rpm;
10. Lavar o pellet com álcool 70%;
11. Eluir com 45  $\mu$ L de TE;
12. Adicionar 1  $\mu$ L de RNase;
13. Checar através da eletroforese, utilizando a cuba com tampão Tris/Borate/ EDTA (TBE) 0,5x, com voltagem de 100v, em gel de agarose a 1,5% corado com 5  $\mu$ L do gel SYBR Safe (Invitrogen), DNA mais 2  $\mu$ L de Blue Juice gel loading buffer a (10x).

### **Protocolo de Extração pelo Kit PureLink Genomic DNA: (Invitrogen).**

1. Pellet de 1,5 mL do cultivo de BAL, overnight 24 ou 48h (dependendo do crescimento microbiano);
2. Resuspender o pellet em 180  $\mu$ L do digestion lysosyme buffer. Vortezizar rapidamente;
3. Incubar a 37° C por 30 min em banho maria;

4. Adicionar 20  $\mu\text{L}$  da Proteinase K. Vortezizar rapidamente;
5. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  PureLink™ genomic lysis. Vortezizar rapidamente;
6. Incubar a 55° C por 30 min em banho maria;
7. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de etanol 96%. Vortezizar rapidamente;
8. Colocar toda a solução (~ 640  $\mu\text{L}$ ) preparado com o PureLink™ Genomic Lysis em um tubo de coleta do pacote que contenha filtro (Spin Column);
9. Centrifugar o Spin Column a 10.000 x g por 1 min em temperatura ambiente;
10. Descartar o tubo "PureLink™ collection tubes" (parte inferior) e o Spin Column deverá ser colocado em uma novo tubo "PureLink™ collection tubes" que o kit fornece;
11. Adiciona 500  $\mu\text{L}$  do Wash Buffer 1, no Spin Column e centrifugar por 10.000 x g por 1min em temperatura ambiente;
12. Descarta o tubo "PureLink™ collection tubes" (parte inferior) e o Spin Column deverá ser colocado em uma novo tubo "PureLink™ collection tubes" que o kit fornece;
13. Adiciona 500  $\mu\text{L}$  do Wash Buffer 2, no Spin Column e centrifugar por 10.000 x g por 3min em temperatura ambiente, descarta o "PureLink™ collection tubes";
14. Coloca em um eppendorf de 1,5 mL o Spin Column;
15. Adiciona 50  $\mu\text{L}$  de PureLink™ Genomic Elution Buffer no Spin Column;
16. Incuba por 1min em temperatura ambiente;
17. Após a incubação centrifugar por 10.000 x g por 1min em temperatura ambiente;
18. Se precisar de mais DNA, faz o passo 15 e 16 novamente e centrifuga por mais 1,5 min em temperatura ambiente;
19. Checar através da eletroforese utilizando a cuba com tampão Tris/Borate/ EDTA (TBE) 0,5x, com voltagem de 100v, em gel de agarose a 1,5% corado com 5  $\mu\text{L}$  de do gel SYBR Safe (Invitrogen), utilizando 5  $\mu\text{L}$  de DNA mais 2  $\mu\text{L}$  de Blue Juice gel loading buffer a (10x).