

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AMANDA GIAZZI

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO PERFIL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS TIPO MINAS ARTESANAIS E LEITE  
CRU**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA  
2017

AMANDA GIAZZI

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO PERFIL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS TIPO MINAS ARTESANAS E LEITE  
CRU**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dra. Marly Sayuri Katsuda  
Co-orientador: Dra. Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA

2017

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

G436c Giazzi, Amanda  
Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru / Amanda Giazzi. - Londrina : [s.n.], 2017.  
76 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marly Sayuri Katsuda.  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto-Maia.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2017.  
Bibliografia: f. 46-60.

1. Microbiologia dos laticínios. 2. Bacteriologia - Cultura e meios de cultura.  
3. Ácido láctico. 4. Lactobacilo. I. Katsuda, Marly Sayuri, orient. II. Furlaneto-Maia, Luciana, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

## FOLHA DE APROVAÇÃO

# **CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO PERFIL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS TIPO MINAS ARTESANAIS E LEITE CRU**

por

**AMANDA GIAZZI**

**Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina às 14:00 horas de 27 de setembro de 2017. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:**

---

MARLY SAYURI KATSUDA, Dra  
UTFPR Campus Londrina  
Orientador

---

GISELLE APARECIDA NOBRE COSTA, Dra  
MESTRADO EM CIENCIA E TECNOL DO  
LEITE E DERIVADOS - UNOPAR  
Membro Examinador Titular

---

ALANE TATIANA PEREIRA MORALES,  
Dra  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA  
PPGEA - UTFPR Londrina  
Membro Examinador Titular

Visto da coordenação:

---

Profa. Lucia Felicidade Dias, Dra.  
(Coordenadora do PPGTAL)

A folha de aprovação assinada encontra-se arquivada na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

## RESUMO

GIAZZI, Amanda. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru.** 2017. 74 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2017.

Com o objetivo de estudar o potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas (BAL), isoladas de amostras de queijos e leite, foram realizadas as análises de atividade enzimática, resistência a antibióticos de uso clínico, atividade antagonista e capacidade de acidificação. Foram identificados 14 isolados composto por gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Pediococcus* através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. Os isolados Bal 3 (*Enterococcus* sp) (37 °C) e Bal11 (*Enterococcus durans*) (20 °C) apresentaram a melhor atividade enzimática frente ao Tween 20, todavia, nenhum dos isolados apresentou atividade lipolítica para azeite de oliva nem atividade proteolítica para a caseína do leite. Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina e resistentes a estreptomicina e apenas três isolados mostraram resistência à gentamicina. A maioria das BAL em estudo foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos *E. coli* enteropatogênica, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria innocua* CLIP 12612 e *Listeria monocytogenes* CDC 4555, sendo as culturas dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* as que apresentaram melhor atividade antagonista para todas as bactérias patogênicas estudadas. *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium* não foram inibidos pelos isolados testados neste estudo. Todos os isolados reduziram os valores de pH e produziram ácido láctico a temperatura de 20 °C e 37 °C, com diferença estatística pelo método de Tukey para todos os períodos avaliados (6, 12, 24 e 48 horas). Mediante o exposto, é possível concluir que as BAL isoladas apresentam potencial para uso como culturas secundárias ou adjuntas para a fabricação de queijos.

**Palavras-chave:** *Enterococcus* sp. *Lactobacillus*. Lipólise. *Lactococcus* sp. *Streptococcus* sp. Atividade antagonista.

## ABSTRACT

GIAZZI, Amanda. **Characterization and technological profile study of acid lactic bacteria isolated from cheeses and milk.** 2017. 75p. Dissertation (Dissertation – Professional Master's Degree in Food Technology) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2017.

The objective to develop a lactic culture to elaborate a cheese with regional characteristics, acid lactic bacterias were isolated and identified from cheese and milk samples and evaluated to the enzymatic activity, common clinical antibiotic resistance, antagonistic activity and acidification capacity. The genders *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Pediococcus* were identified by the Polymerase Chain Reaction analysis. The isolates Bal 3 (*Enterococcus* sp) (37°C) and Bal11 (*Enterococcus durans*) (20°C) presented the best enzymatic activity to tween 20, however, none of the isolates presented enzymatic activity to olive oil, neither to milk casein. All isolates were sensitive to vancomycin and resistant to streptomycin and only three isolates showed resistance to gentamicin. The most part of the studied BAL were capable to inhibit the pathogens growth as enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella enteritides* ATCC 13076, *Listeria innocua* CLIP 12612 and *Listeria monocytogenes* CDC 4555, with the cultures from genders *Enterococcus* and *Lactobacillus* which presented better antagonistic activity. *The S. aureus*, *E. faecalis* and *E. faecium* were not inhibited by the tested isolates. All the isolates reduced the pH values and produced lactic acid at 20°C and 37°C with significant difference to all periods evaluated (6, 12, 24 and 48 hours). By means of the stated, it is possible to conclude that the isolated BAL has the potential use as a secondary culture to dairy products industry.

**Keywords:** *Enterococcus* sp. *Lactobacillus* homofermentativo. *Lactococcus* sp. *Streptococcus* sp. *Pediococcus* sp.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1- Fluxograma para identificação das características fenotípicas para o gênero de bactérias ácido lácticas. C: cocos; R: bacilos; (-) negativo; (+) positivo; L,D e LD- Isômeros óticos.....                          | 24 |
| Gráfico1- Distribuição da expressão de resistência e sensibilidade das BALs aos antimicrobianos: (GEN) Gentamicina; (VAN) Vancomicina; (TET) Tetraciclina; (EST) Estreptomicina; (CIP) Ciprofloxacina e (ERI) Eritromicina.. | 33 |

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Diversidade microbiana em função da região produtora de leite..                                    | 22 |
| Tabela 2- Identificação de culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de queijos e leite..... | 30 |
| Tabela 3. Atividade antagonista de bactérias ácido lácticas nos tempos 24 e 48 horas .....                   | 36 |
| Tabela 4- Valores médios do índice enzimático com Tween 20.....  | 38 |
| Tabela 5- Capacidade de acidificação (valores médios do pH a 20 °C e 37 °C).....                             | 42 |
| Tabela 6- Produção de ácido láctico (%) a 20 °C e 37 °C.....   | 45 |

## LISTA DE ABREVIações

BAL- Bactéria ácido láctica

BLAST- Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local

CIP- Ciprofloxacina

CLSI- Clinical Laboratory Standard Institute

ERI- Eritromicina

EST- Estreptomicina

GEN- Gentamicina

MH- Muller Hilton

MRS- Man Rogosa e Sharp ágar

NADH<sub>2</sub>- Dinucleotido de Nicotinamida e Adenina

NCBI- Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

Pb- Pares de bases

PCA- Plate Count Ágar

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

pH- Potencial Hidrogeniônico

TBE- Tris-Borato-EDTA

TE- Tris-EDTA

TET- Tetraciclina

UV- Ultravioleta

VAN- Vancomicina

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 14 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 16 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL.....   | 16 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 16 |
| <b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 17 |
| 3.1. QUEIJO .....  | 17 |
| 3.2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....  | 18 |
| 3.2.1 Propriedades tecnológicas das BALs para a produção de queijos .....          | 20 |
| 3.3. BIODIVERSIDADE MICROBIANA EM QUEIJOS ARTESANAIS.....                          | 21 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 23 |
| 4.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....                                    | 23 |
| 4.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....  | 23 |
| 4.2.1. Avaliação da produção de gás a partir da glicose.....                       | 24 |
| 4.2.2. Coloração de Gram.....  | 24 |
| 4.2.3. Atividade da Catalase.....  | 25 |
| 4.2.4. Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas .....                   | 25 |
| 4.2.5. Avaliação do crescimento em cloreto de sódio 18% .....                      | 25 |
| 4.2.6. Avaliação do crescimento em pH 4,4.....                                     | 25 |
| 4.3. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS BALs .....                                       | 26 |
| 4.4. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR ..... | 27 |
| 4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BALS.....                               | 27 |
| 4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTEOLÍTICO, LIPOLÍTICO E HIDRÍLISE DA LISINA.....    | 28 |
| 4.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO DAS BALS.....                         | 29 |
| 4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....  | 29 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 30 |
| 5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL .....                                       | 30 |
| 5.2. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....  | 32 |
| 5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS BALS .....                             | 35 |
| 5.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E HIDROLISE DA LISINA.....                               | 38 |
| 5.5. CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO.....   | 41 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | 46 |

|   |    |
|---|----|
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 47 |
| <b>ANEXO - Sequenciamento Genético das BAL isoladas de queijos e leite.</b> ..... | 62 |

## 1. INTRODUÇÃO

A aplicação em larga escala de um número limitado de cultura *starter* e o aumento do uso de leite pasteurizado tem resultado em pouca diversidade de queijos (WOUTERS et al., 2002). Em contrapartida, o mercado consumidor está buscando por produtos diversificados e com características regionais, o que vem estimulando algumas indústrias a desenvolverem queijos com sabor e aromas diferenciados aos queijos convencionais (HOORDE et al., 2008). Este fato tem estimulado a indústria pela busca de culturas de bactérias ácido láticas *non-starter* com propriedades funcionais para uso na indústria de laticínios e particularmente na produção de queijos. Diversos estudos têm focado no isolamento de linhagens com propriedades antimicrobianas ou potencial hidrolítico, a fim de contribuir na qualidade, aroma e sabor dos queijos (WOUTERS et al., 2002). Portanto, um melhor entendimento sobre a diversidade microbiana de queijos artesanais e leite cru são fundamentais no processo de inovação tecnológica.

Bactérias ácido-láticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos comumente utilizados na indústria de laticínios na elaboração de produtos lácteos fermentados (MADERA et al., 2003). Produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais, modificam gradativamente a textura e o aroma dos alimentos fermentados (GORI et al., 2013). Ainda, apresentam importantes propriedades tecnológicas, incluindo a acidificação, produção de exopolissacarídeos e atividade antibacteriana contra patógenos e, em alguns casos, resistência a antibióticos (MARROKI et al., 2011).

As BAL correspondem de 20-30% do total de bactérias presentes no leite cru, cujas espécies bacterianas encontradas dependem da estação do ano, das condições de produção, da origem do animal e do tipo de manejo, sendo que esta diversidade bacteriana está diretamente relacionada às diferenças sensoriais encontradas nos produtos lácteos artesanais (CABRAL et al., 2016; DELAVENNE et al., 2012).

São conhecidos os seguintes gêneros de BAL: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

*Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Todavia, os gêneros com maior importância são os *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella* (DANIEL et al., 2011).

O isolamento e o conhecimento do potencial tecnológico de espécies de BAL são de interesse industrial por revelar possíveis propriedades funcionais em algumas linhagens. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo isolar e estudar o perfil tecnológico de BAL a partir de amostras de queijos artesanais e leite cru adquiridos na região de Londrina no estado do Paraná.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e estudar o potencial tecnológico de Bactérias Ácido Láticas endógenas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru da região de Londrina-Paraná, Brasil.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar BALs de amostras de queijos tipo Minas artesanais e leite cru da região de Londrina-Paraná, Brasil;
- Proceder à caracterização fenotípica e genotípica dos isolados;
- Avaliar a resistência dos isolados a antimicrobianos;
- Avaliar o potencial antagônico dos isolados
- Avaliar a capacidade proteolítica e lipolítica dos isolados;
- Determinar a capacidade de acidificação dos isolados;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. QUEIJO

O queijo é um dos alimentos mais antigos que se tem registro na história da humanidade com sua produção iniciada por volta de 10.000 a.C., a partir da combinação ao acaso de temperatura ideal e bactérias ácido lácticas presentes no leite. Contudo, foi a partir do Império Romano que a produção queijeira passou a ser aperfeiçoada; as casas passaram a ter um local separado para a maturação dos queijos e, os conhecimentos adquiridos eram transmitidos de geração a geração, consolidando sua produção (SILVA, 2016 a).

O processamento do leite com decorrente produção de queijos possibilitou estender a vida útil dos derivados lácticos e facilitar seu transporte, tornando-os um dos principais alimentos da dieta dos agricultores pré-históricos (SALQUE et al., 2013).

Em decorrência da cultura autossuficiente das comunidades daquela época, com pouca troca de informações entre elas, somada aos fatores intrínsecos e extrínsecos (composição do leite, microbiota endógena, espécie e raça do animal, condições de armazenamento e crescimento de bolores ou outros microrganismos), é que existem hoje em torno de mil variedades de queijos com características bem definidas, obtidos de uma mesma matéria-prima (SILVA, 2016 a).

Atualmente, estima-se que 30% da produção mundial de leite são destinados a elaboração de queijos, sendo os holandeses, suíços, de massa filada, Cheddar e Parmesão, responsáveis por 80% da produção mundial. Todavia, destacam-se, também, os queijos considerados artesanais, representando cerca de 40% do volume total dos queijos produzidos no Brasil, com destaque para o queijo Minas artesanal, responsável pelo maior volume de produção do país e pela geração de renda de pequenos produtores rurais (SILVA, 2016 a).

No Brasil, as técnicas de elaboração de queijos foram introduzidas pelos colonizadores portugueses nos primeiros anos da colônia e sua produção teve início na região do Serro, em Minas Gerais, com a fabricação de um queijo

tipo caseiro, semelhante ao queijo serra-da-estrela de Portugal. Todavia, do ponto de vista industrial, o queijo passou a ser produzido a partir da década de 20, através de imigrantes dinamarqueses e holandeses, em Minas Gerais (FURTADO, 2010).

A produção de queijos é caracterizada como um processo de concentração do leite, no qual, parte dos componentes sólidos são concentrados na coalhada, enquanto as proteínas do soro, a lactose e os sólidos solúveis são removidos no soro. A denominação artesanal é atribuída de acordo com o modo de produção dos queijos, caracterizado pela não utilização de tratamento térmico ou adição de cultura iniciadora comercial (SEBRAE, 2008).

Os processos de acidificação e fermentação ocorrem em decorrência do metabolismo das bactérias do ácido láctico (BAL) presentes no leite cru, no soro e no ambiente das queijeiras, assim como são estas bactérias as responsáveis por conferir um sabor, aroma e textura peculiares ao produto final (SEBRAE, 2008).

### 3.2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

BAL compreendem um grupo bastante diverso de microrganismos que se encontram amplamente distribuídos na natureza e podem ser isolados de solos, água, plantas, silagens, ou mesmo do trato intestinal de animais e humanos (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Compreendem um grupo morfológicamente heterogêneo de cocos e bacilos, que podem estar dispostos em cadeia ou individualmente, Gram positivas, não esporuladas, catalase negativas e anaeróbicas facultativas. São essencialmente mesófilas, porém, são capazes de crescer num intervalo de temperaturas de 5 a 45 °C (JAY et al., 2005).

Produzem ácido láctico como o principal produto final da fermentação dos açúcares, estando envolvidas na acidificação dos produtos alimentares destinados à humanos e animais. Têm a capacidade de crescer em pH de 3,8 e produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (SILVA, 2010).

Além de produzirem o ácido láctico, as BAL também podem gerar diversos outros compostos, como o peróxido de hidrogênio, o dióxido de carbono, o diacetil, o acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza proteica, assim como, algumas linhagens também podem produzir um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas que transformarão os nutrientes presentes no leite em compostos com características sensoriais desejáveis, como por exemplo, formação de textura, redução do pH e retenção de umidade na massa de queijos, decorrentes da degradação da caseína pelas proteinases e peptidases (SILVA, 2010).

Pertencem ao grupo de BAL os microrganismos dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Estes microrganismos podem ser divididos em homofermentativos, se produzirem somente o ácido láctico ou em heterofermentativo se produzirem ácido láctico e outros compostos, como o dióxido de carbono, o ácido acético e o álcool (SILVA et al, 2016).

Em diferentes variedades de queijos, os lactobacilos homofermentativos *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* e *L. curvatus* e os heterofermentativos *L. brevis* são classes dominantes de BAL não *starter*, todavia, cepas de *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* são comumente utilizados como cultura *starter* na indústria de alimentos. Cepas autóctones tem sido usadas como cultura iniciadora por produzirem mais enzimas conversoras de aminoácidos que as culturas comerciais e, conseqüentemente, desenvolvem novos sabores aos queijos (SILVA, 2010).

Dentre as linhagens pertencentes ao grupo das BAL, a espécie *Lactococcus lactis*, tem sido utilizada na indústria alimentícia com o objetivo de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patógenos, uma vez que se apresenta capaz de produzir bacteriocinas, sejam proteínas ou peptídeos, com ação bactericida ou bacteriostática. Culturas mesófilas, como *Lactococcus spp.*, também são usadas na elaboração de produtos lácteos em uma variedade de queijos maturados e não-maturados (DE DEA LINDNER, 2008).

Embora estejam presentes em muitos produtos cuja matéria-prima principal é o leite, algumas espécies dos gêneros *Streptococcus* e

*Enterococcus* não estão entre os microrganismos de grande importância para aplicação de indústria, por serem considerados patogênicos, ou seja, agentes causadores de doenças infecciosas tanto em animais quanto em humanos. Todavia, *Streptococcus thermophilus* é amplamente utilizada para a fabricação de muitos queijos e atua na acidificação do meio e no desenvolvimento de propriedades sensoriais desejáveis, através de metabolização da lactose (GALIA et al., 2009).

### 3.2.1 Propriedades tecnológicas das BALs para a produção de queijos

A microbiota dos alimentos é composta por diferentes microrganismos de acordo com sua composição, etapas de produção, armazenamento e processamento. Para a indústria queijeira, os microrganismos desempenham funções importantes que contribuem para a maturação do queijo e influenciam na textura, sabor e aroma do produto final; e podem ser divididos em culturas iniciadoras (*starter*) ou culturas adjuntas, também denominadas de culturas secundárias (TAMANINI et al., 2012).

As BALs iniciadoras são responsáveis pela produção de ácidos durante a elaboração do queijo e contribuem para o processo de cura, conseqüentemente, inibem o crescimento de bactérias indesejáveis, proporcionando ao produto final segurança microbiológica com propriedades sensoriais e estruturais reproduzíveis. As culturas iniciadoras mais comumente utilizadas pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (COELHO, 2013).

A seleção da cultura iniciadora tem por base a sua ação na fermentação e nas propriedades pretendidas do produto, além da estabilidade durante a produção. Os principais atributos são a capacidade de acidificação e a produção de enzimas proteolíticas, responsáveis pelo aroma e textura dos queijos. Os lactococos possuem um sistema proteolítico que, juntamente com a quimosina e outras enzimas, convertem as caseínas em peptídios e aminoácidos, e são utilizados para a produção de uma grande variedade de queijos, manteiga e leites fermentados (COELHO, 2013; VON WRIGHT, 2012).

Por sua vez, as culturas adjuntas podem ser definidas como linhagens selecionadas de bactérias lácticas ou de outros microrganismos, com o objetivo

principal de melhorar a qualidade sensorial do produto. São culturas capazes de acelerar o processo de maturação, produzir o aroma pretendido e eliminar ou mascarar alguns possíveis defeitos de produção. De modo geral, a presença de culturas adjuntas resulta em um aumento da proteólise secundária e da atividade da aminopeptidase, enzima responsável pela redução do sabor amargo e pelo aumento da concentração de peptídeos de sabor desejável (BARROS et al. 2006).

No decorrer do processo de maturação, o número de bactérias presentes na cultura iniciadora é reduzido enquanto as culturas adjuntas, adicionadas ou originárias do leite, crescem até atingirem números superiores aos iniciadores. São consideradas culturas adjuntas os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, sendo as espécies mais comuns *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* (COELHO, 2013; BARROS et al., 2006).

### 3.3. BIODIVERSIDADE MICROBIANA EM QUEIJOS ARTESANAIS

Queijos artesanais são caracterizados por serem produzidos a partir de leite não tratado termicamente, desse modo, os microrganismos autóctones exercem a função de cultura iniciadora com formação de ácidos orgânicos, durante a fermentação. Também, atuam como culturas adjuntas, sendo responsáveis pelo processo de maturação e pelo desenvolvimento de sabor, odor e textura (SETTANI, MOSCHETTI, 2010).

Diversos autores brasileiros relatam a diversidade bacteriana como sendo fundamental para o desenvolvimento de queijo com características regionais (Tabela 1). Entretanto, dentre os gêneros que constituem o grupo das BAL, os *Enterococcus* spp., os *Lactococcus* spp., os *Leuconostoc* spp e os *Lactobacillus* spp foram os que apresentaram maior frequência de isolamento em queijos artesanais, sendo o último identificado na maioria dos trabalhos consultados, pressupondo que esse gênero bacteriano encontra-se presente desde o ambiente de ordenha até o estágio de maturação dos queijos em diferentes regiões do Brasil.

**Tabela 1.** Diversidade microbiana de queijos artesanais em função da região produtora de leite.

| Produto        | Região  | Microrganismos identificados  | Referência             |
|----------------|---|---|------------------------|
| Queijo Minas   | Região de Campos das Vertentes, em Minas Gerais | <i>E. faecalis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. garvieae</i>                    | Castro (2015)          |
| Queijo Serrano | Rio Grande do Sul                               | <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> e <i>L. fermentum</i>            | Delamare et al. (2012) |
| Queijo Minas   | Serra da Canastra, Minas Gerais                 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp | Resende et al. (2011)  |
| Queijo Minas   | região de Araxá                                 | <i>L.brevis</i> , <i>L.casei</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i>  | Silva (2016b)          |

Todos os autores da tabela 1 atribuíram à mistura de populações, em uma mesma amostra, como principal fator que contribui positivamente para o desenvolvimento do sabor ao alimento. Os resultados descritos nos trabalhos demonstram a biodiversidade presente em queijos artesanais brasileiros e sua importância no desenvolvimento de características sensoriais únicas para cada produto.

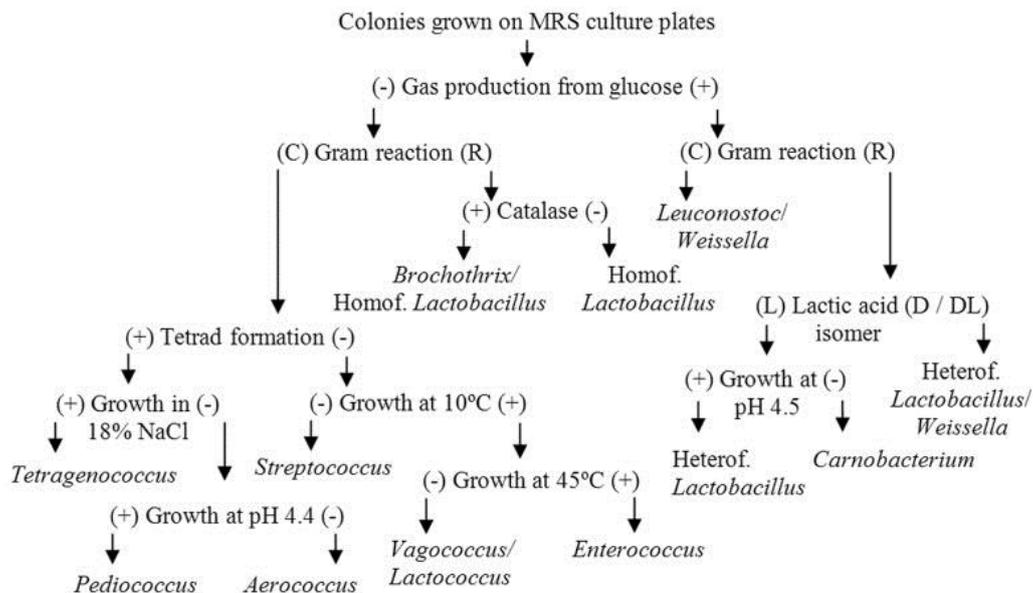
## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS**

O presente estudo foi conduzido utilizando 9 amostras de queijos artesanais produzidos na região norte do estado do Paraná-Brasil, sendo 4 amostras obtidas de feiras livres e 5 amostras de supermercados, e duas amostras de leite cru proveniente de produtores que fornecem leite para um laticínio em Araçongas –PR. O isolamento de BAL foi realizado conforme o protocolo descrito por HARRIGAN (1998), com modificações. Adicionou-se 25 gramas de cada amostra de queijo ou 25mL de cada amostra de leite em 225mL de solução peptonada 0,1% (Himedia) acondicionada em frascos, seguido de homogeneização por 2 minutos. Em seguida, procederam-se diluições seriadas e plaqueamento, em superfície, em placas contendo meio Man Rogosa Sharp solidificado (MRS) (Himedia). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Colônias com características distintas foram analisadas quanto a características fenotípicas e genotípicas.

### **4.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA**

Para a caracterização fenotípica e classificação presuntiva ao nível de gênero, os isolados foram submetidos a diferentes testes, de acordo com a sequência de classificação apresentada no fluxograma proposto por Kalchne et al.(2015) ilustrado na Figura 1. Os isolados com características sugestivas de BALs foram submetidos à identificação molecular e caracterização do perfil tecnológico.



**Figura 1.** Fluxograma para identificação das características fenotípicas para o gênero de bactérias ácido lácticas. C: cocos; R: bacilos; (-) negativo; (+) positivo; L, D e LD: Isômeros óticos. Kalschne et al (2015).

#### 4.2.1. Avaliação da produção de gás a partir da glicose

Para a avaliação da capacidade das BAL em produzir gás a partir da glicose, cada colônia isolada em meio MRS foi transferida para um tubo com 5 mL de caldo MRS, suplementado com 5% de glicose e um tubo de Durhan invertido. Em seguida, os tubos foram incubados a 30 °C por 48 horas. A produção de gás foi confirmada pela presença de bolhas no interior do tubo de Durhan (KALSCHNE et al., 2015).

#### 4.2.2. Coloração de Gram

Para a avaliação do formato celular e arranjo dos isolados, cada colônia foi submetida à reação morfotintorial pelo método de Gram.

Cada isolado foi transferido para uma lâmina de vidro, em esfregaço, fixado em chama e, colorido com o corante cristal violeta e uma solução de iodo e iodeto de potássio (Iugol). A preparação foi então tratada com um solvente orgânico com o objetivo de descolorir as células. Em seguida, foi adicionado um contracorante Fuccina. As células que retiveram o complexo

cristal violeta-iodo após a lavagem com o solvente, apresentando coloração azul-violeta escura, foram denominadas Gram positivas, enquanto àquelas coradas em vermelho foram denominadas Gram-negativas (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004).

#### 4.2.3. Atividade da Catalase

A avaliação da atividade da catalase se deu pela adição de peróxido de hidrogênio 3% à cultura, previamente cultivadas em MRS caldo a 30°C por 48 horas, por esfregação em lâmina de vidro. A formação de bolhas de gás é um indicativo de catalase positiva, enquanto a ausência de bolhas corresponde à catalase negativa (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004).

#### 4.2.4. Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

Para avaliar o crescimento dos microrganismos em diferentes temperaturas, as BALs foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a 10 °C por sete dias e a 45 °C por 48 horas (KALSCHNE et al., 2015).

#### 4.2.5. Avaliação do crescimento em cloreto de sódio 18%

Para avaliar o crescimento das bactérias em 18% de cloreto de sódio, os isolados foram inoculados em caldo MRS adicionado de cloreto de sódio 18% e incubados por 48 horas a 30 °C (KALSCHNE et al., 2015).

#### 4.2.6. Avaliação do crescimento em pH 4,4

Para avaliar o crescimento das bactérias em pH 4,4 , os isolados foram inoculados em caldo MRS e incubados por 48 horas a 30 °C. O pH do meio foi ajustado com solução de HCL 1M (KALSCHNE et al., 2015).

#### 4.3. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS BALs

O DNA total dos isolados de BAL foi extraído segundo metodologia descrita por HOFFMAN; WINSTON (1987), com modificações. Colônias cultivadas em caldo MRS foram ressuspensas em 100 µL de tampão Tris-EDTA (TE), seguido de 100µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e 0,3g de pérolas de vidro, para lise celular. A suspensão foi agitada em Vortex (KMC-1300V) por três minutos e centrifugada a 10.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para outro tubo e foi adicionado um volume de etanol 96%, para precipitação do DNA, e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. A fase líquida foi descartada e o DNA foi eluído em 50µL de tampão TE.

O método de identificação baseou-se na análise da região 16s do DNA ribossomal amplificado por PCR de acordo com Lane (1991) e Kullen et al. (2000). A reação de PCR foi realizada para um volume final de 20 µL, contendo 5 µL de tampão 10X, 1 µL de dNTP 0,05 mM, 3 µL de MgCl<sup>2</sup> 1,5 mM, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (PLB16 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; MLB16 5'- -GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3'), 0,25 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (Invitrogen) e 1 µL de DNA total.

A reação foi realizada em um termociclador com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos e 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por um minuto, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram corados com brometo de etídeo e revelados por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 % a 120 V, e o tamanho do produto amplificado foi comparado ao marcador de peso molecular 1Kb plus, observados em um sistema de captação de imagem (UVP).

Os DNAs amplificados foram purificados com kit Wizard Promega segundo fabricante e encaminhados para a empresa ATCgene Análises Moleculares (Alvorada-RS) para o sequenciamento do DNA. As sequências obtidas foram comparadas com os dados armazenados no Centro Nacional de

Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) utilizando a Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (BLAST).

#### 4.4. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os isolados BALS foram avaliados quanto à susceptibilidade à gentamicina (10 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), estreptomicina (30 µg), eritromicina (15 µg) e ciprofloxacina (5 µg), pelo método Kirby-Bauer (disco difusão em ágar). Colônias de cada isolado foram cultivadas em meio ágar Mueller Hinton (MH-Oxoid) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período as colônias foram suspensas em solução de NaCl (0,85%) até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  cels/mL), seguida de semeadura em superfície, com auxílio de Swabs, em meio MH solidificado. Discos impregnados com antimicrobianos (Laborclin) foram depositados sobre o meio inoculado. As placas foram incubadas a 37°C por 18 e 24 horas. Posteriormente, foi avaliada a presença ou ausência de halo de inibição, interpretados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2011).

#### 4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BALS

Os microrganismos patogênicos utilizados foram *Listeria monocytogenes* CDC 4555, *Listeria Innocua* CLIP 12612, *Escherichia coli* enterotoxigênica BAC 49 LT, *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

A avaliação da atividade antagonista de BALS foi realizada frente aos microrganismos patogênicos mencionados acima, segundo Ogaki et al. (2016). Cada isolado de BAL foi inoculado em placas contendo ágar MRS e incubado a 37 °C por 24 e 48 horas. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de clorofórmio nas tampas das placas, deixando agir por 40 minutos, para morte celular; em seguida o clorofórmio residual foi removido mantendo as placas abertas. Em seguida, as placas receberam uma sobrecamada de meio MRS soft ágar

(0,7%) contendo cada linhagem patogênica em uma concentração de  $10^6$  UFC/mL, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foram considerados isolados antagonistas aqueles que apresentaram uma zona de inibição de crescimento ao redor das colônias.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTEOLÍTICO, LIPOLÍTICO E HIDRÍLISE DA LISINA

As atividades enzimáticas de proteólise e lipólise foram determinadas pelo método de HANKIN; ANAGNOSTAKIS (1975) pela relação entre o a média do halo de degradação do substrato e a média da colônia, expresso como Índice Enzimático (IE).

Para a avaliação da atividade proteolítica, um volume de 10 µl de cada isolado (concentração  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi inoculado em placas contendo Plate Count Ágar (PCA) suplementado com 1% de leite Mólico 10%. Para a avaliação da atividade lipolítica, os isolados foram inoculados em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 0,5% de Tween 20 ou 0,5% de azeite de oliva.

As placas de ambos os testes foram incubadas a temperatura de 20 °C e 37 °C por período de até 360 horas e a mensuração do IE foi realizada nos tempos 24, 48, 120, 240 e 360 horas.

Para melhor observação do halo de proteólise, nos tempos 120, 240 e 360 horas de incubação, foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL de ácido acético 5% à superfície das placas. Já as placas do ensaio de atividade lipolítica foram submetidas à refrigeração (4°C) por aproximadamente 6 horas (STAMFORD et al., 1998).

Segundo Messias et al. (2011) a formação de halo claro ao redor da colônia é uma resposta da atividade da lipase secretada no meio sólido, sendo útil para a seleção de microrganismos lipolíticos.

A avaliação de hidrólise da lisina seguiu protocolo descrito por Araújo (2008), com modificações. Um volume de 100µl da cultura (concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) foram adicionados em um tubo contendo 3mL de caldo Lisina Descarboxilase, os quais foram incubados a 20°C e 37°C por 48 horas. O resultado positivo foi observado por meio da alteração de cor do meio de amarelo para púrpura.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO DAS BALS

Para avaliar a capacidade das BAL em acidificar o meio, 250µl da cultura contendo  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml foram adicionados em 25ml de leite Molico<sup>®</sup> 10%, esterilizado em autoclave a fluxo contínuo por 15 minutos, e incubada a 20 °C e 37 °C. O pH foi mensurado nos tempos 6,12, 24 e 48 horas (ARAÚJO, 2008). A acidez foi determinada por titulação nos tempos 24 e 48 horas, e o resultado expresso em percentual de ácido láctico, ou seja, g de ácido láctico por 100 mL (BRASIL, 2006).

#### 4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% através do programa STATISTICA 7 (Statsoft<sup>®</sup>, EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL

Um total de 41 colônias com características distintas foram isoladas das amostras de queijos e leite. Com base no fluxograma descrito por Kalschne et al (2015), 36 destas colônias foram consideradas agrupadas como pertencente às BAL's,. Estes isolados foram submetidos aos testes de atividade proteolítica, atividade lipolítica e hidrólise da lisina.

Quatorze isolados que apresentaram pelo menos uma atividade enzimática foram selecionados para a identificação genotípica (Tabela 2) e demais caracterizações tecnológicas.

**Tabela 2.** Identificação de culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de queijos e leite.

| Isolado | Fonte  | Gênero/Espécie                                   | Cepa         | Número de acesso ao Genbank (ID) |
|---------|--------|--|--------------|----------------------------------|
| Bal1    | Queijo | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | MFPB29D07-02 | JF756231.1                       |
| Bal2    | Queijo | <i>Enterococcus faecalis</i>                     | WVS356       | KM257699.1                       |
| Bal3    | Queijo | <i>Enterococcus</i> sp.                          | M194         | FJ513850.1                       |
| Bal4    | Queijo | <i>Lactococcus lactis</i>                        | PU-D         | KU568489.1                       |
| Bal5    | Queijo | <i>Enterococcus</i> sp.                          | LPi8         | JF718432.1                       |
| Bal6    | Queijo | <i>Streptococcus macedonicus</i>                 | SM203        | KM264319.1                       |
| Bal7    | Queijo | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                   | PglGER63     | KR054686.1                       |
| Bal8    | Queijo | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                   | NBRC 3425    | NR_113332.1                      |
| Bal9    | Queijo | <i>Enterococcus durans</i>                       | JCM 8725     | NR_113257.1                      |
| Bal10   | Queijo | <i>Enterococcus faecium</i>                      | AAU L7       | KJ396073.1                       |
| Bal11   | Queijo | <i>Enterococcus durans</i>                       | JCM 8725     | NR_113257.1                      |
| Bal12   | Leite  | <i>Enterococcus</i> sp.                          | M192         | FJ513848.1                       |
| Bal13   | Queijo | <i>Pediococcus pentosaceus</i>                   | E24          | KP189228.1                       |
| Bal14   | Queijo | <i>Enterococcus</i> sp.                          | 77ws         | AB675122.1                       |

Neste estudo foram isolados e identificados BAL provenientes de queijo e leite comercializados na região norte do estado do Paraná. Foram identificados 14 isolados que apresentaram pelo menos uma atividade enzimática, frente ao uso de proteína e lipídeo. No total, 57,14% dos isolados foram identificados como pertencente ao gênero *Enterococcus*, seguido de

14,29% do gênero *Lactococcus* e *Lactobacillus* e 7,14% de *Streptococcus* e *Pediococcus*.

Dias (2014) e Freitas (2011) relataram a predominância do gênero *Enterococcus* provenientes de queijos artesanais e leite. Contudo, esta predominância depende de vários fatores, que incluem manejo animal, temperatura ambiente, entre outras.

*Enterococcus* está relacionado ao desenvolvimento de características sensoriais de produtos fermentados, pela produção de compostos aromáticos voláteis e de sua atividade lipolítica, proteolítica ou pela sua capacidade de metabolizar o citrato (PRICHULA et al., 2016; MALLESHA et al., 2010).

A presença de *Lactococcus* em determinados queijos está diretamente relacionada ao processamento tecnológico ao qual este queijo foi submetido para sua elaboração. O cozimento da massa, processo de cura e maturação são etapas de produção de alguns queijos que não contribui com a incidência de *Lactococcus*. Outro fator relacionado à presença ou ausência de *Lactococcus* são níveis elevados de cloreto de sódio, impedindo seu crescimento na concentração superior a 5% (DIAS, 2014; FOX et al., 2000).

Ainda, bactérias do gênero *Lactococcus* também produzem importantes bacteriocinas, e, dentre as subespécies de valor tecnológico, o *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* confere melhor sabor ao queijo, enquanto o *Lactococcus lactis* subs. *lactis* proporciona sabor e aroma de manteiga, decorrente da produção de diacetil (FOX et al., 2000). Alguns autores relataram a presença de *Lactococcus* em queijos artesanais, porém em predominância menor quando comparado com outros gêneros, corroborando com o presente estudo (BEGOVIĆ ET AL. 2011; CARVALHO, 2007).

No presente estudo a presença de *Lactobacillus* não foi predominante, provavelmente porque o isolamento foi realizado em condições de aerobiose, bem como, pela característica de não competidora de culturas selvagens como o *Enterococcus*, por exemplo, ou por apresentar características heterofermentativas, o que dificulta a sua predominância nos queijos. Todavia, Siezen e Vlieg (2011), Silva (2016a), Resende et al. (2011), Câmara (2012) e Nikolic et al. (2012) encontraram o *Lactobacillus* como o maior grupo dentre as BAL, isolados de queijos artesanais. Segundo Silva (2016a), *Lactobacillus* spp. são essenciais para o desenvolvimento das características sensoriais típicas

em queijos no decorrer da maturação, além de, algumas espécies, apresentar propriedades probióticas que conferem benefícios à saúde do consumidor.

O presente estudo revelou 1 isolado pertencente ao gênero *Streptococcus* e 1 isolado pertencente ao gênero *Pediococcus*. Souza (2015) relatou a frequência de *Streptococcus* como sendo um gênero comum em produtos lácteos fermentados como cultura *starter* ou iniciadora. Todavia, no presente trabalho foi isolada apenas uma bactéria pertencente a esse gênero, sendo identificado como *S. macedonicus*. Esta espécie é reconhecida por ser moderadamente acidificante e proteolítica, sendo recomendada como cultura adjuvante multifuncional para o fabrico de produtos lácteos (VUYST, 2008).

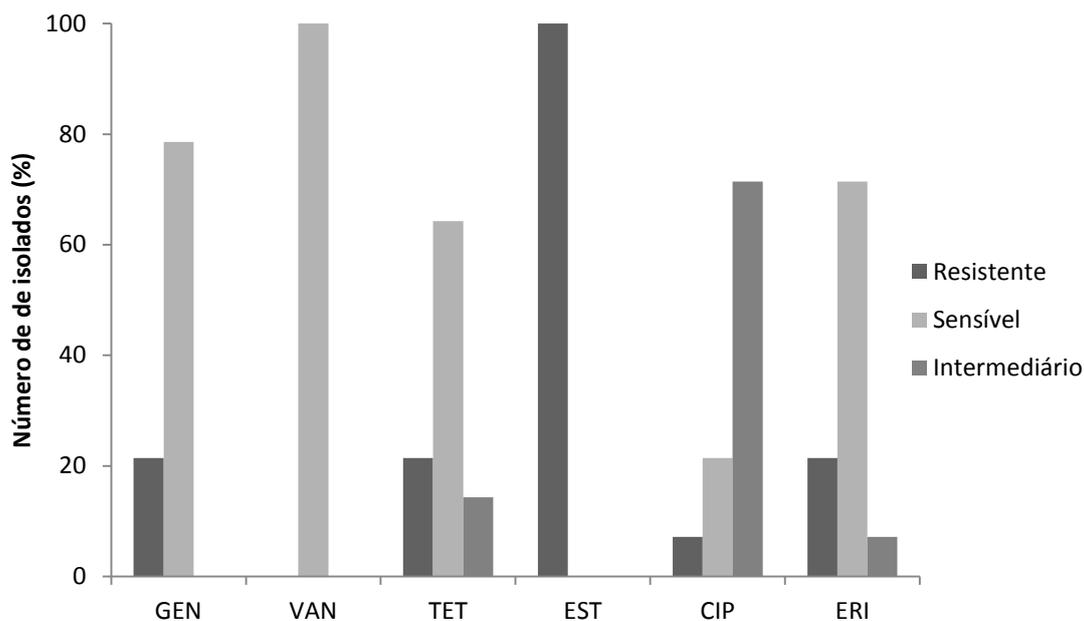
No contexto da microbiologia de alimentos, o *Pediococcus* tem sido considerado benéfico aos animais, podendo ser utilizados como cultura *starter* ou mesmo como probiótico (RAMOS, 2009; RIBEIRO, 2012). Entretanto, poucas são as referências que identificaram significativamente esse gênero em amostras de leites e queijos artesanais. Ramos (2009) isolou 9,3% de *Pediococcus* em amostras de queijo de Coalho do Sertão Alagoano, valor superior ao encontrado em nosso estudo.

## 5.2. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os dados do perfil de resistência e sensibilidade mostraram que 100% dos isolados apresentaram resistência à estreptomicina e sensibilidade à vancomicina (Figura 2).

Entre os isolados, 21,43% apresentaram resistência à gentamicina (Bal3 (*Enterococcus sp*), Bal6 (*St. Macedônicos*) e Bal11 (*E. durans*)), 21,42% à tetraciclina (Bal3 (*Enterococcus sp*), Bal7 (*Lb. rhamnosus*) e Bal11 (*E. durans*)) e 21,43 à eritromicina (Bal6 (*St. Macedônicos*), Bal7 (*Lb. rhamnosus*) e Bal11 (*E. durans*)), enquanto a maioria dos isolados foram sensíveis a estes antimicrobianos.

O isolado Bal3 (*Enterococcus sp*) foi o isolado que apresentou resistência a um maior número de antimicrobianos, sendo sensível apenas à vancomicina.



**Figura 2.** Distribuição da expressão de resistência e sensibilidade das BALs aos antimicrobianos: (GEN) Gentamicina; (VAN) Vancomicina; (TET) Tetraciclina; (EST) Estreptomicina; (CIP) Ciprofloxacina e (ERI) Eritromicina.

Uma das preocupações quanto à segurança relacionada ao isolamento e uso de BALs é a resistência a antimicrobianos. A maioria dos isolados do presente estudo foi sensível aos antimicrobianos testados. Contudo, 100% dos isolados foram resistentes ao antibiótico estreptomicina. Os resultados no presente estudo corroboram com o descrito por Coelho (2013), Nero (2010) e Costa et al., (2013). Porém, este nível de resistência não impede que esses microrganismos sejam usados na produção de queijo, pois este grupo de bactérias pode apresentar resistência frente a este antimicrobiano. Bernardeau et al., (2008) relataram que os lactobacilos apresentam resistência natural aos antimicrobianos bacitracina, cefoxitina, ácido fusídrico, canamicina, metronidazol, norfloxacin, sulfadiazina, teicoplanina, gentamicina, estreptomicina, ciprofloxacina e vancomicina.

Em relação às preocupações quanto ao uso de *Enterococcus* na fabricação de alimentos, diz respeito à resistência adquirida aos glicopéptidos, neste caso, a vancomicina (MORANDI et al., 2013). Entretanto, todas as estirpes testadas no presente estudo demonstraram ser sensíveis à vancomicina bem como a outros antibióticos clinicamente importantes (Figura 2).

Os resultados observados por Coelho (2013) quanto a sensibilidade ou resistência das BAL frente aos antimicrobianos vancomicina e estreptomicina vem a corroborar com os encontrados neste estudo, uma vez que todos os isolados do autor foram sensíveis à vancomicina e resistentes a estreptomicina. Costa et al., (2013) e Andrade et al., (2014) também verificaram altos níveis de resistência à estreptomicina. Em contrapartida, Sant'anna (2015) ao analisar a sensibilidade das bactérias ácido lácticas aos antimicrobianos de uso clínico obteve a resistência de todos os isolados à vancomicina e a maioria à gentamicina.

O isolado Bal1, pertencente à espécie *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* apresentou resistência apenas ao antimicrobiano estreptomicina, todavia, a resistência observada no isolado de lactococos pode ter ocorrido de maneira adquirida, pela transferência de genes de resistência, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos na alimentação e manejo de animais destinados ao consumo humano que contribuem para o aumento de microrganismos resistentes às drogas por pressão seletiva, ou seja, a exposição bacteriana aos agentes que induzem essas bactérias a se adaptarem a tal condição. Bactérias resistentes aos processos de pressão seletiva são capazes de propagar os genes de resistência via contato direto com os animais ou através de alimentos, água e resíduos agropecuários, todavia, na ausência da pressão seletiva os níveis de resistência são muito baixos, o que explica a sensibilidade dos demais isolados.

O isolado *S. macedonicus* submetido ao teste de resistência aos antimicrobianos teve seu crescimento inibido apenas pela vancomicina, enquanto que o isolado *P. pentosaceus* testado apresentou sensibilidade a 83,33% das drogas.

Silva (2011) ao avaliar o perfil de resistência de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo a antimicrobianos encontrou resultados semelhantes ao presente trabalho quanto a espécie *Lc. latiss* spp. *Lactis*, que apresentou sensibilidade à gentamicina, à penicilina, à ampicilina, à norflaxina e ao sulfametoxazole/trimetropina enquanto os resultados encontrados por Silva, referentes às espécies *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* e *Pediococcus pentosaceus* foram diferentes aos obtidos neste estudo, uma vez

que apresentaram resistência a quase todos os antimicrobianos utilizados pelo autor.

Os isolados Bal7 e Bal8, pertencentes a espécie *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram resultados de resistência aos antimicrobianos diferentes entre si, enquanto o isolado Bal7 apresentou resistência aos antimicrobianos tetraciclina, estreptomicina e eritromicina, o isolado Bal8 foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

Segundo Bernardeau et al., (2008), os lactobacilos apresentam resistência natural a muitos antibióticos: bacitracina, cefoxitina, ácido fusídrico, kanamicina, metronidazol, norfloxacin, sulfadiazina, teicoplanina, gentamicina, estreptomicina, ciprofloxacina e vancomicina, sendo os quatro últimos citados utilizados na análise em questão; embora os *Lactobacillus* homofermentativos estritos sejam sensíveis à vancomicina. Entretanto, a resistência não pode ser transferida para outros microrganismos potencialmente patogênicos.

Resultados similares foram observados por Costa et al., (2013), em que a maioria das estirpes foram classificadas como resistentes ao antimicrobiano estreptomicina (Bal7) e todos os isolados apresentaram sensibilidade à tetraciclina e à eritromicina (Bal8). Nero (2010) também constatou a resistência de quase todos os seus isolados analisados aos antibióticos estreptomicina e eritromicina. Todavia, Costa et al. (2013) tiveram seus lactobacilos classificados como resistentes aos antibióticos gentamicina e vancomicina, resultados distintos aos encontrados neste estudo.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS BALS

Os resultados da atividade antagonista das BAL, nos tempos 24 e 48 horas, pela técnica da semeadura, frente aos patógenos *Listeria monocytogenes* CDC 4555, *Listeria innocua* CLIP 12612, *Escherichia coli* enterotoxigênica BAC 49 LT, *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* e *Salmonella enteritides* ATCC 13076 estão apresentados na Tabela 3.

No experimento conduzido por 24 horas, 57,14% dos isolados apresentaram atividade antagonista contra o patógeno *Listeria innocua* CLIP

12612, enquanto 14,28% dos isolados inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes* CDC 4555 (Bal8 (*Lactobacillus rhamnosus*) e Bal13 (*Pediococcus pentosaceus*)), *Escherichia coli* enterotoxigênica BAC 49 LT (Bal8 e Bal9 (*Lactobacillus rhamnosus*)) e *Salmonella enteritides* ATCC 13076. Todavia, 42,86% das Bals em estudo não apresentaram atividade antagonista contra os patógenos analisados em 24 horas.

**Tabela 3.** Atividade antagonista de bactérias ácido lácticas nos tempos 24 e 48 horas.

| Isolados | Tempo (Hs) | Patógenos                       |                          |                             |                   |                 |                   |                  |
|----------|------------|---------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|------------------|
|          |            | <i>E.coli</i><br><i>Enterot</i> | <i>S.</i><br><i>ent.</i> | <i>L.</i><br><i>Innocua</i> | <i>L.monocyt.</i> | <i>S.aureus</i> | <i>E.faecalis</i> | <i>E.faecium</i> |
| Bal1     | 24         | -                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | +                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
| Bal2     | 24         | -                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | +                               | +                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
| Bal3     | 24         | -                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | +                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal4     | 24         | -                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | -                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal5     | 24         | -                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
| Bal6     | 24         | -                               | -                        | -                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
| Bal7     | 24         | +                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | +                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal8     | 24         | +                               | -                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | +                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal9     | 24         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal10    | 24         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | +                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
| Bal11    | 24         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal12    | 24         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | -                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal13    | 24         | -                               | -                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |
| Bal14    | 24         | -                               | -                        | +                           | -                 | -               | -                 | -                |
|          | 48         | -                               | +                        | +                           | +                 | -               | -                 | -                |

+ resultado positivo, - resultado negativo.

No experimento conduzido por 48 horas, 100% das Bals apresentou atividade antagonista de pelo menos um patógeno analisado. Entre os isolados, 92,86% inibiu o crescimento de *L. innocua* CLIP 12612, 57,14% apresentou potencial inibitório frente à *L. monocytogenes* CDC 4555, 64,29% dos isolados inibiram o crescimento de *Salmonella enteritides* ATCC 13076 e 35,71% atuaram contra a reprodução de *Escherichia coli* enterotoxigênica BAC 49 LT.

Nos parâmetros aplicados neste trabalho, nenhum isolado inibiu *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium*. Entretanto, as culturas dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* foram as que apresentaram melhor atividade antagonista, com inibição de 57,14% (4 de 7) dos microrganismos patogênicos, demonstrando seu efeito benéfico na qualidade sanitária de alimentos lácticos.

Os isolados Bal2 (*E. faecalis*), Bal3 (*Enterococcus* sp.), Bal5 (*Enterococcus* sp), Bal7 (*Lb. rhamnosus*), Bal8 (*Lb. rhamnosus*), Bal9 (*E. durans*), Bal11 (*E. durans*), Bal13 (*Pediococcus pentosaceus*) e Bal14 (*Enterococcus* sp) apresentaram atividade inibitória contra *E. coli* enteropatogênica, *Salmonella*, *L. innocua* e *L. monocytogenes*.

A atividade antagonista das BAL autóctones já foi descrita, principalmente quanto a inibir bactérias Gram-positivas, tais como *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*, devido à dificuldade de interação das substâncias antagônicas com a parede e membrana plasmática das bactérias Gram-negativas, que possuem dupla camada lipídica externa (DIAS, 2014). Contudo, neste trabalho isso não foi observado, visto que muitos isolados lácticos apresentaram potencial antagonista frente a *E.coli* e a *Salmonella*.

A ação antagônica de *Enterococcus* pode ocorrer devido à produção de enterocinas (Acúrcio, 2011) enquanto a ação antagonista de *Lactococcus* sp pode ocorrer pela produção de nisina (Dias, 2014), além de outros compostos.

Em estudos realizados por Freitas (2011) quanto ao potencial antagonista de microrganismos lácticos contra *S. enterica*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, averiguou 100% de eficiência, dos isolados pertencentes ao gênero *Pediococcus*, frente a todos os patógenos submetidos ao teste, todavia, no presente estudo, os isolados não apresentaram atividade antagonista frente à *S. aureus*.

Outros estudos demonstraram a atividade antimicrobiana das BAL frente à *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E.coli*, *S. aureus* e *S. enterica sorovar typhimurium* (TAMANINI et al., 2012; HERMANNNS et al., 2013). Resultados que contribuem para a potencial utilização da microbiota endógena de derivados lácticos como cultivos iniciadores antimicrobianos.

#### 5.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E HIDROLISE DA LISINA

Os isolados não apresentaram atividade proteolítica em leite em pó reconstituído e atividade lipolítica em azeite de oliva.

Com relação à atividade lipolítica em tween 20, os isolados apresentaram ação enzimática após 120 horas de incubação nas temperaturas de 20 °C e 37 °C (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores médios do índice enzimático com tween 20 incubados nas temperaturas de 20°C e 37°C.

| Isolado | Médias*           |                   |                   |                   |                      |                     |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
|         | 20°C              |                   |                   | 37°C              |                      |                     |
|         | 120 horas         | 240 horas         | 360 horas         | 120 horas         | 240 horas            | 360 horas           |
| Bal1    | 0,00 <sup>b</sup> | 2,11 <sup>a</sup> | 2,74 <sup>c</sup> | 1,71 <sup>b</sup> | 1,90 <sup>defg</sup> | 2,02 <sup>f</sup>   |
| Bal2    | -                 | -                 | -                 | 1,23 <sup>c</sup> | 1,51 <sup>g</sup>    | 1,93 <sup>f</sup>   |
| Bal3    | -                 | -                 | -                 | 0,00 <sup>d</sup> | 3,81 <sup>a</sup>    | 3,91 <sup>a</sup>   |
| Bal4    | -                 | -                 | -                 | 2,06 <sup>a</sup> | 2,26 <sup>bcd</sup>  | 2,95 <sup>c</sup>   |
| Bal5    | 0,00 <sup>b</sup> | 1,56 <sup>b</sup> | 2,96 <sup>b</sup> | -                 | -                    | -                   |
| Bal6    | -                 | -                 | -                 | 0,00 <sup>d</sup> | 1,60 <sup>fg</sup>   | 2,17 <sup>def</sup> |
| Bal7    | -                 | -                 | -                 | 0,00 <sup>d</sup> | 2,11 <sup>cdef</sup> | 2,82 <sup>c</sup>   |
| Bal8    | -                 | -                 | -                 | 1,63 <sup>b</sup> | 1,77 <sup>efg</sup>  | 2,34 <sup>de</sup>  |
| Bal9    | -                 | -                 | -                 | 0,00 <sup>d</sup> | 2,65 <sup>b</sup>    | 3,39 <sup>b</sup>   |
| Bal10   | -                 | -                 | -                 | 0,00 <sup>d</sup> | 2,56 <sup>bc</sup>   | 2,82 <sup>c</sup>   |
| Bal11   | 0,00 <sup>b</sup> | 0,00 <sup>c</sup> | 3,13 <sup>a</sup> | 0,00 <sup>d</sup> | 2,33 <sup>bcd</sup>  | 3,10 <sup>bc</sup>  |
| Bal12   | 1,90 <sup>a</sup> | 2,22 <sup>a</sup> | 2,51 <sup>d</sup> | -                 | -                    | -                   |
| Bal13   | -                 | -                 | -                 | 2,10 <sup>a</sup> | 2,09 <sup>cdef</sup> | 2,13 <sup>ef</sup>  |
| Bal14   | -                 | -                 | -                 | 0,00 <sup>d</sup> | 1,66 <sup>fg</sup>   | 2,46 <sup>d</sup>   |

<sup>a,b</sup>- letras minúsculas iguais significam que não houve diferença estatística entre os isolados da mesma coluna. (p≤0,05).

(-): ausência de atividade.

Em 240 horas de análise a 20°C, os isolados Bal1 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), Bal5 (*Enterococcus* sp.) e Bal12, também apresentaram resultado positivo para atividade lipolítica, sendo Bal1 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) e Bal15 (*Enterococcus* sp.) os que obtiveram os maiores índices lipolíticos.

Quanto ao tempo 360 horas de incubação (20 °C), além dos isolados já citados anteriormente, Bal11 (*E. durans*) apresentou índice enzimático, sendo o maior valor médio observado (3,13), enquanto o isolado Bal12 (*Enterococcus* sp.) obteve o menor valor (2,51).

Em relação à análise desenvolvida na temperatura de incubação a 37°C, a maioria dos isolados analisados apresentaram atividade lipolítica utilizando tween 20, com exceção aos isolados Bal5 (*Enterococcus* sp.) e Bal12 (*Enterococcus* sp), que não apresentaram atividade lipolítica, indicando que a temperatura colaborou com a produção de lipases.

Os maiores índices lipolíticos observados a 37°C foram apresentados pelos isolados Bal4 (*Lactococcus lactis*) e Bal13 (*Pediococcus pentosaceus*) a 120 horas de incubação e Bal3 (*Enterococcus* sp) com 240 e 360 horas de incubação.

Com relação a hidrólise da lisina, os isolados que apresentaram capacidade de hidrolisar a lisina, em pelo menos uma das temperaturas testadas, foram Bal2 (*Enterococcus faecalis*, 37°C), Bal5 (*Enterococcus* sp., 20°C e 37°C) e Bal12 (*Enterococcus* sp, 37°C).

A proteólise consiste na degradação da proteína, com formação de peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos livres, através da ação de enzimas, resultando no sabor e aroma específicos de queijos, bem como na modificação na textura do produto (BEZERRA, 2015).

Com relação à atividade proteolítica de BALs, a espécie *Lactococcus lactis* é considerada o modelo da família das BALs, todavia, nas demais espécies já foram identificadas um número significativo de enzimas proteolíticas de funções desconhecidas, embora o grupo de BALs não seja considerado como sendo altamente proteolítico (FUQUAY; FOX, 2011). Entretanto, não foi observada atividade proteolítica para os isolados nas condições testadas.

A maioria das culturas lácticas *starter* possuem habilidade de hidrolisar as proteínas do leite para seu próprio crescimento e, eventualmente, para desenvolver sabor em queijos maturados. Quando uma cultura é capaz de quebrar a caseína e coagular o leite em 24 horas a 22 °C pela produção de ácidos, é denominada proteinase positiva, enquanto que, se uma cultura requer 48 horas ou mais para coagular o leite é denominada proteinase negativa (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1997).

Culturas frescas isoladas são primariamente proteinase positiva, todavia, durante o crescimento e transferência em um meio de cultivo, a proporção de proteinase negativa aumenta. Para a fabricação de queijos, as culturas proteinases positivas podem ocasionar sabor amargo, devido à formação de peptídeos amargos derivados da hidrólise da caseína, assim como, diminui o rendimento do queijo. A exemplo, o rendimento de queijo Cheddar aumenta em 2% ou mais quando adicionam culturas lácticas proteinases negativas em maior quantidade do que positivas. Uma desvantagem das culturas proteinase negativas é a baixa produção de ácidos, pois necessitam de duas a oito vezes mais tempo de acidificação do que os inóculos *starter*. Por essa razão, para manter a fabricação de queijos razoavelmente no cronograma e economicamente viável, uma mistura de BALS positivas e negativas pode ser feita (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1997).

Quanto à lipólise, as BALS apresentam geralmente fraca capacidade lipolítica quando comparadas a outros grupos de microrganismos, embora essa capacidade pode variar consideravelmente entre as espécies. Os Enterococos em geral, exibem atividade lipolítica mais elevada do que outras espécies de BAL e, entre os enterococos, a espécie *E. faecalis* é a que se destaca (COELHO, 2013; FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

De acordo com Collins; McSweeney; Wilkinson (2003), os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* são considerados pouco lipolíticos, todavia, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, quando incubados a 20 °C, esses gêneros bacterianos foram os que apresentaram os maiores valores para capacidade lipolítica.

No trabalho desenvolvido por Perri, (2010) ao estudar o perfil tecnológico de *Enterococcus* em queijo Coalho, 13,0% dos isolados apresentaram lipólise visível e definida com formação de zonas translúcidas,

enquanto que 87,0% apresentaram ausência de lipólise. Dentre os 129 isolados de *Enterococcus* obtidos por Sarantinopoulos et al. (2001), 90% foi capaz de hidrolisar todos os substratos que continham lipídeo.

Semelhantemente, Coelho (2013) ao avaliar as propriedades tecnológicas das BALs, quanto à atividade enzimática, obteve fraca atividade proteolítica e lipolítica, onde apenas um isolado foi capaz de degradar a caseína (*E. faecalis*) e somente dois isolados exibiram atividade lipolítica, sendo estes *L. lactis* e *E. faecalis*. No presente estudo, nenhum isolado apresentou capacidade de degradar a caseína.

#### 5.5. CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO

A capacidade de acidificação foi mensurada pelo monitoramento dos valores de pH nos tempos de incubação: 6, 12, 24 e 48 horas e pela produção de ácido láctico nos tempos 24 e 48 horas. Todos os isolados reduziram os valores de pH e produziram ácido láctico a temperatura de 20 °C e 37 °C, com diferença significativa para todos os períodos avaliados (Tabela 5).

De modo geral, o isolado Bal7 apresentou os maiores valores de pH para todos os períodos de incubação a 20°C, enquanto que a capacidade de acidificação apresentou valores distintos entre os isolados. O isolado Bal11 (*E. durans*) apresentou o menor valor de pH nas primeiras 6 horas de incubação a 20°C, enquanto os isolado Bal11 (*E. durans*) apresentou o menor valor de pH no tempo 12 horas de incubação, para a mesma temperatura.

Entre os isolados, 64,28% reduziram significativamente os valores de pH após 24 horas de incubação a 20°C, enquanto que o menor valor de pH apresentado no último período de incubação, 48 horas, foi obtido pelo isolado Bal9 (*E. durans*). Assim como o isolado Bal12 (*Enterococcus* sp.), a maioria dos microrganismos testados apresentaram redução significativa em seus valores de pH entre 24 e 48 horas de incubação, indicando uma tendência contínua de acidificação pelo tempo de incubação.

**Tabela 5.** Capacidade de acidificação (valores médios do pH a 20°C e 37°C).

| Isolados | Medias*               |                       |                     |                     |                      |                       |                      |                        |
|----------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
|          | 20°C                  |                       |                     |                     | 37°C                 |                       |                      |                        |
|          | 6 horas               | 12 horas              | 24 horas            | 48 horas            | 6 horas              | 12 horas              | 24 horas             | 48 horas               |
| Bal1     | 6,76 <sup>Ae</sup>    | 6,73 <sup>ABdef</sup> | 6,64 <sup>BCC</sup> | 6,54 <sup>Cab</sup> | 6,61 <sup>Ad</sup>   | 6,57 <sup>Adef</sup>  | 6,49 <sup>Aa</sup>   | 6,15 <sup>Ba</sup>     |
| Bal2     | 6,76 <sup>Ae</sup>    | 6,76 <sup>Abcde</sup> | 6,67 <sup>Bbc</sup> | 6,54 <sup>Cab</sup> | 6,78 <sup>Aabc</sup> | 6,70 <sup>Aabc</sup>  | 6,59 <sup>Aa</sup>   | 5,46 <sup>Babcd</sup>  |
| Bal3     | 6,77 <sup>Acde</sup>  | 6,76 <sup>Abcde</sup> | 6,70 <sup>Ab</sup>  | 6,45 <sup>Bb</sup>  | 6,79 <sup>Aabc</sup> | 6,63 <sup>Abcde</sup> | 6,02 <sup>Bbc</sup>  | 4,52 <sup>Cdef</sup>   |
| Bal4     | 6,81 <sup>Aab</sup>   | 6,77 <sup>Aabc</sup>  | 6,68 <sup>Bbc</sup> | 6,49 <sup>Cb</sup>  | 6,84 <sup>Aa</sup>   | 6,77 <sup>Aa</sup>    | 6,02 <sup>Bbc</sup>  | 3,92 <sup>Cf</sup>     |
| Bal5     | 6,77 <sup>Abcde</sup> | 6,75 <sup>ABcde</sup> | 6,71 <sup>Bab</sup> | 6,59 <sup>Cab</sup> | 6,83 <sup>Aa</sup>   | 6,69 <sup>Babc</sup>  | 6,48 <sup>Ca</sup>   | 4,39 <sup>Def</sup>    |
| Bal6     | 6,77 <sup>Acde</sup>  | 6,74 <sup>Acde</sup>  | 6,68 <sup>Bbc</sup> | 6,43 <sup>Cb</sup>  | 6,81 <sup>Aab</sup>  | 6,49 <sup>Bf</sup>    | 5,88 <sup>Ccd</sup>  | 4,39 <sup>Def</sup>    |
| Bal7     | 6,81 <sup>Aa</sup>    | 6,81 <sup>Aa</sup>    | 6,75 <sup>Ba</sup>  | 6,70 <sup>Ca</sup>  | 6,79 <sup>Aabc</sup> | 6,72 <sup>Aab</sup>   | 6,26 <sup>Bab</sup>  | 3,97 <sup>Cf</sup>     |
| Bal8     | 6,82 <sup>Aa</sup>    | 6,79 <sup>Aab</sup>   | 6,70 <sup>Bb</sup>  | 6,55 <sup>Cab</sup> | 6,74 <sup>Abc</sup>  | 6,60 <sup>Bcde</sup>  | 5,74 <sup>Ccde</sup> | 3,89 <sup>Df</sup>     |
| Bal9     | 6,80 <sup>Aab</sup>   | 6,77 <sup>Aabc</sup>  | 6,67 <sup>Abc</sup> | 6,18 <sup>Bc</sup>  | 6,81 <sup>Aab</sup>  | 6,66 <sup>Abcd</sup>  | 5,81 <sup>Bcde</sup> | 5,58 <sup>Babc</sup>   |
| Bal10    | 6,79 <sup>Aabcd</sup> | 6,75 <sup>Abcde</sup> | 6,68 <sup>Bbc</sup> | 6,52 <sup>Cab</sup> | 6,79 <sup>Aabc</sup> | 6,64 <sup>Abcde</sup> | 6,44 <sup>Aa</sup>   | 5,31 <sup>Babcde</sup> |
| Bal11    | 6,72 <sup>Af</sup>    | 6,70 <sup>Ag</sup>    | 6,67 <sup>Bbc</sup> | 6,57 <sup>Cab</sup> | 6,76 <sup>Aabc</sup> | 6,69 <sup>Aabc</sup>  | 6,61 <sup>Aa</sup>   | 5,34 <sup>Babcde</sup> |
| Bal12    | 6,76 <sup>Ade</sup>   | 6,72 <sup>ABef</sup>  | 6,69 <sup>Bbc</sup> | 5,78 <sup>Cd</sup>  | 6,72 <sup>Ac</sup>   | 6,70 <sup>Aabc</sup>  | 5,50 <sup>Be</sup>   | 4,59 <sup>Ccdef</sup>  |
| Bal13    | 6,81 <sup>Aab</sup>   | 6,77 <sup>ABabc</sup> | 6,72 <sup>Bab</sup> | 6,57 <sup>Cab</sup> | 6,82 <sup>Aab</sup>  | 6,72 <sup>Aab</sup>   | 6,39 <sup>Aa</sup>   | 5,75 <sup>Bab</sup>    |
| Bal14    | 6,79 <sup>Aabc</sup>  | 6,76 <sup>Abcd</sup>  | 6,68 <sup>Bbc</sup> | 6,46 <sup>Cb</sup>  | 6,82 <sup>Aab</sup>  | 6,54 <sup>Aef</sup>   | 5,56 <sup>Bde</sup>  | 5,07 <sup>Cbcde</sup>  |

\*Letras maiúsculas diferentes na linha apresentam diferença estatística entre tempos; letras minúsculas diferentes na coluna apresentam diferença estatística entre isolados.

Quanto aos valores médios de pH observados na temperatura de 37°C, Bal1 (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*) apresentou a maior capacidade de acidificar o leite com 6 horas de incubação, diferente estatisticamente dos demais. Após 12 horas, o menor valor absoluto de pH foi observado para o isolado Bal6 (*Sc. Macedonicus*), porém, não diferiu dos isolados Bal1 (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*) e Bal14 (*Enterococcus* sp.). Em 24 horas, cinco isolados fermentaram o meio reduzindo o valor de pH para abaixo de 6, contudo, os valores diferiram estatisticamente entre estes isolados. Após 24 horas de incubação, este estudo demonstra que a capacidade de redução do pH é isolado dependente.

O aumento da temperatura de incubação modificou o comportamento dos microrganismos no meio de cultivo, fato evidenciado entre os valores de pH apresentados no período de 48 horas pelos isolados de *Lb. rhamnosus* (Bal7 e Bal8). De modo semelhante, a velocidade de acidificação dos microrganismos também foi influenciada pela temperatura, pois a quantidade de isolados que apresentaram diferença significativa entre os períodos foi superior na temperatura e 37°C.

Os *Lactobacillus* e *Enterococcus* foram influenciados pelo aumento da temperatura, semelhantemente, Faria et al. (2006), observou que a variação do pH e da acidez de leite é influenciada pela combinação de tempo e temperatura, sendo o *Lactobacillus casei* mais sensível as mudanças, pois de acordo com Giraffa (2003) a acidificação é um produto da atividade metabólica dos microrganismos, representados em valores de pH e produção de ácido láctico, os quais dependem diretamente da ação enzimática do microrganismo que possui diferentes temperaturas ótimas de atividade.

Os *Lactobacillus* apresentaram baixos valores de pH após 24 horas de incubação à 20°C e após 48 horas de incubação a 37°C, em contrapartida, uma grande amplitude de valores foi observada para cada gênero. Câmara (2012) ao estudar diferentes BAL, mostraram que os *Lactobacillus* apresentaram maior capacidade de acidificação representada por baixos valores de pH seguidos dos *Lactococcus* e *Enterococcus*.

Os valores da capacidade de acidificação dos *Enterococcus* foram superiores aos descritos por Giraffa (2003), no qual o autor afirma que somente algumas linhagens de *Enterococcus* são capazes de acidificar o leite a valores de pH inferiores a 5,0, sendo que o *E. faecalis* possui maior capacidade

acidificante que o *E. faecium* (24 horas a 37°C). Os resultados obtidos no presente trabalho foram superiores aos encontrados por Coelho (2013) ao observar a produção de 0,13% de ácido láctico por *Enterococcus faecalis* e de 0,07% de ácido láctico por *Lactococcus*, porém em pH muito ácido as BAL perdem viabilidade de multiplicação (DIAS, 2014; THAMER; PENNA, 2006).

No trabalho desenvolvido por Balduino et al. (1999), os autores modelaram a produção de ácido láctico utilizando uma mistura de Lactobacilos, Enterococcus e Pediococcus, no qual o fator temperatura é um elemento de segundo grau, enquanto que as concentrações dos carboidratos, glicose e lactose, são elementos de primeiro grau e que não interagem entre si. Os autores obtiveram as maiores produções de ácido láctico no menor e maior nível de temperatura.

Segundo Settanni; Moschetti (2010) uma cultura láctica é considerada rápida produtora de ácido, quando o pH do leite *in natura* reduz de 6,5 para 5,3 dentro de até 6h de incubação, à temperatura adequada, podendo ser selecionadas como BAL iniciadoras ou *starters*, enquanto que as de lenta acidificação, podem ser selecionadas como culturas secundárias ou adjuntas.

Corroborando com os resultados observados, Dias (2014), obteve que os isolados de *Enterococcus* foram os mais numerosos na capacidade de produção de ácido láctico, seguidos dos isolados do gênero *Lactococcus* e *Streptococcus*.

Os valores obtidos para a acidez titulável, expressa em percentual de ácido láctico, produzidos a 20°C e 37°C, estão expressos na Tabela 6. O isolado Bal1(*Lc. Lactis* subsp. *cremoris*) produziu maior proporção de ácido láctico quando incubado a 20°C. Por outro lado, quando incubado na temperatura de 37 °C, os isolados Bal1(*Lc. Lactis* subsp. *cremoris*), Bal2 (*E. faecalis*), Bal4 (*Lc. lactis*) e Bal12 (*Enterococcus* sp.) produziram mais ácido láctico comparado aos demais isolados em 24 horas.

O isolado Bal7 (*Lb. rhamnosus*) destacou-se pela capacidade de produzir ácido láctico após 48 horas de incubação a 37 °C, desempenho 7,71 vezes superior à temperatura de 20 °C. O isolado Bal5 (*Enterococcus* sp.) apresentou baixa capacidade de produzir ácido láctico em ambas temperaturas.

A produção de ácido láctico influenciará no tempo total de fabricação de um queijo e sua concentração no meio influi na taxa de sinérese e o

consequente teor de umidade do produto final. Concomitantemente, meios mais ácidos promovem maiores solubilização do cálcio no soro. Coalhadas rígidas e sem liga são obtidas na presença de altas concentrações de cálcio, enquanto que níveis baixos do mesmo resultam em perda de estrutura e elasticidade da massa após a etapa de dessoragem (GUNASEKARAM; AK, 2003; LAW; TAMIME, 2010).

**Tabela 6.** Produção de ácido láctico (%) dos isolados incubados a temperatura de 20°C e 37 °C.

| Isolado | Médias* (g ácido láctico/100 mL) |                     |                    |                    |
|---------|----------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|         | 20 °C                            |                     | 37 °C              |                    |
|         | 24horas                          | 48horas             | 24horas            | 48horas            |
| Bal1    | 0,43 <sup>a</sup>                | 0,68 <sup>a</sup>   | 0,70 <sup>ab</sup> | 0,68 <sup>cd</sup> |
| Bal2    | 0,30 <sup>b</sup>                | 0,65 <sup>a</sup>   | 0,71 <sup>a</sup>  | 0,66 <sup>d</sup>  |
| Bal3    | 0,13 <sup>d</sup>                | 0,15 <sup>de</sup>  | 0,20 <sup>e</sup>  | 0,50 <sup>e</sup>  |
| Bal4    | 0,27 <sup>b</sup>                | 0,65 <sup>a</sup>   | 0,67 <sup>ab</sup> | 0,47 <sup>ef</sup> |
| Bal5    | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,15 <sup>de</sup>  | 0,22 <sup>e</sup>  | 0,25 <sup>h</sup>  |
| Bal6    | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,19 <sup>cde</sup> | 0,30 <sup>d</sup>  | 0,44 <sup>ef</sup> |
| Bal7    | 0,15 <sup>cd</sup>               | 0,14 <sup>e</sup>   | 0,23 <sup>e</sup>  | 1,08 <sup>a</sup>  |
| Bal8    | 0,17 <sup>c</sup>                | 0,14 <sup>e</sup>   | 0,22 <sup>e</sup>  | 0,84 <sup>b</sup>  |
| Bal9    | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,19 <sup>cde</sup> | 0,22 <sup>e</sup>  | 0,37 <sup>fg</sup> |
| Bal10   | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,15 <sup>de</sup>  | 0,19 <sup>e</sup>  | 0,28 <sup>gh</sup> |
| Bal11   | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,20 <sup>cd</sup>  | 0,63 <sup>bc</sup> | 0,79 <sup>bc</sup> |
| Bal12   | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,37 <sup>b</sup>   | 0,65 <sup>ab</sup> | 0,70 <sup>cd</sup> |
| Bal13   | 0,14 <sup>d</sup>                | 0,20 <sup>cd</sup>  | 0,36 <sup>d</sup>  | 0,40 <sup>ef</sup> |
| Bal14   | 0,15 <sup>cd</sup>               | 0,22 <sup>c</sup>   | 0,57 <sup>c</sup>  | 0,63 <sup>d</sup>  |

<sup>a,b</sup> - letras minúsculas iguais na coluna indicam que não houve diferença estatística entre os isolados ( $p \geq 0,05$ ).

De acordo com Settanni; Moschetti (2010), os isolados analisados no presente estudo apresentaram potencial como cultura secundária ou adjunta para a fabricação de queijos, uma vez que demonstraram ser de lenta acidificação. Todavia, os isolados lácticos homofermentativos a 20 °C Bal1 (*Lc. cremoris*), Bal2 (*E. faecalis*), Bal4 (*Lc. lactis*), Bal6 (*St. macedonicus*), Bal9 (*E. durans*), Bal10 (*E. faecium*), Bal12 (*Enterococcus* sp.) e Bal14 (*Enterococcus* sp.) apresentam boa aplicação para queijos frescos e de massa crua, enquanto os isolados que apresentaram atividade acidificante a 37 °C são indicados para aplicação em queijos de massa semi-cozida e cozida.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo foi pioneiro na região norte do estado do Paraná, isolando e identificando BAL com potencial tecnológico.

Cinco gêneros bacterianos foram identificados, sendo compostos por *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Pediococcus*. Esse resultado demonstrou uma considerável diversidade bacteriana presente em queijos artesanais e em leite cru.

Os isolados Bal2 (*E. faecalis*) e Bal8 (*Lb. rhamnosus*) foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados.

Todas as BAL isoladas neste trabalho foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos um patógeno testado. Enterococos, Pediococos e Lactobacilos apresentaram atividade inibitória contra *E. coli* enteropatogênica, *Salmonella*, *L. innocua* e *L. monocytogenes.*, todavia, *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Enterococcus faecium* conseguiram crescer normalmente, indicando que não houve ação antagonista.

Os isolados apresentaram baixa atividade enzimática. Nenhum isolado apresentou atividade proteolítica pela utilização de leite desnatado, bem como atividade lipolítica para azeite de oliva. Por outro lado, os isolados Bal1 (*Lc. Cremoris*), Bal11 (*E. durans*) e Bal12 (*Enterococcus* sp.) apresentaram atividade lipolítica com tween 20 a 20 °C, enquanto que todos os isolados do gênero *Enterococcus* apresentaram maior atividade enzimática a 37 °C. Todos os isolados do gênero *Enterococcus* foram capazes de hidrolisar a lisina.

Os isolados do gênero *Lactococcus* produziram mais ácido láctico após 48 horas de incubação a 20 °C, enquanto que para a temperatura de incubação igual a 37 °C, o gênero *Lactobacillus* foi o maior produtor, apresentando também o menor valor de pH para o mesmo período e temperatura de incubação. Ambos os gêneros sofreram interferência significativa da temperatura.

## REFERÊNCIAS

ACURCIO, L. B.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. *et al.* Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 66, n. 3, p. 940-948, 2014.

ADDIS, E.; FLEET, G. H.; COX, J. M.; KOLAK, D.; T. LEUNG. The growth, properties and interactions of yeast and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 25-36, 2001.

ALBUQUERQUE, T.C. **Isolamento, seleção e caracterização de enterococos produtores de enterocinas isolados do queijo de Coalhoartesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil** Tese(Doutorado em Biociência animal)-Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2014.

ANDRADE, C. R. G. ; SOUZA, M.R. ; PENNA, C. F. A. M. ; ACURCIO, L. B., SANT'ANNA, F.M.; CASTRO, R. D. ; OLIVEIRA, D. L. S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas Artesanais da Serra da Canastra – MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.5, p.1592-1600, 2014.

AO, X.; ZHANG, X.; SHI, L. Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p. 1073–1084, 2012.

ARAÚJO, T. F. **Caracterização e Identificação de *Enterococcus* spp. Isolado do fermento endógeno utilizado na fabricação de queijo minas artesanal da região canastra, Minas Gerais.** Dissertação (mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa. 74f. Viçosa-MG. 2008.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n.3, 1999.

BARROS, C. M. V., CUNHA, C. R., GALLINA, D. A., VIOTTO, L. ., VIOTTO, W. H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 2006.

BEGOVIĆ, J., BRANDSMA, J. B., JOVČIĆ, B., TOLINACKI, M., VELJOVIĆ, K., MEIJER, W. C., TOPISIROVIĆ, L. Analysis of dominant lactic acid bacteria from artisanal raw milk cheeses produced on the Mountain Stara Planina, Serbia. **Archives of Biological Science Belgrade**, p 11-20, 2011.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.278- 295, 2008.

BEZERRA, T. K. A. **Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias ácido lácticas probióticas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, 111f, 2015.

BHARDWAJ, A.; GUPTA, H.; KAPILA, S. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. **Int. J. Food Microb.**, v. 141, p.156–164, 2010.

BHOWMIK, T.; MARTH, T. H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* Species in cheese ripening: A Review. **Journal of dairy Science**, v. 73, n.4, 1990.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 68, de 12 de Dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo

desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios. Publicado no **Diário Oficial da União** de 14/12/2006, Seção 1, Página 8.

CABRAL, M.L.B.; LIMA, M. S. F.; ARAÚJO, G. A. ; COSTA, E. F. ; PORTO, A. L. F. ; CAVALCANTI, M. T. H. Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Food Sci.**, v.3, n.4, p.207-215, 2016 .

CAMARA, S.P. A. **Estudo do potencial bioactivo e tecnológico de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo do pico artesanal.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança alimentar)-Universidade do Açores. Angra do Heroísmo . 94f. 2012.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.** 154 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Campinas: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2007.

CARVALHO, W.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCHILHA, I. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte I: Ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, v. 1, n. 18, p. 70-76, 2005.

CASTILHO, N. P. A.; CUNHA, A. F.; ARAUJO, M. M. P. Qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista *in vitro* de suas bactérias ácido lácticas. **Bol. Ceppa**, v. 31, n. 2, p. 207-214, 2013.

CASTRO, R. D. **Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados na mesorregião de Campo das Vertentes-MG: Qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. 126f. Belo Horizonte-MG. 2015.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

COELHO, M.C. **Isolamento e caracterização de bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocina e nas e sua aplicação no fabrico de queijo fresco**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar)- Departamento de Ciências Agrárias.129f. Universidade de Açores. Angra do Heroísmo. 2013.

COLLINS, Y. F.; McSWEENEY P. L. H.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fat acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International dairy journal**, v.13, n. 4, p. 841-866, 2003.

COSTA, H.H.S., SOUZA, M.R., ACÚRCIO, L.B., CUNHA, A.F., RESENDE, M.F.S., NUNES, Á.C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 71, p. 1-20, 2001.

DE DEA LINDNER, J. **Traditional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods: the case of Parmigiano Reggiano cheese**. Dissertation (Ph. D. in Food Science and Technology) - Università degli Studi di Parma, p.128. 2008.

DELAMARE, A. P. L.; ANDRADE, C. C. P.; MANDELLI, F. Microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics of Serrano, an artisanal Brazilian cheese. **Food Nut. Sci.**, v. 3, p. 1068-1075. 2012.

DELAVENNE, E.; MOUNIER, J.; DÉNIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples

from cow, ewe and goat over one-year period. **International Journal of Food Microbiology**, n. 155 p. 185–190, 2012.

DIAS, G. M. P. **Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido no município de Venturosa – Pernambuco**. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de ciência biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE. 2014.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. *Perspectivas dos Alimentos - uma Análise dos Mercados Mundiais (leite e produtos lácteos)*. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>. Acesso em: 11/ 11/ 2016.

FARIA, C.. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 3, p. 511-516, 2006.

FISHER, K., PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology** v.155, p.1749-1757. 2009.

FOULQUIÉ 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, n. 1, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T.M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 29, p.237–253, 1990.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, p. 544, 2000.

FRANK V. KOSIKOWSKY, VIKRAM V. MISTRY, Cheese and fermented milk foods. 3<sup>rd</sup> edition, v. 1, p 26-56. Connecticut: Edward Brother Inc. 1997.

FREITAS, W. C. **Aspectos higiênico sanitários, físico-químicos e microbiota lática de leite cru, queijo de coalho e soro de leite produzidos no Estado da Paraíba.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraíba. João Pessoa. 2011.

FUKA, M. M.; WALLISCH, S.; ENGEL, M. *et al* . Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. **Plus one**. v. 8, I.11, 2013.

FURTADO, D.F. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. 92f. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 2, p. 89-95, 2009.

GARCIA, E. F. ; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C.R. E.; MACHADO, T. A. D.; SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food sciences and nutrition**, v.63, n.8, p.947-56, 2012.

GIRAFFA, G. **Functionality of enterococci in dairy products.** International Journal of Food Microbiology, v.88, n. 2, p.215-222, 2003.

GORI, K.; RYSSEL, M.; ARNEBORG, N.; JESPERSEN, L. Isolation and Identification of the Microbiota of Danish Farmhouse and Industrially Produced Surface-Ripened Cheeses. **Microb Ecol**. V.65, p.602–615, 2013.

GUNASEKARAM, s.; AK, M. M. **Cheese rheology and texture.** CRC press, New York, p. 434, 2003.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: na overview of production, purification and biochemical production. **Applied microbiology biotechnology**, v. 64, n. 3, p. 763-781, 2004.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** 67:597-607. 1975.

HARRIGAN, W. F. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.

HERMMANS, G.; FUNCK, G. D.; SCHIMIDT, F.T.; RICHARD, N. S. P. S. Isolation and identification of supposedly bacteriocinogenic lactic acid bacteria from milk and cheese. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 11, n. 2, p. 191-196, Curitiba . 2013.

HERLEKAR, D.A.; SHASHIKANT, C.S.; GURJAR, A.A. Presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts. **J. Dairy Sci.**, v.96, n.10, p.6336–6346, 2013.

HOFFMAN, C.S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene** 57:267-272. 1987.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 26, n. 2, p.87-107, 2000.

JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. KALAVROUZIOI, I.; HATZIKAMARI, M.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. *et al*. Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. **Int. J. Dairy Tech.**, v. 58, n.1, p. 30-38. 7. ed. New York: Springer. 2005.

KALSCHNE, D. I.; WOMER, R. ;MATTANA, A. ; SARMENTO, C. M.P. ; COLLA, L. M.E. characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “sliced vacuum-packed cooked ham”. **Brazilian Journal of Microbiology** v.46, n.1, p.173-181, 2015.

KOCH, A. C. C. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite de ovelha e atividade antagonista de sua microbiota láctica**. Tese (Doutorado em Ciencia Animal)- Universidade de Brasília. 109f. Brasília-DF. 2014.

KOENRAAD VAN HOORDE A, TINE VERSTRAETE B, PETER VANDAMMEA, GEERT HUYS A. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. **Food Microbiology**. V. 25, p. 929– 935, 2008.

KULLEN, M.J.; SANOZKY-DAWES, R.B.; CROWELL, D.C.; KLAENHAMMER, T.R. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. **Journal of Applied Microbiology**. V. 89, p. 511–516, 2000.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. **John Wiley and Sons Ltd.**, New York, N.Y. p. 115-147. 1991.

LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. **Technology of cheesemaking**. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 515, 2010.

LIMA, C.D.L.C. LIMA, L.A., CERQUEIRA, M.M.O.P., FERRREIRA, E.G. ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

MADERA, C. et al. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n.3, p.213-222, 2003.

MALLESHA, D., SHYLAJA, R., SELVAKUMAR, D., JAGANNATH, J.H. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. **Recent Res in Sci Tech**2. 42-46p. 2010.

MARROKI A, ZUÑIGA M, KIHAL M, PÉREZ-MATÍNEZ G. Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goats milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. **Braz J Microbiol.** v. 42, p.158-171, 2011.

MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, dispõe sobre a Produção e a Comercialização dos Queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário oficial do estado de 18 de dezembro de 2012.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. C.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. N. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MEYERS, S. A.; CUPPETT S. L.; HUTKINS, R. W. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. **Food Microbiol**, v. 13, n. 2, p. 383-389, 1996.

MEDEIROS, R. S., ARAÚJO, L. M., QUEIROGA NETO, V., ANDRADE, P. P., MELO, M. A.; GONÇALVES, M. M. B. P. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. **Cyta- Journal of food**. 2017.

MORANDI, S., SILVETTI, T., BRASCA, M. Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. **Antonie van Leeuwenhoek** v.103, p. 239-249, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2011.

NERO, LA., MATTOS, M.R, BELOTI, V., BARROS, M. A. F., PINTO, J. P. A. N., FRANCO, B. D. G. M.. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciênc. Tecnol Aliment.**,v.27,n.2, p.391-393, 2010.

NIKOLIC M, JOVCIC B, KOJIC M, TOPISIROVIC L. Characterisation of the exopolysaccharides (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. **Int J Food Microbiol.** 158:155–162. 2012.

NOMURA M, KOBAYASHI M, NARITA T, KIMOTO-NIRA H, OKAMOTO T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **J Appl Microbiol.** v.101, p.396-405, 2006.

OGAKI, M. B. ET AL. Screening of the Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in Enterococcus Species. **J. Microbiol. Biotechnol.** V.26, n.6, p.1026–1034, 2016.

OLIVEIRA, J.; LEONASKI, E.; MALHERBI, N. M.; CUNHA., L.; PASSOS, C. T. Isolamento, identificação e avaliação da capacidade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite orgânico cru. **Jornada de iniciação científica e tecnológica.** Chapecó-SC. 2016.

OLIVEIRA, E. M. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E; SOUZA, E. L. Technological, Physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Science Agrícola**, v. 69, n.6, p370-379, 2012.

OLISZEWSKI, R.; MEDINA, R. B.; GONZALEZ, S. N.; CHAIA, A. B. P. Esterase activities of endogenous lactic acid bacteria from Argentinean goat's milk and cheese. **Food chemistry**, v. 101, n. 7, p. 1446-1450, 2007.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. Físico-Química do Leite e Derivados: Métodos Analíticos. 2 ed..234p. Juiz de Fora . 2001.

PERRI, J. M. **Bactérias do gênero Enterococcus em queijo de coalho: influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos.** 93 F. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2010.

PRICHULA, J. ; PEREIRA, R. I. ; WACHHOLZ, G.R.; CARDOSO, L.A. ; TOLFO, N.C.C. SANTESTEVAN, N. A. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. p 51-57 . 2016.

RAMOS, A. C. S. **Caracterização e seleção tecnológica de culturas láticas isoladas de queijo de Coalho do sertão alagoano.** Dissertação (Mestrado em Nutrição)- Universidade Federal do Alagoas. 112f. Maceio. 2009.

RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F.;NUNES, A.C.;MOREIRA, J.L.S.;PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

RIBEIRO, M. C. O. **caracterização do *pediococcus acidilactici* b14 quanto às propriedades probióticas e sua associação com *lactobacillus acidophilus* atcc 4356 com aplicação em sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica.** Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)- Universidade Federal do Paraná. 206f.Curitiba-PR. 2012.

RODRIGUES, D., ROCHA-SANTOS, T. A. P.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M.; MALCATA, X.; FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon

probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT- Food Science and Technology**, V.44, n.1, p.100-108, 2011.

SAAD, S. M. I., Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.42 no.1 , 2006.

SALQUE, M; BOGUCKI P.; PYZEL, J.; SOBKOWIAK-TABAKA I.; GRYGIEL R.; SZMYT M.; EVERSLED R. **Earliest evidence for cheese making in the sixth Millennium BC in northern Europe.** LETTER. Nature. Volume 493. p. 522-525. 2013.

SANT'ANNA, F. M. ***Lactobacillus e Pediococcus de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes: isolamento, identificação molecular, avaliações in vitro e in vivo do potencial probiótico.*** Dissertação (Mestrado em Ciência animal)- Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. 76f. Belo Horizonte-MG. 2015.

SCHAECHTER, M. The Desk Encyclopedia of Microbiology. **Elsevier Academic Press**, p. 31- 282, 2006.

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, n. 2, p. 621-647, 2001.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), Estudos de Mercado - Queijos nacionais, relatório completo, 2008.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p.691-697, 2010.

SILVA., L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela debúfala**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Biociências, Letras e Ciências exatas. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto –SP. 2010.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R. *et al* . Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.**, v.380, n. 66, p. 16-22, 2011.

SILVA, J.G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus spp.* isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Tecnologia e Inspeção de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG. 2016.a

SILVA., T. M. , MILBRADT, E. L. , ZAMAE, J. C, FILHO, R. L.A., OKAMOTO, A. S. Transferência de existência entre enterobactérias patogênicas de importância aviária- impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary science**. V.21, n.2, p. 09-20. 2016. B

SIEZEN, S.J; VLIEG, V. H. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microb cell fact**. 2011.

SOUZA, L. B. **Avaliação da microbiota láctica cultivável de leite bovino e queijo Coalho produzidos no Rio Grande do Norte**. Dissertação (Mestrado em Ciencia animal)- Universidade Federal Rural do Semi-Arido.43f. Mossoro-RN. 2015.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO JACATUPÉ (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) **Ciênc. Tecnol. Aliment**. vol. 18 n. 4 Campinas Oct./Dec. 1998.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W.  
Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 22, n. 3, p. 347-355, 2003.

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, n. 1, p. 267-274, 2000.

TAMANINI, R., BELOTI, V., SILVA, L.C.C., ANGELA, H.L., YAMADA, A.K.,  
BATTAGLINI, A.P.P., FAGNANI, R., MONTEIRO, A.A. Antagonistic activity  
against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria  
isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p.  
1877-1886. 2012.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais  
fermentadas por probióticos acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**,  
v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TEMMERMAN R, HUYS G, SWINGS J. Identification of lactic acid bacteria:  
culture dependent and culture-independent methods. **Trends Food Sci  
Technol** v. 15, p. 348–349, 2004.

TODESCATTO, C. **Obtenção de fermento láctico endógeno para produção  
de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná**. Dissertação  
(mestrado em Tecnologia de Processos Químicos) – Alimentos. Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco- Paraná. 2014.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production,  
genetic organization and mode of action. **Braz. J. Microb.**, v. 40, p. 209-221,  
2009.

TRIPATHI, M. K., GIRI, S. K. probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Funtional Foods**, v. 9, n.1, p.225-241, 2014.

VAN HOORDE K, VANDAMME P, HUYS G. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. **Dairy Sci Technol** v. 88, p.445-455, 2008.

VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBE`S, C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk. **Food Microbiol.**, v.26, n.3, p.305–310, 2009.

VON WRIGHT, A., Genus *Lactococcus*. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition, Revised and Expanded. CRC Press, USA, p. 63-76. 2012.

VO, T. S.;KIM, S. k. Fucoidans as a natural bioactive ingrediente for functional foods. **Journal of Functional Foods**. V. 5, n.1. p. 16-17, 2013.

WHITMAN, W.B., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, **The Firmicutes**, Second Edition. Springer, USA. 2009.

WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **Int. Dairy J.** p.122–3, 91–109,2002.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

## ANEXO - Sequenciamento Genético das BAL isoladas de queijos e leite.

### ISOLADO Bal1

Lactococcus lactis subsp. cremoris strain MFPB29D07-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [JF756231.1](#)

```

GGCGGGCGCTTGGTCGTCTCTGCAGTTGAGCAATGAAGATTGGTGCTTGCACCAATTTGAAGAGCAG
CGAACGGGTGAGT
AACGCGTGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAATA
ACTTTAAACACAA
GTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAAAGGCTCA
CCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
ACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG
TTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAGCTCATCAAGGACGGTAACTACCCAG
AAAGGGACGGCTA
ACTACGTGCCAGCA5CCTAA

```

```

Query 20 CTGCAGTTGAGCAATGAAGATTGGTGCTTGCACCAATTTGAAGAGCAGCGAACGGGTGAG 79
      |||
Sbjct 4 CTGCAGTTGAGCGATGAAGATTGGTGCTTGCACCAATTTGAAGAGCAGCGAACGGGTGAG 63

Query 80 TAACGCGTGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACC 139
      |||
Sbjct 64 TAACGCGTGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACC 123

Query 140 GCATAATAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGAT 199
      |||
Sbjct 124 GCATAATAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGAT 183

Query 200 GATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAG 259
      |||
Sbjct 184 GATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAG 243

Query 260 CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA 319
      |||
Sbjct 244 CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA 303

Query 320 GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT 379
      |||
Sbjct 304 GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT 363

```

```

Query 380 GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAA 439
          |||
Sbjct 364 GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAA 423

Query 440 AGCTCATCAAGKGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCASC 497
          |||
Sbjct 424 AGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC 481

```

## ISOLADO Bal2

Enterococcus faecalis strain WVS356 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [KM257699.1](#)

```

CGGGGGTCAAGCGTTGTCTCTGCAGTCGACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAA
GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAA
CAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCG
CTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCAT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTT
CGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTAT
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCTAA

```

```

Query 19 TCTGCAGTCGACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCG 78
          |||
Sbjct 14 TCTGCAGTCGACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCG 73

Query 79 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGG 138
          |||
Sbjct 74 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGG 133

Query 139 TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 198
          |||
Sbjct 134 TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 193

Query 199 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 258
          |||
Sbjct 194 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 253

Query 259 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG 318
          |||
Sbjct 254 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG 313

Query 319 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA 378
          |||
Sbjct 314 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA 373

```

```

Query 379 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG 438
          |||
Sbjct 374 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG 433

Query 439 ACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG 498
          |||
Sbjct 434 ACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG 493

Query 499 CCAGCAGCC 507
          |||
Sbjct 494 CCAGCAGCC 502

```

### ISOLADO Bal3

#### Enterococcus sp. M194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [FJ513850.1](#)

```

CGGGGTGCGTGTCTCTGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACSGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAG
AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAAC
AGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTGCG
TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCTAA

```

```

Query 18 CTGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACSGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG 77
          |||
Sbjct 8 CTGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACSGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG 67

Query 78 AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGG 137
          |||
Sbjct 68 AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGG 127

Query 138 TGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 197
          |||
Sbjct 128 TGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 187

Query 198 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 257
          |||
Sbjct 188 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 247

Query 258 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA 317
          |||
Sbjct 248 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA 307

Query 318 ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA 377

```

```

|||||
Sbjct 308 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA 367

Query 378 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG 437
|||||
Sbjct 368 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG 427

Query 438 ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG 497
|||||
Sbjct 428 ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG 487

Query 498 CCAGCAGCC 506
|||||
Sbjct 488 CCAGCAGCC 496

```

## ISOLADO Bal4

Lactococcus lactis strain PU-D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KU568489.1](#)

```

GCGCGCGMCGGGTCGTCTTCCTGTSMsAKYRRSCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAG
CAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATG
CTAATACCGCATAACAACCTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGA
TGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGT
AAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAAGTTGGTGAGAGTGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCA
GAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCYAA

```

```

Query 34 CGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGG 93
|||||
Sbjct 11 CGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGG 70

Query 94 GAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAACAAC 153
|||||
Sbjct 71 GAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAACAAC 130

Query 154 TTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTT 213
|||||
Sbjct 131 TTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTT 190

Query 214 GTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGA 273
|||||
Sbjct 191 GTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGA 250

Query 274 GGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG 333

```

```

|||||
Sbjct 251 GGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG 310

Query 334 GGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTT 393
|||||
Sbjct 311 GGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTT 370

Query 394 TCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAGCTCATCAAG 453
|||||
Sbjct 371 TCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAGCTCATCAAG 430

Query 454 TGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC 500
|||||
Sbjct 431 TGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC 477

```

## ISOLADO Bal5

Enterococcus sp. LPi8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [JF718432.1](#)

```

GGAATTTGTGTAGGGTCCGCATCGTCKCTGCAGTCGAACRCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTC
AATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAC
ACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTT
CGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCC
ACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCC
TGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCYA

```

```

Query 28 CTGCAGTCGAACRCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCG 87
|||||
Sbjct 7 CTGCAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCG 66

Query 88 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGAAACAGG 147
|||||
Sbjct 67 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGAAACAGG 126

Query 148 TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 207
|||||
Sbjct 127 TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 186

Query 208 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 267
|||||
Sbjct 187 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 246

Query 268 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG 327
|||||

```

```

Sbjct  247  CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  306

Query  328  ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA  387
      |||
Sbjct  307  ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA  366

Query  388  CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  447
      |||
Sbjct  367  CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  426

Query  448  ACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  507
      |||
Sbjct  427  ACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  486

Query  508  CCAGCAGCC  516
      |||
Sbjct  487  CCAGCAGCC  495

```

## ISOLADO Bal6

Streptococcus macedonicus strain SM203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [KM264319.1](#)

```

TGCGCGGAACGTTGTGGCTGCAGTAGACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAGAGTTGGAAGAGTTGCGA
ACGGGTGAGTAACCGGTAGGTAACCTGCCTATTAGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATA
CCGCATAATAGTGTTTAAACACATGTTAGAGACTTAAAAGATGCAATTGCATCACTAGTAGATGGACC
TGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGTAAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTGGAAGTTCACACAGTGACGGTAACTTACCAGAAAGG
GACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCWCA

```

```

Query  19  TGCAGTAGACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAGAGTTGGAAGAGTTGCGAACGGGTGAGTA  78
      |||
Sbjct  1  TGCAGTAGACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAGAGTTGGAAGAGTTGCGAACGGGTGAGTA  60

Query  79  ACGCGTAGGTAACCTGCCTATTAGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGC  138
      |||
Sbjct  61  ACGCGTAGGTAACCTGCCTATTAGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGC  120

Query  139  ATAATAGTGTTTAAACACATGTTAGAGACTTAAAAGATGCAATTGCATCACTAGTAGATGG  198
      |||
Sbjct  121  ATAATAGTGTTTAAACACATGTTAGAGACTTAAAAGATGCAATTGCATCACTAGTAGATGG  180

Query  199  ACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATACATAGCC  258
      |||
Sbjct  181  ACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATACATAGCC  240

```

```

Query 259 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG 318
          |||
Sbjct 241 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG 300

Query 319 CAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA 378
          |||
Sbjct 301 CAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA 360

Query 379 AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTGGAAAG 438
          |||
Sbjct 361 AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTGGAAAG 420

Query 439 TTCACACAGTGACGGTAACTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC 493
          |||
Sbjct 421 TTCACACAGTGACGGTAACTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC 475

```

## ISOLADO Bal7

Lactobacillus rhamnosus strain PglGER63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [KR054686.1](#)

```

GTAAAGCGTAGGGTCCGTTGTGCTGMAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTG
ATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATA
ACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGC
GTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGCTTTTCGGGTTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGG
CGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC

```

```

Query 23 CTGMAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTGAACG 82
          |||
Sbjct 18 CTGCAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTGAACG 77

Query 83 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGG 142
          |||
Sbjct 78 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGG 137

Query 143 AAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCG 202
          |||
Sbjct 138 AAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCG 197

Query 203 TAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA 262
          |||
Sbjct 198 TAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA 257

```

```

Query 263 CCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC 322
          |||
Sbjct 258 CCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC 317

Query 323 GGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGAT 382
          |||
Sbjct 318 GGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGAT 377

Query 383 GGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAG 442
          |||
Sbjct 378 GGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAG 437

Query 443 AATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAA 502
          |||
Sbjct 438 AATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAA 497

Query 503 CTACGTGCCAGCAGCC 518
          |||
Sbjct 498 CTACGTGCCAGCAGCC 513

```

## ISOLADO Bal8

Lactobacillus rhamnosus strain NBRC 3425 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [NR\\_113332.1](#)

```

CAAAACCGTAGCCCCGTGTGTCKCTGCAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTT
GATTTAATTTTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATA
ACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGC
GTAAGCTATCGTTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTG
AAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGG
CGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC

```

```

Query 25 TGC-AGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTG-ACG 82
          |||
Sbjct 29 TGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTGAACG 88

Query 83 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGG 142
          |||
Sbjct 89 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGG 148

Query 143 AAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCG 202

```

```

|||||
Sbjct 149 AAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCG 208

Query 203 TAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA 262
|||||
Sbjct 209 TAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA 268

Query 263 CCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTGGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC 322
|||||
Sbjct 269 CCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTGGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC 328

Query 323 GGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGAT 382
|||||
Sbjct 329 GGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGAT 388

Query 383 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAG 442
|||||
Sbjct 389 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAG 448

Query 443 AATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAA 502
|||||
Sbjct 449 AATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAA 508

Query 503 CTACGTGCCAGCAGC 517
|||||
Sbjct 509 CTACGTGCCAGCAGC 523

```

## ISOLADO Bal9

Enterococcus durans strain JCM 8725 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [NR\\_113257.1](#)

```

GGGGGGCCCGGGTCGTCTCTGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAG
AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAAC
AGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGC
TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGSAAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCTAA

```

```

Query 20 TGC-AGTCG-ACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG 77
||| ||||| |||||||
Sbjct 29 TGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG 88

```

```

Query 78 AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGG 137
      |||
Sbjct 89 AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGG 148

Query 138 TGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 197
      |||
Sbjct 149 TGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG 208

Query 198 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 257
      |||
Sbjct 209 TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 268

Query 258 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA 317
      |||
Sbjct 269 CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA 328

Query 318 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGSAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA 377
      |||
Sbjct 329 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA 388

Query 378 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG 437
      |||
Sbjct 389 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG 448

Query 438 ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG 497
      |||
Sbjct 449 ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG 508

Query 498 CCAGCAGCC 506
      |||
Sbjct 509 CCAGCAGCC 517

```

## ISOLADO Bal10

Enterococcus faecium strain AAU L7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [KJ396073.1](#)

```

CGTTTGGATTAGGACTAGCATCGTCTCTGCAGKCGASKYTTCTTTTTTCWTGGTATTTGCTCCACCGA
AAAAAGAGGAGTGGCGACCTTCTTAGTAACACCTGGGTAACCTGCCCATCCTAAGGGGATAAACACTT
GGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCRAAACCGCGTGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCRGG
TGCCCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAKCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGA
TGCATATCCGACCTGASAGGGTGATCGGCCACATTGATACTGASACACGGSCCTTYACTCGTACKGGA
GGAATCRSTASGGAATCTTCGTGAATGGACCATAGTCTGACCRAGCTACGCCSCGTGAGTGAASAAG
GTTTTCRGATCKCATTCTCTGTTGATARAGCASAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCWTCCCTTGAY
KGTATCTAACCAGAAAGCCTCGGCTWGCTACGTGCCARCASCMTA

```



GGTTTTCGGATCGYAWAACTCTGTTGTTAGAGAASAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA  
CGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCTAAA

```

Query  26  TGC-AGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG  84
      ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  29  TGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG  88

Query  85  AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGG  144
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  89  AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGAAACAGG  148

Query  145  TGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGYTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG  204
      ||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  149  TGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTG  208

Query  205  TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  264
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  209  TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  268

Query  265  YACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  324
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  269  CACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  328

Query  325  ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA  384
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  329  ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAA  388

Query  385  CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGYAWAACTCTGTTGTTAGAGAASAACAAGG  444
      ||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||| |||||
Sbjct  389  CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  448

Query  445  ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  504
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  449  ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  508

Query  505  CCAGCAGCC  513
      |||||||
Sbjct  509  CCAGCAGCC  517

```

## ISOLADO Bal12

Enterococcus sp. M192 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: [FJ513848.1](#)





```

Query  505  ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  528
          |||
Sbjct  488  ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  511

```

## ISOLADO Bal14

Enterococcus sp. 77ws gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Sequence ID: [AB675122.1](#)

```

AAACGTGAGTAGCGTCGMGCATCGTCKCTGCAGTCGAACGCTTTTTCTTTCACCGGAGCTTGCTCCA
YCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAC
ACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTT
TGCGTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCRA
GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACARGGATGAGAGTAAATGTTTCATCCCTT
GACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCTAA

```

```

Query  28  CTGCAGTCGAACGCTTTTTCTTTCACCGGAGCTTGCTCCAYCGAAAGAAAAAGAGTGGCG  87
          |||
Sbjct  6  CTGCAGTCGAACGCTTTTTCTTTCACCGGAGCTTGCTCCACCGAAAGAAAAAGAGTGGCG  65

Query  88  AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAAACAGG  147
          |||
Sbjct  66  AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAAACAGG  125

Query  148  TGCTAATACCGTATAACACTATTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCGTC  207
          |||
Sbjct  126  TGCTAATACCGTATAACACTATTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCGTC  185

Query  208  ACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCRA  267
          |||
Sbjct  186  ACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAA  245

Query  268  CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  327
          |||
Sbjct  246  CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  305

Query  328  TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG  387
          |||
Sbjct  306  TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG  365

Query  388  CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAARGGAT  447
          |||
Sbjct  366  CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAARGGAT  425

```

```
Query 448 GAGAGTAAAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 507
          |||
Sbjct 426 GAGAGTAAAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 485
```

```
Query 508 CAGCAGCC 515
          |||
Sbjct 486 CAGCAGCC 493
```