



PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM QUEIJOS ARTESANAIS DO VALE DO TAQUARI, RS

M. M. ERHARDT¹, N. S. P. S. RICHARDS², J. M. FRIGHETTO²

1 – Unidade Encantado – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – CEP: 95960-000 – Encantado – RS – Brasil, Telefone: +55 (51) 3751-3376 – e-mail: (magnolia-erhardt@uergs.edu.br)

2 – Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria – CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: +55 (55) 3220-8254.

RESUMO – A identificação das bactérias lácticas (BAL) em queijos artesanais é crucial para compreender a qualidade organoléptica durante a maturação, além de determinar o prazo de validade e garantir a segurança do produto. Essas bactérias influenciam o sabor e as características únicas dos queijos, sendo também importantes fontes de culturas iniciadoras que definem a identidade do produto. Este estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade de BAL em queijos artesanais produzidos por agroindústrias familiares da região do Vale do Taquari, no sul do Brasil. Utilizando sequenciamento de nova geração (NGS) da região V3/V4 do gene 16S rRNA, foram identificadas 35 espécies de BAL, distribuídas em sete gêneros, com *Lactococcus* sendo o mais predominante. A diversidade de BAL variou conforme a altitude, com algumas espécies predominando em altitudes elevadas, como *Enterococcus italicus*, enquanto *Lactococcus plantarum* e *Lactococcus raffinolactis* foram mais abundantes em altitudes baixas.

ABSTRACT – The identification of lactic acid bacteria (LAB) in artisanal cheeses is crucial for understanding their organoleptic quality during maturation, as well as for determining shelf life, ensuring safety, and maintaining overall quality. These bacteria contribute to the flavor and unique characteristics of regional dairy products and also serve as sources of specific starter cultures that define the product's identity. This study aimed to investigate and characterize the diversity of LAB in artisanal cheeses made by family-owned agro-industries in the Vale do Taquari region of southern Brazil. Using next-generation sequencing (NGS) of the V3/V4 region of the 16S rRNA gene, a total of 35 LAB species were identified, distributed across seven genera, with *Lactococcus* being the most predominant. LAB diversity varied according to altitude. Some species were more prevalent at higher altitudes, such as *Enterococcus italicus*, while *Lactococcus plantarum* and *Lactococcus raffinolactis* were more abundant at lower altitudes.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

PALAVRAS-CHAVE: diversidade microbiológica, *Lactococcus*, NGS, gene 16S rRNA.

KEYWORDS: microbiological diversity, *Lactococcus*, NGS, 16S rRNA gene.

1. INTRODUÇÃO

Os queijos artesanais brasileiros ainda apresentam muitas questões não esclarecidas, exigindo investigações mais detalhadas sobre sua microbiota, tanto em nível de espécie quanto de linhagem, incluindo a microbiota da casca (Kothe *et al.*, 2022) e sua predominância em diferentes ambientes, como altitudes variadas.

Estudos recentes têm utilizado a metagenômica (NGS) para caracterizar a microbiota dos queijos, permitindo a identificação de microrganismos endógenos da matéria-prima e exógenos adquiridos em ambientes de processamento (Planý *et al.*, 2016; Papadakis *et al.*, 2021; Papadimitriou *et al.*, 2022). Em geral, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* são os gêneros mais abundantes nos queijos (Planý *et al.*, 2016). Além disso, outras bactérias ácido-láticas (*Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* e *Vagococcus*) influenciam as características organolépticas e a qualidade do produto (Sant'Anna *et al.*, 2019).

Diante disso, este estudo teve como objetivo investigar, por meio da técnica NGS, a diversidade de BAL em 13 amostras de queijos artesanais produzidos e comercializados por agroindústrias familiares de diferentes municípios do Vale do Taquari (RS).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Localizada na região central do Rio Grande do Sul, a Região do Vale do Taquari compreende 36 municípios, totalizando 4.821,1 km² (1,71% do estado). A economia local é impulsionada pela agricultura e pecuária, com destaque para a avicultura, suinocultura e produção de leite. Pequenas propriedades predominam, favorecendo a produção de queijo artesanal com leite cru.

As amostras analisadas foram coletadas em municípios com influência alemã – Lajeado (LA), Arroio do Meio (AM) e Roca Sales (RC) – e italiana – Encantado (EN), Muçum (MU), Nova Brésia (NB), Relvado (RV), Anta Gorda (AG), Arvorezinha (AV), Doutor Ricardo (DR), Ilópolis (IL), Putinga (PT) e Vespasiano Correa (VC).

Treze amostras de queijos macios e de alta umidade, maturados entre sete e dez dias, foram adquiridas diretamente de produtores e mercados locais. As amostras foram classificadas conforme a altitude dos municípios: baixa (<150 m), média (150–350 m) e alta (>350 m), com base na altitude



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

média do estado (206 m). Após a coleta, foram acondicionadas em caixa isotérmica e mantidas refrigeradas até a chegada ao laboratório da UERGS. Alíquotas de 200 g foram preparadas assepticamente, aferido o pH e enviadas para análise metagenômica em laboratório credenciado.

A identificação da microbiota foi realizada por sequenciamento de nova geração (NGS). A preparação das bibliotecas seguiu protocolo específico, utilizando primers para a região V3–V4 do gene 16S rRNA (341F e 806R). O sequenciamento foi conduzido no sistema MiSeq (Illumina Inc.), e as sequências analisadas por meio do pipeline. Os arquivos fastq passaram por controle de qualidade (FastQC v.0.11.8), remoção de primers e filtragem de sequências com Phred <20, utilizando software em Python v.3.6. A diversidade bacteriana foi avaliada em bancos de dados 16S rRNA do canal Sentinel. A curva de rarefação foi gerada pela ferramenta Silvangs (v.1.9.8/1.4.9).

A análise estatística foi realizada nos programas Statistica 8 e Excel, aplicando ANOVA e teste de Tukey (95% de significância). A classificação das altitudes utilizou análise hierárquica aglomerativa (AHC), enquanto a correlação não paramétrica de Spearman foi calculada pelo GraphPad (v.8.2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 35 espécies de BAL distribuídas em sete gêneros. O total de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) bacterianas das amostras foi 424.361 (média de 32.643), sendo 60% identificadas como BAL (254.678 OTUs; média de 19.591). Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre o número de OTUs de BAL e o grupo das demais bactérias.

A espécie mais abundante foi *Lactococcus lactis* (47,0%), representando 78,4% do total de BAL. A maior riqueza de OTUs foi observada nas amostras coletadas em VC (123.812) e DR (20.710), enquanto as menores ocorreram naquelas coletadas em RV (1.454) e AV (1.879).

As amostras coletadas em AV e RC apresentaram pH acima de 6,0, com predomínio de *Lactococcus/Leuconostoc* e *Enterococcus*, respectivamente. As demais apresentaram pH médio de 5,0 (variação de 4,6 a 6,6). *Lactococcus* foi o gênero predominante em todas as amostras, exceto em RC, onde *Enterococcus* foi mais expressivo. A análise de correlação de Spearman indicou relação significativa entre pH e *Leuconostoc* ($r = 0,62$), sugerindo sua influência na acidificação do meio.

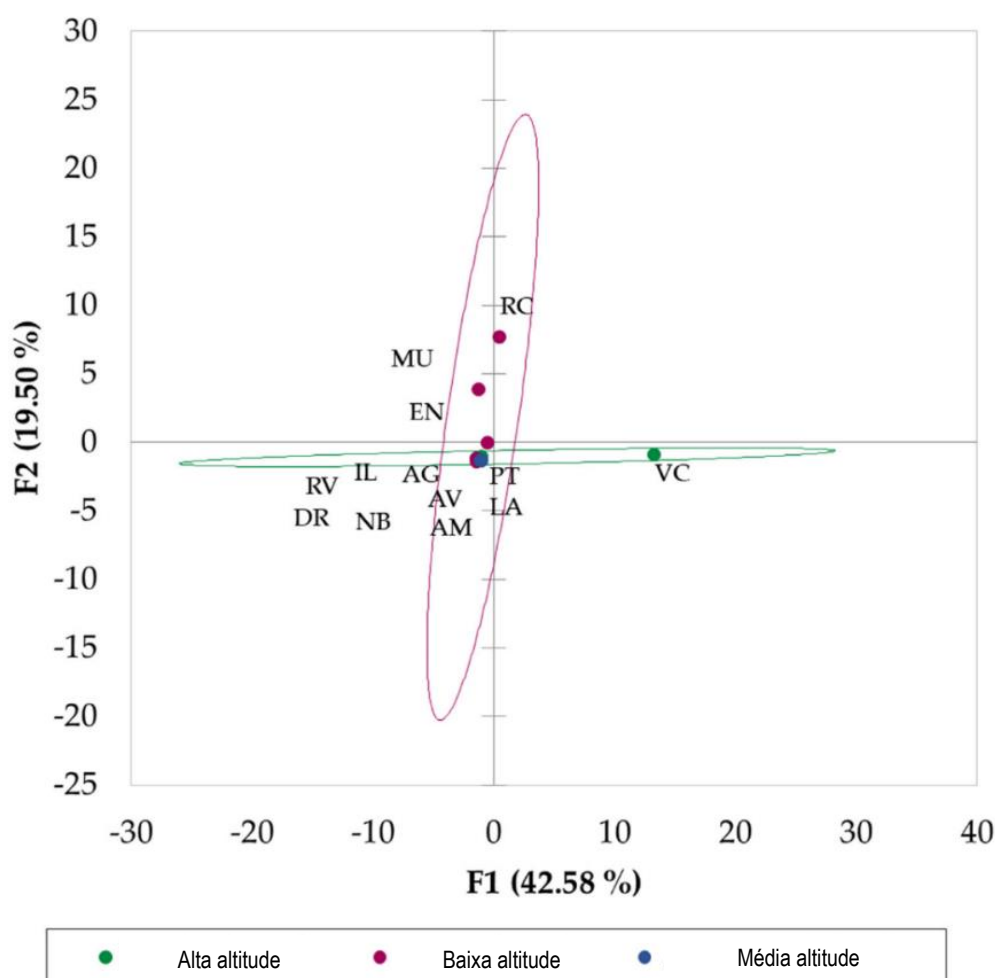
Os gêneros identificados foram *Bavariicoccus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Marinilactibacillus* e *Pediococcus*, sendo *Lactococcus* (84,2%) e *Enterococcus* (12,8%) os mais abundantes. Esses microrganismos são nativos e comuns em queijos artesanais, desempenhando papel na fermentação e potencial probiótico (Amraii *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2020; Dimov *et al.*, 2021; Papadakis *et al.*, 2021; Gezginc *et al.*, 2022).



Os gêneros *Marinilactibacillus* (*M. psychrotolerans*) e *Pediococcus* (*P. pentosaceus*) foram detectados apenas nas amostras coletadas em MU e VC, com 43 e 8 OTUs, respectivamente. Essas amostras apresentaram a maior diversidade de gêneros. *Marinilactibacillus* é um grupo halofílico e alcalino-láctico de origem marinha, encontrado em queijos macios e semi-duros, contribuindo para a maturação (Ishikawa *et al.*, 2006; Delcenserie *et al.*, 2014). *P. pentosaceus* tem aplicações probióticas e atua como conservante natural e promotor de crescimento (Jiang *et al.*, 2021).

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 1) revelou três clusters geográficos. A amostra VC (alta altitude – verde) se destacou das demais, assim como RC e MU (baixa altitude – rosa). VC apresentou a maior diversidade de espécies, incluindo duas exclusivas, padrão semelhante ao de MU.

Figura 1 - Representação das amostras agrupadas por PCA em quadrantes cartesianos. Os grupos de amostras são coloridos de acordo com as diferentes regiões (altitudes) onde são produzidos, ou seja, rosa (baixo), azul (médio) e verde (alto).





19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

Os perfis taxonômicos por altitude mostraram predominância de *Enterococcus devriesei*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *Lactobacillus brevis*, *L. crispatus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens*, *L. plantarum*, *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *Leuconostoc citreum*, *L. pseudomesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* em alta altitude.

Em baixa altitude, destacaram-se *Bavariococcus seileri*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. hirae*, *E. lactis*, *Enterococcus* sp., *E. thailandicus*, *E. villorum*, *Lactobacillus uvarum*, *Lactococcus plantarum*, *L. raffinolactis*, *Leuconostoc lactis*, *L. mesenteroides* e *Marinilactibacillus psychrotolerans*, padrão semelhante ao de média altitude. Já em média altitude, predominaram *Lactobacillus casei* e *L. curvatus*.

A análise de agrupamento hierárquico (distância euclidiana) mostrou que amostras de alta altitude não apresentaram similaridade com as demais, enquanto as de baixa e média altitude formaram um único clado, reclassificado como de baixa altitude. O sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu a identificação dos parentes mais próximos de cada amostra.

4. CONCLUSÕES

Com a análise metagenômica, a caracterização da microbiota bacteriana em queijos pode ser aprofundada, permitindo identificar sequências presentes e inferir relações, como a abundância entre amostras de queijo e sua relação com pH, altitude, características organolépticas e inibição de patógenos. Neste estudo, foi observada uma correlação entre o gênero *Leuconostoc* e a acidificação da matriz alimentar. O fator ambiental altitude também influenciou a diversidade e abundância bacteriana nas amostras de queijo, criando uma impressão digital específica. *Enterococcus italicus* e *Lactococcus lactis* foram mais abundantes em altitudes elevadas, com sete espécies exclusivas dessa elevação, enquanto *Lactococcus plantarum* e *L. raffinolactis* predominaram em altitudes baixas, com oito espécies específicas. A análise PCA revelou alta similaridade entre os grupos, e o agrupamento de amostras por distância euclidiana também mostrou que amostras de média e alta elevação formaram clusters distintos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMRAII, H. N.; ABTAHI, P.; JAFARI, H. R.; MOHAJERANI, M. R.; FAKHROLESLAM, N. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from traditional dairy products. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, p. e10168, 2014.

DELCENSERIE, V.; TAMINIAU, B.; DELHALLE, L.; NEZER, C.; DOYEN, P.; CREVECOEUR, S.; ROUSSEY, D.; KORSAK, N.; DAUBE, G. Microbiota characterization of a



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 6046–6056, 2014.

DIMOV, S. G. The unusual microbiota of the traditional Bulgarian dairy product Krokmach—A pilot metagenomics study. **International Journal of Dairy Technology**, v. 75, p. 139–149, 2021.

DIMOV, S. G.; GYUROVA, A.; ZAGORCHEV, L.; DIMITROV, T.; GEORGIEVA-MITEVA, D.; PEYKOV, S. NGS-based metagenomic study of four traditional Bulgarian green cheeses from Tcherni Vit. **LWT**, v. 152, p. 112278, 2021.

GEZGİNC, Y.; KARABEKMEZ-ERDEM, T.; TATAR, H. D.; DAĞGECEN, E. C.; AYMAN, S.; AKYOL, I. Metagenomics and volatile profile of Turkish artisanal Tulum cheese microbiota. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101497, 2022.

ISHIKAWA, M.; KODAMA, K.; YASUDA, H.; OKAMOTO-KAINUMA, A.; KOIZUMI, K.; YAMASATO, K. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 308–313, 2006.

JIANG, S.; CAI, L.; LV, L.; LI, L. *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 45, 2021.

KOTHE, C. I.; MOHELLIBI, N.; RENAULT, P. Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. **Food Research International**, v. 157, p. 111265, 2022.

PAPADAKIS, P.; KONTELES, S.; BATRINO, A.; OUZOUNIS, S.; TSIRONI, T.; HALVATSIOTIS, P.; TSAKALI, E.; VAN IMPE, J. F. M.; VOUGIOUKLAKI, D.; STRATI, I. F. Characterization of bacterial microbiota of P.D.O. Feta cheese by 16S metagenomic analysis. **Microorganisms**, v. 9, p. 2377, 2021.

PAPADIMITRIOU, K.; ANASTASIOU, R.; GEORGALAKI, M.; BOUNENNI, R.; PAXIMADAKI, A.; CHARMPI, C.; ALEXANDRAKI, V.; KAZOU, M.; TSAKALIDOU, E. Comparison of the microbiome of artisanal homemade and industrial Feta cheese through amplicon sequencing and shotgun metagenomics. **Microorganisms**, v. 10, p. 1073, 2022.

PLANÝ, M.; KUČHTA, T.; ŠOLTÝS, K.; SZEMES, T.; PANGALLO, D.; SIEKEL, P. Metagenomic analysis of Slovak Bryndza cheese using next-generation 16S rDNA amplicon sequencing. **Nova Biotechnologica et Chimica**, v. 15, p. 23–34, 2016.

SANT'ANNA, F. M.; WETZELS, S. U.; CICCIO, S. H. S.; FIGUEIREDO, R. C.; SALES, G. A.; FIGUEIREDO, N. C.; NUNES, C. A.; SCHMITZ-ESSER, S.; MANN, E.; WAGNER, M. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v. 82, p. 349–362, 2019.

SUÁREZ, N.; WECKX, S.; MINAHK, C.; HEBERT, E.; SAAVEDRA, L. Metagenomics-based approach for studying and selecting bioprotective strains from the bacterial community of artisanal cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 108894, 2020.