

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo de coalho: influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos

Juliana Miguel Perri

Bióloga

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P426b	<p>Perri, Juliana Miguel</p> <p>Bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> em queijo de coalho influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos / Juliana Miguel Perri. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos</p> <p>1. Gênero <i>Enterococcus</i>. 2. Segurança alimentar. 3. Queijo de coalho. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p> <p>(lpm/fea)</p>
-------	---

Título em inglês: Bacteria of the genus *Enterococcus* in coalho cheese: influence of the processing on microbial selection, technological profile and implications in food safety
Palavras-chave em inglês (Keywords): *Enterococcus* genus, , Food safety, Coalho cheese.

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos
Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Walkiria Hanada Viotto
Maristela da Silva do Nascimento

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

JULIANA MIGUEL PERRI

Bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo de coalho: influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro Titular)

Dra. Maristela da Silva do Nascimento
(Membro Titular)

Prof. Dr. José Luis Pereira
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
(Membro Suplente)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O gênero <i>Enterococcus</i>	3
2.1.1. Filogenia e taxonomia	3
2.1.2. Habitats e fontes de contaminação	4
2.1.3. Presença em queijos	8
2.1.4. Propriedades tecnológicas	8
2.1.4.1. Atividade acidificante	8
2.1.4.2. Proteólise	9
2.1.4.3. Lipólise	10
2.1.4.4. Utilização de citrato e produção de diacetil	11
2.1.4.5. Perfil enzimático	12
2.1.4.6. Antagonismo frente a patógenos alimentares	13
2.1.5. Patogenicidade	15
2.1.6. Uso comercial	18
2.2. O queijo de coalho	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Processamento do queijo de coalho	22

4.1.1. Etapas	22
4.1.2. Amostragem	24
4.2. Contagem de bactérias lácticas	24
4.3. Isolamento, contagem e identificação das bactérias do gênero <i>Enterococcus</i>	25
4.4. Caracterização tecnológica dos isolados	26
4.4.1. Produção de diacetil	26
4.4.2. Utilização de citrato como fonte de carbono	26
4.4.3. Perfil em leite tornasolado (Litmus Milk)	27
4.4.4. Proteólise	27
4.4.5. Lipólise	27
4.5. Avaliação da patogenicidade	27
4.5.1. Pesquisa da expressão de fatores de virulência	27
4.5.1.1. Hemólise	28
4.5.1.2. Gelatinase	28
4.5.2. Produção de aminas biogênicas	28
4.5.3. Resistência intrínseca à vancomicina	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Avaliação do comportamento da microbiota láctea	30
5.1.1. Ação do tratamento térmico	30
5.1.2. Ao longo do processamento	33
5.1.2.1. Efeito do cozimento da massa	33
5.1.2.2. Presença no soro	36
5.1.2.3. Efeito da salga	36
5.1.2.4. No produto queijo de coalho	37
5.1.3. Durante período de armazenamento refrigerado	42
5.2. Perfil das espécies do gênero <i>Enterococcus</i> isoladas	50
5.3. Caracterização tecnológica dos isolados	53

5.3.1. Produção de diacetil	53
5.3.2. Utilização do citrato	53
5.3.3. Atividade acidificante	54
5.3.4. Atividade proteolítica	55
5.4.5. Atividade lipolítica	56
5.4. Perfil de patogenicidade e de resistência à vancomicina	56
6. CONCLUSÕES GERAIS	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8. ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **5**
Chave de identificação para *Enterococcus* sp (MANERO e BLANCH, 1999).
- Figura 2.** **8**
Diferenciação entre *Enterococcus* e outros cocos Gram-positivos, catalase-negativa segundo Klein (2003) modificado de acordo com Facklam e Elliott (1995) e Reuter (1995).
- Figura 3.** **12**
Curvas de acidificação para espécies de bactérias do gênero *Enterococcus*, obtidas a partir de amostras de produtos lácteos, durante 24h de incubação (37°C). Valores médios para as espécies (MORANDI et al., 2006).
- Figura 4.** **25**
Fluxograma do processamento de queijo de coalho
- Figura 5.** **36**
Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de leite cru (LC), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5°C (LP24h).
- Figura 6. (a, b, c)** **39**
Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos, em amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5°C (LP24h), massa após cozimento (MC) a 40, 45 e 50°C.
- Figura 7. (a, b, c)** **45**
Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp, nos 3 processamentos (P), em amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5 °C (LP24h), massa após cozimento (MC) a 40, 45 e 50°C, massa após salga (MS) e queijo com 5 dias de produção.
- Figura 8. (a, b, c)** **52**
Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) nos 3 processamentos, em amostras queijo com 5 dias de produção e com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado.
- Figura 9. (a, b, c)** **54**
Contagem de *Enterococcus* sp nos 3 processamentos, em amostras queijo com 5 dias de produção e com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** **6**
Espécies submetidas ao GenBank para o gênero *Enterococcus* (NCBI, 2009).
- Tabela 2.** **16**
Perfil enzimático de cepas de *Enterococcus* isoladas de leite de ovelha cru e de queijos Roncal e Idiazábal (ARIZCUN et al., 1997).
- Tabela 3.** **34**
Contagem (UFC/mL) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp em amostras de leite cru (LC), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5°C (LP24h), valores dos 3 processamentos (P).
- Tabela 4.** **38**
Contagem (UFC/mL) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P) em amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado (LP24h) e em amostras de massa após cozimento (MC) em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).
- Tabela 5.** **41**
Contagem (UCF/mL) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P) em amostras de soro (S) após cozimento da massa em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).
- Tabela 6.** **42**
Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos, em amostras de massa após salga (MS), após cozimento da massa em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).
- Tabela 7.** **44**
Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P) em amostras de queijo com 5 dias de produção (QD5), após cozimento da massa em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).
- Tabela 8.** **47**
Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P) em amostras de massa após cozimento (MC) em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C), massa após salga (MS) e queijo com 5 dias de produção (QD5).
- Tabela 9.** **49**
Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3

processamentos (P), em amostras de queijo com 20 (QD20), 40 (QD40), 60 (QD60) e 90 (QD90) dias de armazenamento refrigerado, provenientes de diferentes temperaturas de cozimento da massa (40, 45 e 50°C).

Tabela 10.	56
Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e <i>Enterococcus</i> sp nos 3 processamentos (P), em amostras de queijo com 5 (QD5), 20 (QD20), 40 (QD40), 60 (QD60) e 90 (QD90) dias de armazenamento refrigerado, provenientes de diferentes temperaturas de cozimento da massa (40, 45 e 50°C).	
Tabela 11.	59
Origem das colônias selecionadas para fins de confirmação em gênero.	
Tabela 12.	59
Origem dos isolados confirmados para o gênero <i>Enterococcus</i> .	
Tabela 13.	60
Origem dos isolados não confirmados para o gênero <i>Enterococcus</i> .	
Tabela 14.	60
Origem dos isolados confirmados para o gênero <i>Enterococcus</i> , selecionados para identificação em espécie.	
Tabela 15.	61
Características bioquímicas e de crescimento das espécies identificadas.	

RESUMO

Bactérias do gênero *Enterococcus* ocorrem naturalmente como microbiota láctica numa variedade de queijos. Esta presença pode ser relacionada à contaminação, porém pode ter caráter positivo devido à propriedades tecnológicas descritas para o gênero. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do processamento de queijo de coalho na seleção de bactérias do gênero *Enterococcus*, como também determinar o perfil tecnológico e as possíveis implicações em segurança de alimentos da presença de bactérias desse gênero no produto queijo de coalho. Para elaboração dos queijos, os parâmetros de tratamento térmico foram: pasteurização rápida e cozimento da massa em três diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C). Os resultados evidenciaram a ação seletiva do processamento para bactérias do gênero *Enterococcus*, sendo a etapa de pasteurização incapaz da eliminação. Tanto a etapa de cozimento da massa, quanto de salga favoreceram o crescimento deste gênero de modo seletivo dentre o total de bactérias lácticas presentes, sem discriminação entre as diferentes temperaturas de cozimento utilizadas. Dentre as espécies identificadas, *E. faecium* foi a de maior incidência (83,9%), seguida pela espécie *E. faecalis* (0,6%). O perfil tecnológico das bactérias identificadas mostrou que estas podem ser capazes de contribuir ativamente com o desenvolvimento de atributos de sabor e aroma característicos ao produto. As bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas apresentaram baixa atividade acidificante porém há incidência de isolados com características de fermento termofílico que podem participar na obtenção de resultados tecnológicos satisfatórios neste produto queijo de coalho. A presença destas bactérias em alimentos deve ser avaliada principalmente em relação à patogenicidade relacionada à gelatinase, encontrada em apenas uma cepa, e a outras características não detectadas, mas capazes de serem adquiridas.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Enterococcus* occur naturally as a lactic microbiota in a variety of cheeses. This presence may be related to contamination however may have positive character due to the technological properties described for the genus. This work aimed to evaluate the influence of coalho cheese processing in the selection of bacteria of the genus *Enterococcus* as well as determine the technological profile and possible food safety implications by the presence of bacteria in the coalho cheese product. For cheese manufacturing, the parameters of heat treatment were: rapid pasteurization and curd cooking at three different temperatures (40, 45 and 50°C). The results showed the selective action of the processing for bacteria of the genus *Enterococcus*, having, the step of pasteurization, been incapable of elimination. Both the steps of curd cooking and the curd salting selectively favored the growth of this genus, within the total of the present lactic acid bacteria, without any discrimination between the different temperatures used. Within the bacteria species identified, *E. faecium* was the most occurrent (83,9%), followed by the specie *E. faecalis* (0,6%). The technological profile of the identified bacteria showed that they may be able to actively contribute to the development of the characteristic flavour to the product. The isolated bacteria of the genus *Enterococcus* showed low acidifying activity but there are incidence of isolates with thermophilic starter characteristics that may be able to participate in obtaining satisfactory results in this coalho cheese product. The presence of these bacteria in foods must be evaluated mainly due to the characteristic of pathogenicity-related gelatinase, found in only one isolated strain, and other features not found but that could be acquired.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Bactérias do gênero *Enterococcus* ocorrem naturalmente como microbiota lática numa variedade de queijos produzidos a partir de leite de vaca, cabra, ovelha ou búfala; cru ou pasteurizado (GIRAFFA, 2003).

A presença destas bactérias em queijo ou mesmo no leite pode ser relacionada à contaminação fecal por manipulação ou mesmo pela água. Esta contaminação pode ainda ter origem ambiental (ar, solo) ou em equipamentos de ordenha e armazenamento através de possível formação de biofilme ou falhas nos processos de higienização (GELSOMINO et al., 2001).

Em queijo, bactérias do gênero *Enterococcus* podem ter caráter positivo devido à propriedades tecnológicas descritas para o gênero como atividade acidificante, proteolítica, lipolítica, utilização de citrato e produção de diacetil, porém fato importante é que atualmente tais bactérias são relacionadas à infecções hospitalares, sendo incluídas no grupo de patógenos humanos oportunistas emergentes (GIRAFFA, 2003; MORANDI et al., 2006).

Vários estudos indicam que a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em queijos tradicionais como Manchego, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco e Comté tem caráter positivo influenciando tanto na produção quanto na maturação. Nesses queijos, o gênero é o predominante na microbiota inicial e, em alguns casos, é também predominante no final do período de maturação (GIRAFFA, 2003).

Um queijo típico do nordeste brasileiro em que o gênero *Enterococcus* é relatado como predominante é o queijo de coalho. Neste queijo a predominância é relacionada a uma possível ação seletiva das etapas de tratamento térmico do processamento – pasteurização do leite e cozimento da massa (CARVALHO, 2007).

A presença dominante dessas bactérias no queijo de coalho pode estar relacionada também à produção de diacetil e ao conseqüente sabor e aroma de

manteiga típicos desse queijo. Tais atributos são os mais apreciados sendo considerados os de maior impacto na qualidade do produto (PEREZ, 2005).

Atualmente, o consumo deste tipo de queijo vem se difundindo pelo Brasil sob forma de espeto para churrasco, elaborado industrialmente a partir de leite pasteurizado e comercializado em hipermercados sob temperatura de refrigeração de 10°C e vida de prateleira de no máximo 120 dias (PEREZ, 2005).

Muitas vezes a produção desses queijos é artesanal e feita por pequenos pecuaristas, principalmente da zona rural nordestina, e representa importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar local. Essa produção artesanal em geral ocorre sob condições higiênico-sanitárias e estruturais precárias, sendo a qualidade do queijo produzido objeto de preocupação de autoridades sanitárias, podendo representar perigo à saúde do consumidor (CAVALCANTE, 2005).

Pesquisas mostram a ocorrência de vários patógenos em queijo de coalho, tanto de produção artesanal quanto industrial. Os patógenos relatados são *Staphylococcus coagulase positiva* (BORGES et al., 2003, BENEVIDES et al., 2001), *Salmonella* spp. (BORGES et al., 2003), *Escherichia coli* (BORGES et al., 2003) e *Listeria monocytogenes* (BORGES et al., 2003; BRANCO et al., 2003; FEITOSA et al., 2003).

No contexto apresentado, um estudo que avalie o comportamento de bactérias do gênero *Enterococcus* tanto ao longo do processamento de queijo de coalho, quanto durante período de armazenamento refrigerado, pode contribuir com informações sobre possíveis influências das etapas de tratamento térmico na seleção microbiana. Além disso, a caracterização tecnológica dos isolados poderá revelar possíveis participações destes microrganismos no perfil bioquímico e sensorial do produto e a avaliação da seguridade da presença de bactérias do gênero *Enterococcus* no produto queijo de coalho poderá orientar possíveis medidas de controle e/ou intervenção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Enterococcus*

2.1.1 Filogenia e taxonomia

O nome *enterococcus* foi pela primeira vez usado por Thiercelin (1899) para descrever microrganismos de origem fecal dispostos em pares ou em cadeias curtas (PARKER e COLLIER, 1990).

Posteriormente, este nome foi atribuído por Sherman (1937) à *Streptococcus* capazes de crescer sob temperaturas na faixa de 10 a 45°C, em pH 9,6, em concentração de 6,5% de NaCl e capazes de resistir a tratamento térmico de 60°C por 30 minutos. Dessa forma, Sherman (1937) propõe uma nova classificação ao gênero *Streptococcus*, que ficaria composto de quatro divisões: “pyrogenic”, “viridans”, “lactic” e “*Enterococcus*”, estes incluindo as espécies *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus* - denominadas linhagens do grupo D (FRANZ et al., 1999).

Quanto à morfologia, bactérias do gênero *Enterococcus* são descritas como formadoras de colônias em média de 1 a 2mm de diâmetro, sendo que algumas espécies saprófitas podem ser móveis apresentando um ou dois flagelos. Algumas espécies podem ser encapsuladas (PARKER e COLLINS, 1990).

Nem todas as bactérias do gênero *Enterococcus* possuem antígenos do grupo D. Outros microrganismos como, por exemplo, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus alactolyticus*, *Pediococcus* e certas cepas de *Leuconostoc* também são capazes de reagir positivamente com anti-soro Lancefield grupo D (FRANZ et al., 1999).

Da mesma forma, não só as bactérias do gênero *Enterococcus* são descritas como cocos Gram-positivo, catalase negativa, anaeróbicos facultativos, homofermentadores produtores de L-ácido a partir de hexoses. Membros dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* também os são, porém a maioria destes não crescem a 10 e a 45°C, em 6,5% de NaCl, na presença de 40% de sais

biliares, em faixa de pH de 3 a 9,6 e sobrevivem a tratamento térmico de 60°C por 30 minutos (FRANZ et al., 2003).

Algumas cepas de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc* são também capazes de crescer na presença de 6,5% de NaCl, porém algumas espécies de *Enterococcus* como *E. cecorum*, *E. columbae* e *E. avium* não. Além disso, *Pediococcus* e algumas cepas de *Lactococcus* são também capazes de crescer a 45°C, e muitos *Lactococcus*, *Leuconostoc* e alguns *Streptococcus* crescem a 10°C, porém em geral as espécies *E. avium* não (FRANZ et al., 1999).

Estas variações intra-específicas de características fenotípicas típicas ao gênero *Enterococcus* dificultam a identificação quanto às espécies, porém a identificação com base fenotípica bioquímica ainda é feita (FRANZ et al., 2003).

Manero e Blanch (1999) propuseram uma chave bioquímica em 6 passos, para identificação em espécies, de bactérias do gênero *Enterococcus*, baseada em 12 testes (**Figura 1**). A chave apesar de abranger as principais espécies incidentes em alimentos (*E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans*) e de incluir espécies de origem clínica, foi elaborada para a identificação rápida de apenas 19 espécies de *Enterococcus* e, segundo registros do “National Center for Biotechnology Information” - NCBI, até o momento são 42 as espécies descritas (**Tabela 1**).

Outra chave para possível diferenciação entre gêneros e entre espécies de bactérias do *Enterococcus* de importância tecnológica, por meio de testes simplificados, é apresentada por Klein (2003), modificada de acordo com Facklam e Elliott (1995) e Reuter (1995) (**Figura 2**).

2.1.2 Habitats e fontes de contaminação

Bactérias do gênero *Enterococcus* são predominantemente comensais gastrointestinais, podendo atuar como indicadores de qualidade sanitária de alimentos. Podem também ser encontradas em outros habitats como solo e vegetais, devido às características de tolerância e sobrevivência sob condições adversas, descritas ao gênero. Ocorrem em grande número de vegetais e alimentos fermentados de origem animal como por exemplo carnes e queijos (GIRAFFA, 2002; GELSOMINO et al, 2001).

Vários estudos mostram que bactérias do gênero *Enterococcus*, geneticamente indistinguíveis, têm sido encontradas tanto em animais como em humanos. Dessa forma, tais bactérias são consideradas ubiqüitárias, podendo ser naturalmente transmitidas de alimentos ou do ambiente para o trato gastrointestinal humano, e vice-versa (FRANZ et al., 2003).

Segundo Gelsomino e colaboradores (2001), a origem das bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo Cheddar está relacionada à capacidade de sobrevivência destes microrganismos à procedimentos de higienização aplicados aos equipamentos da linha de produção. A partir de possível formação de biofilme, as bactérias seriam transferidas ao leite e deste ao queijo, que ingerido transferiria por sua vez os microrganismos ao intestino humano. A fonte original de contaminação não é determinada de forma clara, porém exclui-se a possibilidade de a origem ser fecal animal.

A utilização dessas bactérias como indicadores de contaminação fecal apresenta-se, assim, restrita por suas características de habitat não-específico, porém a presença mostra práticas sanitárias inadequadas no manuseio, na conservação do produto ou nos procedimentos de higienização (GELSOMINO et al., 2001).

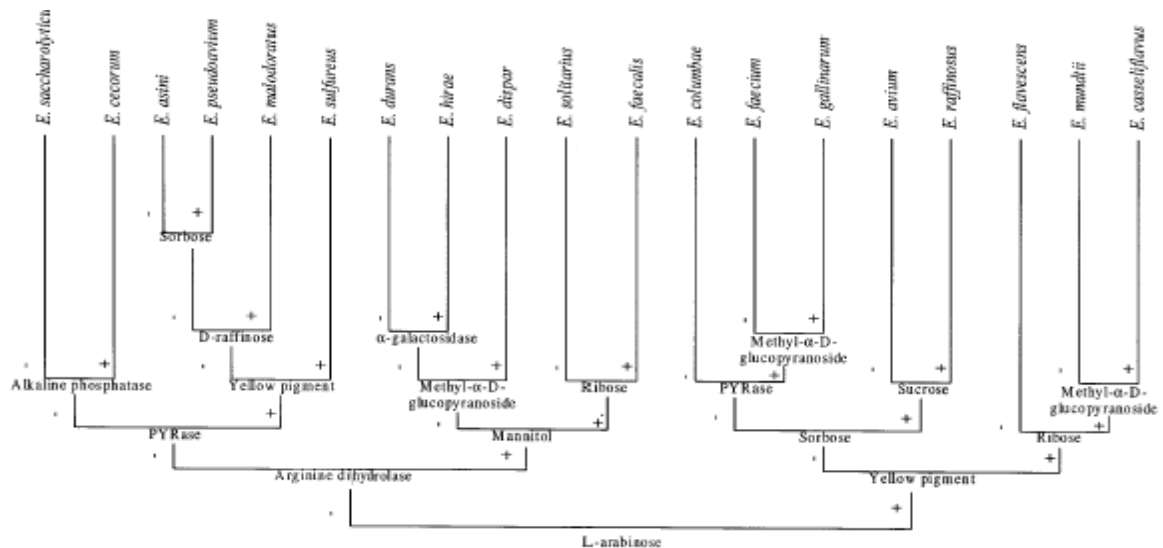


Figura 1. Chave de identificação para *Enterococcus* sp (MANERO e BLANCH, 1999).

Tabela 1. Espécies submetidas ao GenBank para o gênero *Enterococcus* (NCBI, 2009).

espécie	Referência
1. <i>Enterococcus aquimarinus</i>	SVEC et al., 2005
2. <i>Enterococcus asini</i>	DE VAUX et al., 1998
3. <i>Enterococcus avium</i>	COLLINS et al., 1984
4. <i>Enterococcus azikeevi</i>	GILVANOVA et al., 2001
5. <i>Enterococcus caccae</i>	CARVALHO et al., 2006
6. <i>Enterococcus camelliae</i>	SUKONTASING et al., 2007
7. <i>Enterococcus canintestini</i>	NASER et al., 2005
8. <i>Enterococcus canis</i>	DE GRAEF et al., 2003
- <i>Enterococcus carnosus</i> (1)	
9. <i>Enterococcus casseliflavus</i> (2)	COLLINS et al., 1984; VAUGHAN et al., 1979
10. <i>Enterococcus cecorum</i>	DEVRIESE et al., 1983; WILLIAMS et al., 1989
11. <i>Enterococcus columbae</i>	DEVRIESE et al., 1990
12. <i>Enterococcus devriesei</i>	SVEC et al., 2005
13. <i>Enterococcus dispar</i>	COLLINS et al., 1991
14. <i>Enterococcus durans</i>	SHERMAN e WING, 1937; KNIGHT et al., 1984; COLLINS et al., 1984
15. <i>Enterococcus faecalis</i>	ANDREWES e HORDER, 1906; SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984
16. <i>Enterococcus faecium</i>	SKERMAN et al., 1980; SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984
- <i>Enterococcus flavescens</i> (3)	POMPEI et al., 1992; NASER et al., 2006
17. <i>Enterococcus gallinarum</i>	MOORE, et al., 1985; COLLINS et al., 1984; BRIDGE e SNEATH, 198
18. <i>Enterococcus gilvus</i>	TYRRELL et al., 2002
19. <i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	SVEC et al., 2001
20. <i>Enterococcus hawaiiensis</i>	CARVALHO et al., 2004
21. <i>Enterococcus hermannienseis</i>	KOORT et al., 2004
22. <i>Enterococcus hirae</i>	FARROW e COLLINS, 1985
23. <i>Enterococcus inusitatus</i>	MOREIRA et al., 2005
24. <i>Enterococcus italicus</i>	CARVALHO et al., 2004; FORTINA et al., 2004; NASER et al., 2006; CARVALHO et al., 2008
25. <i>Enterococcus lactis</i>	BOTINA et al., 2006
26. <i>Enterococcus malodoratus</i>	COLLINS et al., 1984
27. <i>Enterococcus moraviensis</i>	SVEC et al., 2001
28. <i>Enterococcus mundtii</i>	COLLINS et al., 1986
29. <i>Enterococcus pallens</i>	TYRRELL et al., 2002
30. <i>Enterococcus phoeniculicola</i>	LAW-BROWN e MEYERS, 2003
- <i>Enterococcus porcinus</i> (4)	TEIXEIRA et al., 2001; DE GRAEF, et al., 2003
31. <i>Enterococcus pseudoavium</i>	COLLINS et al., 1989
32. <i>Enterococcus raffinosus</i>	COLLINS et al., 1989
33. <i>Enterococcus ratti</i>	TEIXEIRA et al., 2001
34. <i>Enterococcus rattus</i>	UHL et al., 2001
35. <i>Enterococcus rottae</i>	WEISS et al., 2000
36. <i>Enterococcus saccharolyticus</i>	FARROW et al., 1985; RODRIGUES e COLLINS, 1990
- <i>Enterococcus saccharominimus</i> (5)	VANCANNEY et al., 2004; NASER et al., 2006
37. <i>Enterococcus sanguinicola</i>	CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005
- <i>Enterococcus seriolicida</i> (6)	USUDA et al., 1991; ELDAR et al., 1996
38. <i>Enterococcus silesiacus</i>	SVEC et al., 2006
- <i>Enterococcus solitarius</i> 7	COLLINS et al., 1989; ENNAHAR e YIMIN, 2005
39. <i>Enterococcus sulfureus</i>	MARTINEZ-MURCIA e COLLINS, 1991
40. <i>Enterococcus termitis</i>	SVEC et al., 2006
41. <i>Enterococcus thailandicus</i> (8)	SUKONTASING et al., 2007
42. <i>Enterococcus villorum</i> (9)	VANCANNEYT et al., 2001

1. sinônimo de *E. thailandicus* 2. sinônimo de *E. flavescens* 3. sinônimo de *E. casseliflavus* 4. sinônimo de *E. villorum*
 5. sinônimo de *E. italicus* 6. sinônimo de *Lactococcus garvieae* 7. sinônimo de *Tetragenococcus solitarius* 8. sinônimo de *E. carnosus* 9. sinônimo de *E. Porcinus*

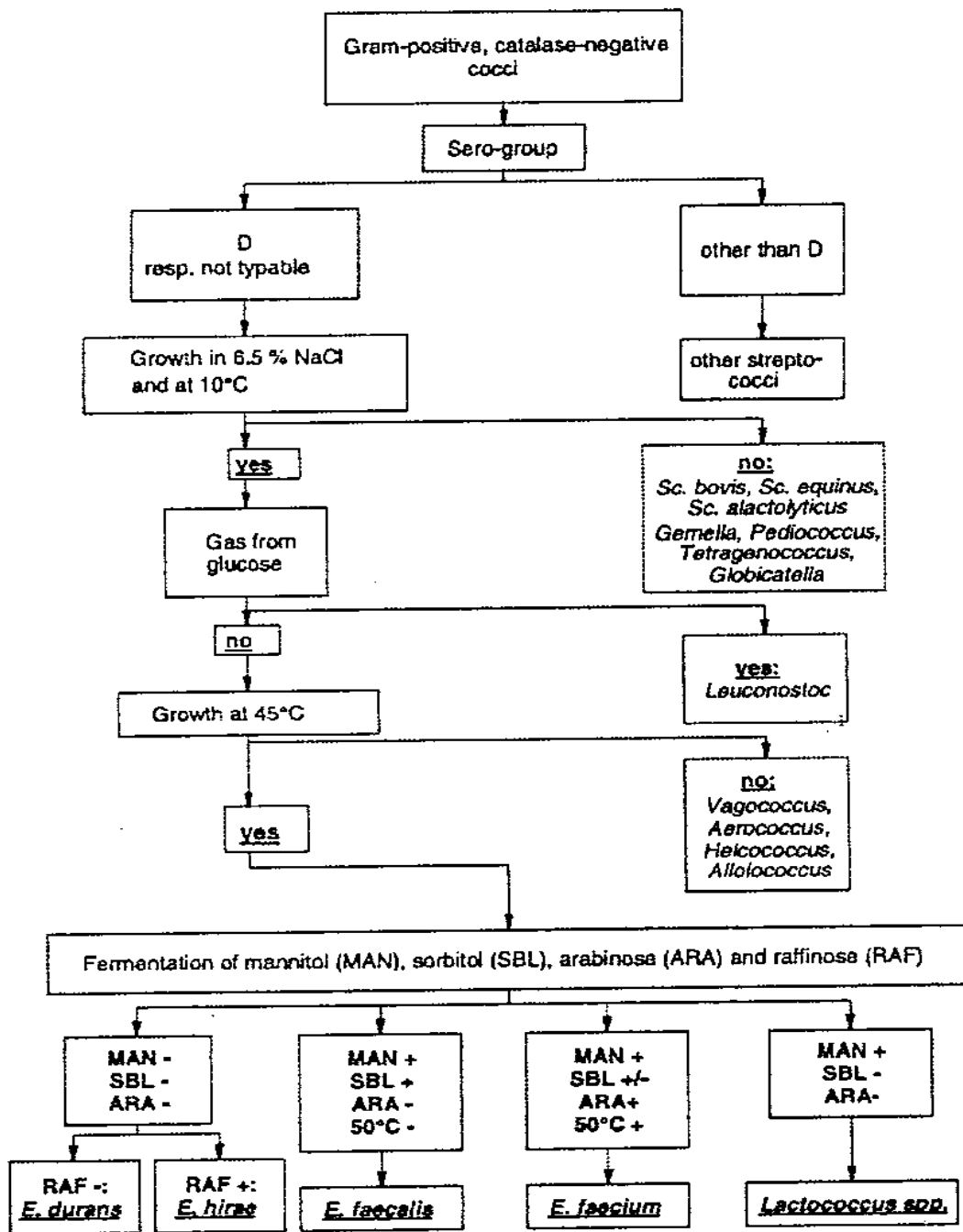


Figura 2. Diferenciação entre bactérias do gênero *Enterococcus* e outros cocos Gram-positivos, catalase-negativa segundo Klein (2003) modificado de acordo com Facklam e Elliott (1995) e Reuter (1995)

2.1.3 Presença em queijos

Enterococcus ocorrem naturalmente como microbiota láctica (“Non Starter Lactic Acid Bactéria” - NSLabs) numa variedade de queijos produzidos a partir de leite de vaca, cabra, ovelha ou búfala, cru ou pasteurizado. A quantidade presente em queijos varia em função da contagem inicial no leite, do tipo de queijo, do fermento usado e da tecnologia aplicada. A presença e a persistência destas bactérias durante períodos de refrigeração, tratamento térmico e maturação podem ser atribuídas às suas características psicrótróficas, termodúricas, de resistência a tratamento térmico (62,8°C/30min), e de sobrevivência e crescimento em ampla faixa de pH e sal (GIRAFFA, 2003).

A contagem de *Enterococcus sp.* em leite cru pode variar em torno de 10^2 UFC/mL e na massa pode chegar a 10^6 UFC/g. Já no final do período de maturação, podem ser detectados níveis de 10^5 a 10^7 UFC/g. *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* são as espécies mais relatadas (GIRAFFA, 2003; GELSOMINO et al., 2001).

A presença dominante de *Enterococcus* dentre as NSLABs comumente relacionadas à queijos pressupõe que estes possam participar no desenvolvimento de sabor e aroma durante o período de maturação, podendo também influenciar no processo de proteólise primária e secundária, e produzir diversas enzimas possíveis de interagir com componentes do leite, promovendo assim outras importantes transformações bioquímicas (GIRAFFA, 2003).

2.1.4 Propriedades tecnológicas

2.1.4.1 Atividade acidificante

Dentre as características tecnológicas relacionadas às bactérias do gênero *Enterococcus* pode-se citar a capacidade acidificante que no geral é baixa não ultrapassando o valor de pH de 5,5 após 24 horas de incubação, porém cepas específicas isoladas de produtos lácteos podem apresentar alto potencial acidificante chegando a um valor de pH de 4,5 após 16 a 24 horas, sendo que as

cepas de *E. faecalis* são geralmente mais acidificantes que cepas de *E. faecium* (GIRAFFA, 2003; MORANDI et al., 2006).

Morandi e colaboradores (2006), em pesquisa realizada em amostras de produtos lácteos observaram que 92% das bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas foram capazes de reduzir o pH a 4,5 - 5,0 após 24 h de incubação a 37°C. Destes isolados, 55,5% foram identificados como *E. faecium*, 54,3% como *E. faecalis* e 66,6% como *E. durans*. As cepas descritas como as mais acidificantes foram identificadas como *E. faecalis* e foram capazes de atingir valores de pH de 4,04 - 4,05; já as descritas como menos acidificantes, também *E. faecalis*, atingiram valores de pH de 5,23-5,13. A **Figura 3** mostra curvas de acidificação obtidas a partir dos 68 isolados obtidos nessa pesquisa.

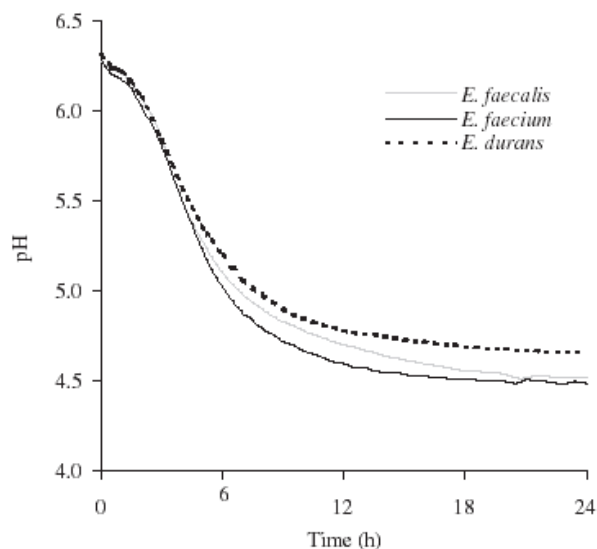


Figura 3. Curvas de acidificação para espécies de bactérias do gênero *Enterococcus* obtidas a partir de amostras de produtos lácteos, durante 24h de incubação (37°C). Valores médios para as espécies (MORANDI et al., 2006).

2.1.4.2 Proteólise

Uma característica tecnológica relevante em *Enterococcus* é a atividade proteolítica e peptidolítica que nas bactérias deste gênero é geralmente baixa, sendo a espécie *E. faecalis* mais ativa que a espécie *E. faecium*. A relação entre atividade acidificante e proteolítica/peptidolítica não é bem definida porém tais características são algumas vezes correlatas sendo que cepas mais proteolíticas geralmente são também mais acidificantes (GIRAFFA, 2003).

Em queijos Roquefort, pesquisas mostram um efeito positivo de cepas de *E. faecalis* var. *liquefaciens* sobre a qualidade do queijo, e, de um modo geral, de *Enterococcus* sp. sobre o crescimento de outras bactérias lácticas devido a intensa atividade proteolítica, que favorece a produção de ácido por *Lactococcus* (DEVOYOD, 1969).

Centeno e colaboradores (1999), em pesquisa realizada com queijo Cebreiro adicionado de *E. faecalis* var. *liquefaciens*, observaram altos níveis de hidrólise da fração β -caseína e um aumento no nível de hidrólise da fração α_{s1} caseína. Já nos queijos adicionados de *E. faecalis* var. *faecalis*, foi observado que a fração α_{s1} foi a mais hidrolisada. Tais pesquisadores relacionaram esses resultados à ação de proteinases intra ou extracelulares produzidas pelos microrganismos adicionados e concluíram que, em geral, aumentos nos níveis de proteólise podem ser esperados em queijos processados com adição de *Enterococcus*.

2.1.4.3 Lipólise

As bactérias do gênero *Enterococcus* possuem atividade lipolítica, geralmente baixa e variável entre espécies e entre cepas isoladas, porém cepas de *E. faecium* isoladas de queijo Serra foram relatadas como mais lipolíticas que espécies de *Lactococcus lactis* subs. *lactis* (MACEDO e MALCATA, 1997).

E. faecalis é descrito como sendo a espécie de maior atividade lipolítica, seguida por *E. faecium* e *E. durans* (MORANDI et al., 2006; GIRAFFA, 2003).

Centeno e colaboradores (1999) relatam que, em queijos Cebreiro produzidos com adição de *E. faecalis* var. *liquefaciens*, níveis maiores de ácidos

graxos de cadeia curta foram detectados, comparativamente à queijos produzidos com adição de *E. faecalis* var. *faecalis*. A presença dos ácidos butírico, caprílico e cáprico foi detectada em todos os queijos produzidos com adição de *E. faecalis* e em alguns queijos foram detectados, além desses, os ácidos isobutírico e isovalérico (este possivelmente a partir da atividade proteolítica de *Enterococcus* e, especialmente, na desaminação da leucina e isoleucina). Um decréscimo nas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta foi observado em alguns queijos de lotes específicos, produzidos com adição de *E. faecalis* var. *liquefaciens*. Tal decréscimo foi relacionado pelos pesquisadores à uma possível oxidação dos componentes ou, alternativamente, à formação de ésteres através de reação com etanol produzido por *E. faecalis*.

2.1.4.4 Utilização de citrato e produção de diacetil

Bactérias do gênero *Enterococcus* são descritas como capazes de metabolizar citrato em componentes sápidos e aromáticos como acetato, acetaldeídos e diacetil. Tal característica é descrita como mais evidente na espécie *E. faecalis* (GIRAFFA, 2003).

De acordo com o trabalho de Centeno e colaboradores (1999), os queijos adicionados de *E. faecalis* apresentaram níveis maiores de diacetil e acetoínas, quando comparados aos queijos controle. Os valores em média encontrados nos queijos produzidos com adição de *E. faecalis* var. *faecalis* foram praticamente constantes durante período de armazenamento, já os valores para os queijos produzidos com *E. faecalis* var. *liquefaciens* decaíram significativamente. Os autores atribuíram tal evento à capacidade de redução do diacetil à butanodiol, descrita para bactérias lácticas. No trabalho também se destaca a possível formação de CO₂ como resultado do metabolismo do citrato e piruvato, e sua possível implicação com defeitos em queijos, porém a textura caracteristicamente quebradiça de queijos Cebreiro dificultaria a observação destes defeitos.

Em pesquisa realizada em queijo Cebreiro produzido a partir de leite cru, *Enterococcus* é descrito como o gênero componente da microbiota mais abundante, e capaz de produzir níveis de proteólise e de diacetil superiores aos

observados para bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* (CENTENO, et al., 1996).

Resultados apresentados por Freitas e colaboradores (1999) mostraram cepas de *E. faecalis* isoladas de leite com uma atividade metabólica para citrato superior à cepas de *E. faecium* isoladas de queijo Picante.

Já Consentino e colaboradores (2004) detectaram atividades metabólicas mais expressivas para cepas de *E. durans* que para cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*, todas isoladas de queijo Fiore Sardo.

2.1.4.5. Perfil enzimático

Arizcun e colaboradores (1997) descrevem *Enterococcus* como um gênero altamente heterogêneo intra e interespécie, semelhantemente ao descrito para bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus*, sendo de extrema importância o estudo individual para seleção de cepas para o uso no processamento industrial. Segundo estes pesquisadores, essas bactérias são capazes de baixos níveis de atividade enzimática extracelular.

Dentre as cepas testadas por tais pesquisadores, os maiores níveis enzimáticos encontrados foram para as enzimas leucina, valina e cisteína arilamidase, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, β -galactosidase e α -glucosidase (níveis de hidrólise de substratos > 40 nanomoles - **Tabela 2**). Os níveis de atividade aminopeptidolítica foram maiores a pH 7 e menores a pH 5,5, fato que pode representar a pouca representatividade desta atividade enzimática em processamentos de queijos.

Já El-Din e colaboradores (2001), com objetivo de selecionar cepas adequadas a serem utilizadas para melhoramento de propriedades organolépticas de queijos, pesquisaram, dentre outras, a atividade aminopeptidolítica em cepas de *Enterococcus* isoladas de queijos Domiatti e Mish (queijos egípcios) feitos com leite cru. Tal atividade foi mais expressiva para a hidrólise de derivados de leucina que para hidrólise de derivados de arginina, alanina, prolina ou glicina.

Tabela 2. Perfil enzimático de cepas de *Enterococcus* isoladas de leite de ovelha cru e de queijos Roncal e Idiazábal (ARIZCUN et al., 1997).

Enzyme	Strain no.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Alkaline phosphatase	0	5	0	5	5	0	0	0	5	5	0	5	0
Esterase	10	10	10	10	10	20	5	5	10	5	5	0	10
Esterase lipase	20	20	20	20	10	20	20	5	20	10	5	20	10
Lipase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
Leucine arylamidase	30	20	30	30	>40	>40	20	>40	>40	40	30	30	>40
Valine arylamidase	0	5	20	5	>40	10	10	30	5	>40	30	5	5
Cysteine arylamidase	5	10	5	30	20	5	5	5	>40	5	5	5	10
Trypsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chymotrypsin	0	10	0	5	10	5	0	0	5	0	0	10	5
Acid phosphatase	5	20	5	30	20	5	5	10	30	10	10	20	10
Naphthol-AS-BI phosphohydrolase	0	5	5	>40	5	5	0	5	10	10	5	5	5
α -Galactosidase	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	10	0	0
β -Galactosidase	>40	30	20	5	>40	5	30	>40	5	20	>40	10	5
β -Glucuronidase	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0
α -Glucosidase	0	30	10	5	10	5	5	>40	>40	10	20	30	30
β -Glucosidase	0	0	0	0	5	0	5	30	5	0	30	0	0
N-Acetyl- β -glucosaminidase	0	0	5	0	10	0	0	0	0	20	0	0	0
α -Mannosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Fucosidase	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0

Valores em nanomoles de substrato hidrolisado - Cepas 1 a 10: *E. faecalis*; cepas 11 e 12: *E. faecium*; cepa nº13: *E. avium*.

2.1.4.5 Antagonismo frente à patógenos alimentares

Uma característica a ser destacada para as bactérias do gênero *Enterococcus* é a capacidade de antagonismo frente a patógenos alimentares e de produção de enterocinas – bacteriocinas pertencentes à classe II, capazes de inibir bactérias Gram-positivas como *L. monocytogenes* ou até mesmo Gram-negativas como *E. coli* (SABIA et al., 2002; GÁLVEZ et al., 1989).

Cintas e colaboradores (1998) mostraram que a enterocina L50, obtida a partir de *Enterococcus* isolado de embutidos fermentados secos espanhóis foi muito efetiva contra *L. monocytogenes* resistente à nisina A e lactocina S. Esta enterocina também apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*, todos sensíveis à nisina A e lactocina S.

Enterocinas ou culturas lácticas contendo cepas de *Enterococcus* produtoras de enterocinas têm sido usadas em estudos a fim de se garantir a seguridade de queijos frente à patógenos, porém há relatos que a presença de renina, CaCl₂ e outras bactérias do gênero *Enterococcus* NSLAB podem influenciar nessa produção (FRANZ et al., 2003).

De acordo com Sarantinopoulos e colaboradores (2002), muitas enterocinas apresentam-se como metabólitos primários, sendo produzidas na fase exponencial de crescimento bacteriano. Um pico de atividade destas bacteriocinas é geralmente obtido no meio da fase de crescimento exponencial, entretanto, de modo geral, a atividade de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas é máxima no final da fase de crescimento exponencial.

Considerando então que a produção de bacteriocinas é um processo relacionado ao crescimento bacteriano, condições favoráveis a este são também favoráveis à produção de bacteriocinas, entretanto condições ótimas de crescimento bacteriano não necessariamente resultam em altos níveis de atividade das bacteriocinas. Fatores ambientais como pH, temperatura e atividade de água devem ser consideradas pois afetam não somente a quantidade de células bacteriocinogênicas produzidas mas também determinam a produção de bacteriocinas por célula, além disso, o ambiente em que as bactérias se encontram pode interferir também na estabilidade da bacteriocina produzida (SARANTINOPOULOS et al., 2002).

Ao final da fase log e durante a fase estacionária de crescimento, a atividade da bacteriocina diminui rapidamente. Vários mecanismos podem ser responsáveis por este decréscimo de atividade das bacteriocinas, dentre eles agregação da proteína, degradação proteolítica por enzimas específicas ou não específicas e adsorção destas bacteriocinas às próprias células bacteriocinogênicas (SARANTINOPOULOS et al., 2002)

Além das enterocinas, as bactérias do gênero *Enterococcus* são capazes também de produzir outros compostos bactericidas incluindo os ácidos orgânicos, que fazem baixar o pH, o peróxido de hidrogênio e enzimas bacteriolíticas (CINTAS et al., 1998; GUERRA e BERNARDO, 2001).

Desta forma, a ação das bacteriocinas em produtos como por exemplo queijos, deve ser analisada com base no "ecossistema" proporcionado pelo produto, considerando-se NSLABs, condições de processamento, tipo de matéria prima e condições ambientais como pH, sal, etc.(SARANTINOPOULOS, 2002).

No caso de queijos tipo Feta, um queijo grego macio elaborado com leite de

ovelha cru ou pasteurizado, ou mesmo com misturas de leite de cabra e ovelha, a presença por exemplo de *Listeria* spp. nunca foi relatada. Este fato pode ser atribuído ao próprio ecossistema do queijo Feta, onde bactérias do gênero *Enterococcus* compõem parte significativa da microbiota (SARANTONOUPOULOS et al., 2002).

Em queijo Feta, fatores como lactose, sal e a presença de renina podem influenciar no crescimento de cepas de *E. faecium* FAIR-E 198 e na produção *in situ* de enterocinas. Outros exemplos de ação de inibição da produção de bacteriocinas por cloreto de sódio são produção de aminolovorina L471 por *Lb. amylovorus* DCE 417, produção de sakacina K por *Lb. sakei* CTC 494 e produção de enterocina por *E. faecium* CTC 492, já a produção e a atividade de lactocina 705 não sofre tais efeitos da presença de NaCl (SARANTONOUPOULOS et al., 2002).

2.1.5 Patogenicidade

Para ser considerado patógeno, é necessário que o microrganismo seja capaz de colonizar, aderir, invadir e sobreviver no hospedeiro; deve produzir alterações funcionais neste hospedeiro levando-o a debilidade física. Essas alterações funcionais estão relacionadas diretamente à produção de substâncias, ou indiretamente por meio do desencadeamento de processos inflamatórios (JOHNSON, 1994).

Das substâncias produzidas, destacam-se as citolisinas, as proteases e as aminas biogênicas (FRANZ et al., 2003; GIRAFFA, 2002).

Dentre as citolisinas, destaca-se a hemolisina que é uma toxina celular capaz de lisar células do sistema imune, como estratégia para a persistência do microrganismo no hospedeiro (FRANZ et al.; 2003).

As proteases, assim como as hemolisinas, são descritas como relacionadas à patogenicidade de bactérias do gênero *Enterococcus*. Dentre as proteases destacam-se as gelatinases, metaloendopeptidases extracelulares capazes de agir sobre colágeno tissular. Estudos mostram que *E. faecalis* produtores de protease são comuns dentre isolados de pacientes com endocardite ou outras

infecções hospitalares (FRANZ et al., 2003).

Bactérias do gênero *Enterococcus* têm sido relatadas como hábeis em descarboxilação de aminoácidos livres, produzindo aminas biogênicas, principalmente tiraminas. Este fato é destacado em queijos, por ser considerado substrato favorável à produção e acúmulo de tal amina biogênica (GIRAFFA, 2002).

A avaliação da seguridade de cepas isoladas de bactérias do gênero *Enterococcus* é relativamente complexa, pois a simples verificação da expressão de fatores de virulência não é suficiente. Diferentes mecanismos de transferência genética (plasmídios ferormônio induzidos, conjugativos, não conjugativos e transposons) são descritos para o gênero. Dessa forma, cepas que não possuam fatores determinantes de virulência podem rapidamente adquirir-los a partir de outras cepas do mesmo gênero ou de gêneros diferentes (FRANZ et al., 2003).

Por esta razão, em relatório elaborado pela comissão técnica da “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAO) em conjunto com equipe da World Health Organization (WHO), bactérias do gênero *Enterococcus* não são recomendadas para uso humano apesar de seu reconhecido potencial probiótico (FAO/WHO, 2001).

Cabe colocar também que, o estabelecimento de infecções por *Enterococcus* não é determinado apenas pela presença e expressão de fatores de virulência. É necessário que ocorra uma seqüência de eventos envolvendo colonização, adesão e invasão celular, resistência a mecanismos de defesa específicos e não específicos produzidos pelo hospedeiro (JOHNSON, 1994).

Além disso, é necessário que estejam também presentes fatores de susceptibilidade como condições fisiológicas desfavoráveis, doenças associadas e imunossupressão (FRANZ et al., 2003).

Eaton e Gasson (2001) mostraram que fatores de virulência podem ser encontrados em bactérias do gênero *Enterococcus* tanto isoladas de alimentos quanto de origem clínica ou mesmo em cepas comerciais. Entretanto, a incidência de fatores de virulência é mais alta em isolados clínicos, seguidos por isolados de alimentos e por ultimo cepas comerciais.

Apesar de alguns isolados serem considerados patógenos oportunistas, cepas isoladas de alimentos devem ser criteriosamente analisadas pois, embora descritas como possuidoras de um ou vários fatores de virulência, a incidência de casos de infecção por bactérias isoladas de alimentos é muito baixa frente à incidência de infecções causadas por bactérias isoladas em ambiente hospitalar, que geram graves conseqüências (FRANZ, 2003).

Outro ponto a ser considerado é a resistência intrínseca à antibióticos descrita para o gênero *Enterococcus*, mediada por genes cromossomais, e a resistência adquirida à antibióticos, mediada por genes plasmidiais ou residentes em transposons (FRANZ et al., 2003).

Dessa forma, as bactérias do gênero *Enterococcus* não são apenas intrinsecamente resistentes à antibióticos, mas são também caracterizadas como potencialmente capazes de adquirir tais características por meio de alterações genéticas (GIRAFFA, 2002).

Um exemplo desta resistência adquirida inclui a resistência à vancomicina, que merece especial abordagem por tal antibiótico ser considerado o último recurso no tratamento de infecções causadas por bactérias do gênero *Enterococcus* múltiplo-resistentes (FRANZ et al., 2003).

Segundo Giraffa (2002), pressões seletivas exercidas pelo uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crescimento para animais para abate parecem ter criado reservatórios de transferência de resistência à antibióticos em vários ecossistemas. Com a emergência da resistência à glicopeptídeos em *Enterococcus faecium* fora de ambiente hospitalar, um grande reservatório de genes de resistência passíveis à transferência (clusters de genes VanA) foram identificados em animais confinados após o uso de avoparcina como aditivo alimentar.

Na Europa, desde os anos 70, o glicopeptídeo avoparcina foi utilizado como promotor de crescimento em aves e suínos porém este antibiótico não é metabolizado nos animais após a ingestão e permanece no intestino de forma ativa. A avoparcina é uma molécula similar à vancomicina com os mesmos mecanismos de ação e de resistência porém devido ao aparecimento de

resistência cruzada entre esses antibióticos, o consumo de avoparcina foi proibido na União Européia em 1997 com base no “princípio da precaução” (POETA et al., 2005).

Nos últimos anos, diversos trabalhos, na Europa, mostraram o aparecimento de cepas de *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina (VRE) em amostras de diferentes origens: águas residuais, alimentos e fezes de animais saudáveis (POETA et al., 2005).

De fato, o uso da avoparcina como promotora de crescimento pode ter favorecido o aparecimento de cepas VRE em animais e sua posterior disseminação ao homem, através da cadeia alimentar ou de forma direta (POETA et al., 2005).

Apesar de existir grande especificidade de hospedeiros, as bactérias e os genes de resistência podem passar dos animais para o homem e vice-versa. Desse modo, genes distintos de resistência podem ser trocados entre microrganismos da microbiota intestinal animal, ser adquiridos por microrganismos da microbiota intestinal humana e, posteriormente, transferidos a possíveis patógenos, que podem ser disseminados a outros indivíduos (POETA et al., 2005).

Dessa forma, a transferência de resistência à antibióticos entre *Enterococcus* sp. componentes da microbiota intestinal humana ou entre *Enterococcus* sp. da cadeia alimentar, assim como a transferência destes traços para espécies patogênicas (ex. emergência de *Staphylococcus aureus* sensíveis à vancomicina) indicam a necessidade de um forte controle do uso de glicopeptídeos na cadeia alimentar como suplementos alimentares. Além disso, a barreira que separa inofensivos *Enterococcus* sp contaminantes alimentares de *Enterococcus* sp com potencial patogênico parece ser muito frágil (GIRAFFA, 2002).

2.1.6 Uso comercial

Devido às características tecnológicas descritas para o gênero *Enterococcus*, como atividade acidificante, proteólise, lipólise, utilização de citrato e produção de diacetil, além da capacidade de produção de bacteriocinas frente à

patógenos alimentares, tais bactérias têm sido propostas como culturas adequadas para o uso como fermento láctico ou como culturas adjuntas aplicáveis em diferentes tipos de queijos como Feta, Mozzarella e Cebreiro (MORANDI et al., 2006).

Para que uma cepa específica de *Enterococcus* seja proposta para uso como fermento, cultura adjunta ou mesmo como cultura probiótica, é recomendado uma cuidadosa análise quanto à presença de todos os fatores de virulência descritos, afim de se estabelecer com segurança o potencial risco de seu uso, sendo a condição ideal, a total isenção de qualquer fator de virulência (FRANZ et al., 2003).

Dessa forma, o uso de bactérias do gênero *Enterococcus* em alimentos é discutível, porém cabe ressaltar que algumas cepas de espécies deste gênero estão no mercado e apresentam um histórico de uso seguro, com aplicações comerciais em larga escala (FRANZ et al., 2003).

Um exemplo disso são as cepas de *E. faecium* K77D aprovadas pelo “Advisory Committee on Novel Foods and Processes” para uso como fermento em produtos lácteos. Estas cepas, em conjunto com cepas de *S. thermophilus*, são descritas também como probióticas, capazes de baixar o colesterol, sendo comercializadas em iogurtes (Gayo[®], Arla Foods) (FRANZ et al., 2003; GIRAFFA, 2003; ACNFP, 1996).

Outras cepas comercialmente utilizada são as de *E. faecium* SF68, que são descritas como uma alternativa ao tratamento antibiótico animal em casos de diarreia (FRANZ et al., 2003). Alguns produtos relacionados à estas cepas são Fortiflora[®] (Purina) e Oralin[®] (Chevita).

2.2 O queijo de coalho

Entende-se por queijo de coalho, o queijo obtido por coagulação do leite através de coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até dez dias de vida útil. É um queijo de média a alta umidade (35,4 a 46%),

de massa semi-cozida ou cozida, com teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0% (BRASIL, 2001; CAVALCANTE, 2005; PEREZ, 2005).

O leite a ser utilizado deve ser higienizado por meios mecânicos adequados (pasteurização ou tratamento térmico equivalente), combinados ou não a outros processos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto, a fim de assegurar fosfatase alcalina residual negativa, (BRASIL, 2001).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (BRASIL, 2001), as características distintivas do processamento são a coagulação em torno de 40 min, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento ou não da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semi-cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45°C e 55°C), adição de sal e prensagem seguida de secagem, embalagem e estocagem sob temperatura média de 10-12°C, normalmente em até 10 dias de vida útil.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura de cozimento no processamento de queijo de coalho na seleção de bactérias do gênero *Enterococcus* e a influência destes microrganismos no perfil tecnológico e na inocuidade do produto queijo de coalho.

Como objetivos específicos definiram-se :

- ✓ Avaliação do comportamento de bactérias do gênero *Enterococcus* ao longo do processamento de queijo de coalho, em função de variações de tempo e temperatura de tratamento térmico, e do período de armazenamento refrigerado;
- ✓ Isolamento e identificação, através de características fenotípicas, das espécies de bactérias do gênero *Enterococcus* ao longo do processamento e durante período de armazenamento refrigerado do queijo de coalho;
- ✓ Caracterização tecnológica de *Enterococcus* isolados: perfil em leite tornasolado, proteólise, lipólise, utilização de citrato, produção de diacetil e atividade acidificante;
- ✓ Avaliação da patogenicidade dos isolados de *Enterococcus* através da verificação de expressão de fatores de virulência (hemólise e gelatinase), de produção de aminas biogênicas e de resistência intrínseca à vancomicina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Processamento do queijo de coalho

Os experimentos foram realizados na planta piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (DTA - FEA – UNICAMP).

Em cada dia de processamento foram utilizados 400 litros de leite cru provenientes de uma cooperativa local, e separados em três diferentes lotes que corresponderam a diferentes condições de cozimento da massa, ou seja: Lote 1 (L1) 40°C, Lote 2 (L2) 45°C e Lote 3 (L3) 50°C. Foram elaboradas peças de queijo de aproximadamente 500g cada.

4.1.1 Etapas

O leite foi inicialmente filtrado e pasteurizado a 72°C por 15 segundos, de acordo com as normas brasileiras (BRASIL, 2002), em trocador de calor a placas (Sumápack, Suma Indústria e Comércio Ltda).

O leite pasteurizado foi armazenado em latões de 50L, em câmara fria a 5°C até o dia seguinte quando foram produzidos os queijos.

Foi determinada a fosfatase residual (AOAC, 1995) e a peroxidase (LANARA, 1981) para assegurar a efetividade do tratamento térmico.

Para cada lote de queijo, o leite foi inicialmente aquecido a 35°C em tanque automático destinado a fabricação de queijos (Queijomatic, Biasinox Ind e Com. Ltda, Lambari, Brasil) e foram adicionados cloreto de cálcio (250ppm) e ácido láctico (0,25mL/L), a intervalos de 1 minuto, com mexedura lenta.

A coagulação para todos os lotes ocorreu pela adição de coalho bovino e após 40 minutos, observando-se o ponto de corte, procedeu-se a mexedura e aquecimento da massa com agitação moderada por 10 (L1), 20 (L2) e 30 (L3) minutos, tempos suficientes para elevar a temperatura (1°C/2min) às temperaturas de cozimento de 40 (L1), 45 (L2) e 50°C (L3). Tais temperaturas foram mantidas

por 10 minutos através de aquecimento indireto.

Após o cozimento seguiu-se a dessora e a salga na massa (2,7% do volume de leite) com agitação para incorporação do sal (1 min). A massa foi então enformada (formas de 1kg) e prensada na seqüência: 15kg / 30 minutos, inversão das formas, 30kg / 16horas. Os queijos foram armazenados sob refrigeração (10°C) por 24h, pesados, embalados em embalagens plásticas flexíveis de polietileno em unidade de 500g, identificados e mantidos em armazenamento refrigerado (4°C) por até 90 dias.

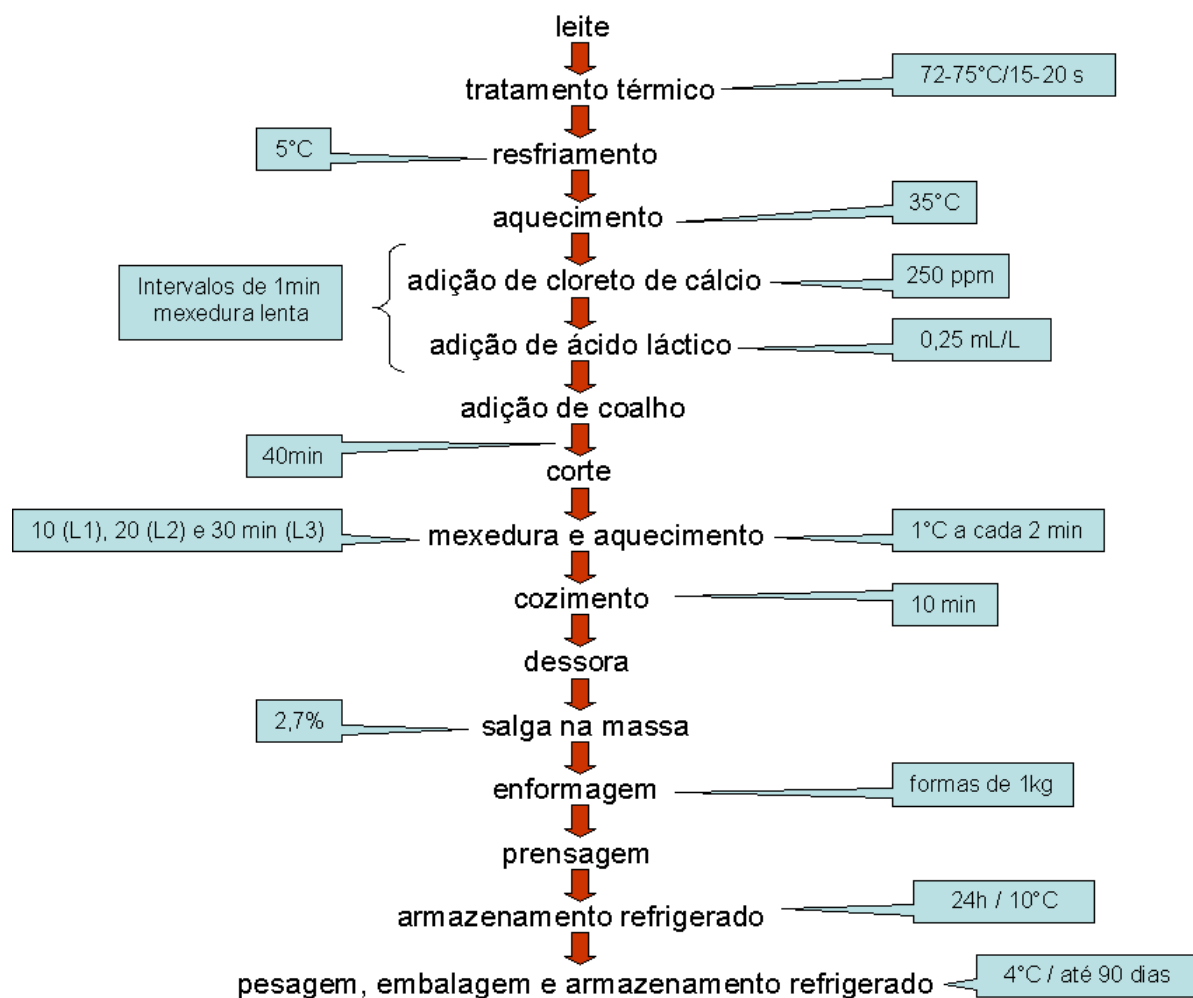


Figura 4. Fluxograma do processamento do queijo de coalho

4.1.2 Amostragem

Para o plano de amostragem, foi colhida uma amostra indicativa de cada etapa representativa do processo: leite cru, leite após tratamento térmico, massa após cozimento e após salga, soro e queijos com 5, 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado.

As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo e transportadas para o laboratório de Higiene - Departamento de Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - DTA / FEA / UNICAMP.

Para amostras de massa e queijo, unidades analíticas de 25g foram pesadas em balança semi-analítica (Sartorius, U3600, Goettingen, Germany), diluídas em 225mL de citrato de sódio a 2% (Merck, Darmstadt, Germany), homogeneizadas em homogeneizador tipo "Stomacher" Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, Inglaterra) e diluições decimais em série foram preparadas em solução de água peptonada a 0,1% (Difco, Sparks, EUA). Para amostras de leite e soro, foram preparadas apenas as diluições decimais em série, em solução de água peptonada a 0,1% (Difco, Sparks, EUA) (MIDURA e BRYANT, 2001).

4.2 Contagem de bactérias lácticas

Foram selecionadas três diluições adequadas de cada amostra e 1,0 mL de cada diluição foi inoculado, em duplicata, em placas de Petri, em profundidade com sobrecamada, para a realização das contagens.

O meio de cultura utilizado foi o ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Difco, Sparks, EUA) e a incubação ocorreu a 30°C por 48 a 72h. Foram contadas todas as colônias desenvolvidas nas placas com 25 a 250 colônias e os resultados expressos como logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (log UFC/g) (HALL et al., 2001).

4.3 Isolamento, contagem e identificação das bactérias do gênero *Enterococcus*

O plaqueamento das diluições ocorreu em duplicata, em profundidade, em meio diferencial ágar Kenner Fecal *Streptococcus* (Difco, Sparks, EUA) seguido de incubação a 45°C por 48h, a fim de se suprimir o crescimento de possível microbiota acompanhante como microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e outros *Streptococcus* lácticos (HARTMAN et al., 2001).

Foram contadas todas as colônias típicas desenvolvidas nas placas com 25 a 250 colônias levando-se em consideração as características morfológicas esperadas, a saber: colônias de 1 a 2mm de diâmetro, vermelhas redutoras de TTC a formazan, rodeadas por zona amarela (formação de ácido detectada por indicador bromocresol púrpura). Os resultados foram expressos como logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (log UFC/g) (PARKER e COLLIER, 1990; HARTMAN et al., 2001).

Cinco colônias típicas de cada placa representativa de cada etapa do processamento foram selecionadas aleatoriamente, transferidas para caldo Cérebro Coração (BHI - Difco, Sparks, EUA), incubadas a 35°C por 18 a 24h e posteriormente confirmadas através de teste de catalase, coloração de Gram, resistência a 40% de sais biliares e hidrólise de esculina - plaqueamento em ágar Bile Esculina (Acumedia, Baltimore, USA) (incubado a 35°C por 24h), capacidade de crescimento em 6,5% de NaCl, pH 9,6 e sob temperaturas de 10°C (COSENTINO et al., 2004; DOMIG et al., 2003a; HARTMAN et al., 2001; ARIZCUN et al., 1997; CENTENO et al., 1996).

A identificação em espécie das colônias selecionadas e confirmadas ocorreu através de chave de identificação bioquímica, adaptada de Manero e Blanch (1999), Klein (2003) e Carvalho e colaboradores (2004).

Os teste de fermentação de açúcares (L-arabinose, ribose, sorbitol, D-rafinose, manitol e sacarose - 1% v/v - Difco, Sparks, EUA) foram realizados em caldo Vermelho de Fenol (Difco, Sparks, EUA) pH 7,4 a 7,5, incubado a 35°C por 24 a 48h. O resultado foi considerado positivo para os ensaios em que o meio passou de vermelho para amarelo (MANERO e BLANCH, 1999; MACFADDIN,

2000).

A descarboxilação enzimática do aminoácido arginina (Sigma, Steinheim, German) foi avaliada em meio basal segundo Moeller (1955) (Himedia, Mumbai, Índia), incubado a 35°C por até 96h. O resultado foi considerado positivo para os ensaios em que o meio passou de amarelo para púrpura (MACFADDIN, 2000).

A produção de pigmento amarelo foi detectada por meio de plaqueamento por esgotamento em ágar Cérebro Coração (BHI - Difco, Sparks, EUA). O resultado foi considerado positivo para linhagens com coloração amarela bem evidente (MANERO e BLANCH, 1999).

A capacidade de crescimento sob temperaturas de 4 e 50°C foi avaliada em caldo Cérebro Coração (BHI - Difco, Sparks, EUA), por período de 24 a 48h.

4.4 Caracterização tecnológica dos isolados

Os isolados foram inicialmente inoculados em caldo cérebro coração (BHI - Difco, Sparks, EUA) e incubados a 35°C por 24h. As culturas foram testadas para as seguintes características tecnológicas:

4.4.1 Produção de diacetil

Os ensaios foram realizados conforme o método de Barrit (1936): à 1mL de álcool etílico 96% foi adicionado 0,2mL de NaOH 40%, 0,6mL de α -naftol 5% em solução alcoólica e 2,5mL da cultura teste. A presença de diacetil foi confirmada pela produção de coloração avermelhada na parte superior da solução, no intervalo de 10 a 60 minutos à temperatura de 35°C (KUNZ, 1986; HARRIGAN, 1998).

4.4.2 Utilização de citrato como fonte de carbono

A detecção da utilização de citrato ocorreu através de plaqueamento dos isolados em ágar suco de tomate (AST 1/2% - Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com lactato de cálcio e citrato de cálcio. As placas foram incubadas a 35°C e o resultado positivo foi detectado pela formação de zonas claras ao redor

das colônias. (SKEAN e OVERCAST, 1962; COSENTINO et al., 2004).

4.4.3 Perfil em leite tornasolado (Litmus Milk)

As culturas foram repicadas em leite tornasolado (Litmus Milk - Difco, Sparks, EUA), incubadas a 35°C (temperatura ótima de crescimento do microrganismo - HARTMAN et al., 2001) por período de 24 a 72h, e avaliadas quanto às seguintes reações envolvendo alguns componentes do leite como lactose e caseína: acidificação do meio pela fermentação da lactose, formação de coágulo, redução do tornasol pela utilização como acceptor de elétrons e peptonização com clarificação do meio (HARRIGAN, 1998).

4.4.4 Proteólise

A capacidade de hidrólise da caseína pelos isolados foi testada em ágar padrão para contagem acrescido de leite desnatado reconstituído (PCA 1% Skim Milk - Difco, Sparks, EUA) incubado a 35°C por 2 a 14 dias. O resultado positivo foi detectado pela formação de zonas translúcidas (halos) ao redor das colônias, medidas em milímetros, e confirmado com ácido clorídrico 1% (HARRIGAN, 1998; MARCY e PRUETT, 2001).

4.4.5 Lipólise

Para detecção da atividade lipolítica, os isolados foram plaqueados em ágar azul spirit (Difco, Sparks, EUA) suplementado com reagente lipase (tributyryn e polisorbato 80 - Difco, Sparks, EUA) e incubadas a 35°C por período de até 7 dias. O resultado positivo foi detectado pela formação de zonas translúcidas (halos) ao redor das colônias (ELSNER et al., 2000; HAAS, 2001; MORANDI et al., 2006).

4.5 Avaliação da patogenicidade

4.5.1 Pesquisa da expressão de fatores de virulência

Os isolados foram avaliados quanto à seguridade através da verificação da expressão dos fatores de virulência para as seguintes características:

4.5.1.1 Hemólise

Para verificação de atividade hemolítica, os isolados foram inoculados em ágar sangue (BioCen, Campinas, Brasil) incubado a 35°C por 24 a 48h. Reações de β -hemólise (hemólise total) foram detectadas pela formação de halos claros e transparentes e as reações de α -hemólise (hemólise parcial) pela formação de zonas verdes acastanhadas. A ausência de reação foi relatada como γ -hemólise (COSENTINO et al., 2004).

Como controle positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 27154 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, respectivamente (NASCIMENTO, 2007).

4.5.1.2 Gelatinase

Para a verificação da produção de gelatinase, os isolados selecionados tecnologicamente foram plaqueados em ágar Todd-Hewitt suplementado com gelatina (Difco, Sparks, EUA) e inoculados em tubos com ágar nutriente gelatina, todos incubados a 35°C por 24 a 48h e submetidos a resfriamento (4°C) por 6h.

O resultado positivo foi observado pela formação de zonas de turbidez ao redor da colônia, indicativas de hidrólise de gelatina (COSENTINO et al., 2004), para as placas; e pela liquefação do meio, para os tubos.

Como controle positivo e negativo foram utilizadas cepas de *S. aureus* ATCC 27154 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, respectivamente (NASCIMENTO, 2007).

4.5.2 Produção de aminas biogênicas

A descarboxilação enzimática dos aminoácidos arginina, ornitina, lisina, histidina e tirosina (Sigma, Steinheim, German) foi avaliada em meio basal

segundo Moeller (1955) (Himedia, Mumbai, Índia), incubado a 35°C por até 96h. O resultado foi considerado positivo para os ensaios em que o meio passou de roxo para amarelo e de amarelo para púrpura (MACFADDIN, 2000).

4.5.3 Resistência intrínseca à vancomicina

A avaliação ocorreu pelo método de diluição em ágar (agar Mueller Hinton - Difco, Sparks, EUA) incorporado com 4 µg/mL de vancomicina (Inlab Alamar, Diadema, Brasil) (NCCLS, 2003; NCCLS, 2005). Os isolados inoculados foram incubados a 35°C por 24h e o resultado positivo foi detectado pela formação de unidades formadoras de colônias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do comportamento da microbiota láctica

5.1.1 Ação do tratamento térmico

Conforme é apresentado na **Tabela 3** as contagens de bactérias lácticas para leite cru (LC) variaram entre 10^4 e 10^8 UFC/mL, já nas amostras de leite imediatamente após tratamento térmico (LP) foram próximas e em torno de 10^1 UFC/mL e nas amostras de leite após tratamento térmico e com 24h de armazenamento refrigerado (LP24h), variaram entre 10^1 e 10^5 UFC/mL.

Os valores de contagens foram próximos aos descritos por Carvalho (2007) que obteve valores em torno de 10^6 UFC/mL para leite cru.

As mesmas amostras foram também analisadas quanto à contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* e os resultados obtidos variaram, para o leite cru, entre 10^2 e 10^6 UFC/mL, e para leite imediatamente após tratamento térmico, os resultados foram próximas e inferiores a 10^1 UFC/mL.

Nas amostras de leite após tratamento térmico e com 24h de armazenamento refrigerado, as contagens para bactérias do gênero *Enterococcus* variaram entre 10^1 e 10^4 UFC/mL.

De acordo com Giraffa (2003) e Gelsomino e colaboradores (2001), as contagens para bactérias do gênero *Enterococcus* em leite cru variam em torno de 10^2 UFC/mL.

Como pode-se observar, são esperadas contagens elevadas para bactérias do gênero *Enterococcus* em amostras de leite cru, por ser este descrito predominante na microbiota do leite e também é esperada a permanência de bactérias deste gênero após pasteurização e armazenamento refrigerado devido às suas características psicotróficas e de termorresistência.

A avaliação do comportamento da microbiota láctica (BAL) em amostras de leite cru e pasteurizado revelou que a etapa de pasteurização foi capaz de reduzir as contagens em até 6 ciclos logarítmicos, mas não levou à eliminação de tais bactérias.

Já o armazenamento sob refrigeração a 5°C, pelo período de 24h após a pasteurização e precedente à produção dos queijos, proporcionou o restabelecimento da microbiota, elevando as contagens em até 4 ciclos log. Este fato justifica-se com base nas características psicotróficas descritas para o gênero.

Tabela 3. Contagem (UFC/mL) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp em amostras de leite cru (LC), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5°C (LP24h), valores dos 3 processamentos (P).

Amostra	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)
P1			
LC	9,3x10 ⁷	2,5x10 ⁶	2,7%
LP	1,1x10 ¹	8,0	72,7%
LP24h	1,6x10 ⁵	2,6x10 ⁴	16,2%
P2			
LC	8,0x10 ⁶	1,0x10 ⁴	0,1%
LP	1,0x10 ¹	0,6x10 ¹	60,0%
LP24h	5,0x10 ³	1,0x10 ³	20,0%
P3			
LC	5,0x10 ⁴	3,0x10 ²	0,6%
LP	1,2x10 ¹	9,0	75,0%
LP24h	9,0x10 ¹	5,0x10 ¹	55,6%

Os perfis de contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* apresentaram-se semelhantes aos perfis para BAL: a etapa de pasteurização foi capaz de reduzir as contagens em até 6 ciclos logarítmicos, sem eliminação total destas bactérias e o período de 24h de armazenamento refrigerado proporcionou no leite pasteurizado, o restabelecimento das contagens, elevando-as em até 4 ciclos log.

Pelos resultados verificou-se também que a pasteurização foi capaz de diminuir a diferença entre as contagens de BAL e *Enterococcus* sp, que era de até dois ciclos logarítmicos no leite cru e que no leite pasteurizado reduziu para

menos de um ciclo logarítmico, restabelecendo-se em até um ciclo logarítmico durante o período de armazenamento do leite pasteurizado sob refrigeração.

Nas amostras de leite cru (**Tabela 3**), a população de bactérias do gênero *Enterococcus* representava de 0,1 a 2,7% do total de bactérias lácticas, porém nas amostras de leite pasteurizado esta população passa a representar de 60,0 a 75,0% e nas amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado de 16,2 a 55,6%.

Na **Figura 5** verifica-se que o restabelecimento dos níveis de bactérias lácticas totais assim como das bactérias do gênero *Enterococcus* segue um padrão semelhante à carga microbiana inicial, ou seja, quanto maior o número das contagens iniciais para os microrganismos, maior será o nível restabelecido após o tratamento térmico, mesmo que haja redução da carga microbiana à níveis semelhantes.

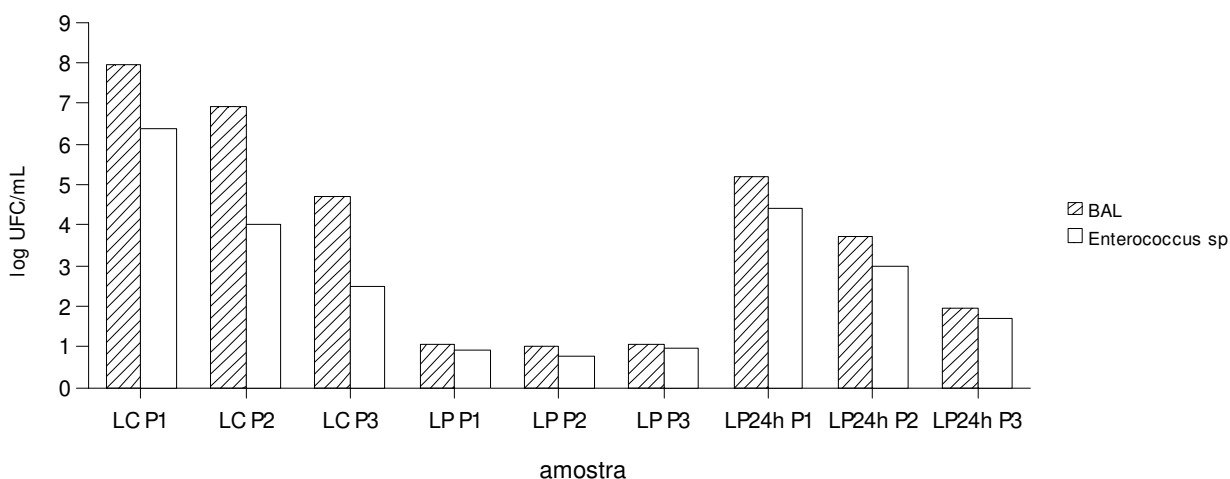


Figura 5. Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de leite cru (LC), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5°C (LP24h).

Com base nestes resultados pode-se concluir que a etapa de tratamento térmico e de armazenamento refrigerado foram, respectivamente seletivas e favoráveis à população de bactérias do gênero *Enterococcus*, além de

proporcionar a propagação destes microrganismos nas etapas seguintes do processamento, conforme preconizado por Carvalho (2007). Tais comportamentos podem ser justificados com base nas características psicotróficas e de termorresistência descritas para o gênero (PARKER e COLLIER, 1990)

5.1.2 Ao longo do processamento

5.1.2.1 Efeito do cozimento da massa

Amostras de massa após cozimento (MC) a 40, 45 e 50°C foram analisadas quanto à contagem de bactérias lácticas e os resultados variaram entre 10^3 e 10^5 UFC/g (**Tabela 4**), com diferenças menores que 1 ciclo logarítmico entre as contagens obtidas em amostras de massas após diferentes temperaturas de cozimento, dentro de um mesmo processamento. Estes resultados diferem dos obtidos por Carvalho (2007) que obteve contagens para massa variando em torno de 10^5 a 10^{10} UFC/g.

Nestas amostras as contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* variaram entre 10^2 e 10^5 UFC/g, também com diferenças menores que 1 ciclo logarítmico entre as contagens obtidas em massas após diferentes temperaturas de cozimento, dentro de um mesmo processamento.

Após o cozimento da massa verificou-se um aumento de até 2 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias lácticas totais e um aumento de até 1 ciclo logarítmico nas contagens para bactérias do gênero *Enterococcus*, em relação às contagens obtidas a partir das amostras de leite tratado termicamente utilizado no processamento.

Tal favorecimento foi inversamente proporcional à carga inicial de bactérias, ou seja, ao número de bactérias presentes no leite tratado termicamente. Este fato pode ser observado nas **Figuras 6a, 6b e 6c**: quanto menor as contagens de bactérias, menor a fase lag de ajuste a um novo meio e maior o favorecimento devido à maior disponibilidade de nutrientes e de menor produção de metabólitos inibidores de crescimento ou mesmo baixa competição.

Giraffa (2003) e Gelsomino e colaboradores (2001) relatam contagens para

bactérias do gênero *Enterococcus* em torno de 10^6 UFC/g. Esta diferença entre os resultados obtidos e os relatados na literatura pode justificar-se pelas variações existentes nas contagens em diferentes amostras de leite cru, com diferentes origens e tratamento térmico ou não do leite.

De um modo geral, esta etapa possibilitou um aumento da porcentagem de *Enterococcus* sp no total de bactérias lácticas (BAL), porém os resultados não mostraram diferença entre os tratamentos térmicos empregados para o cozimento da massa.

Tabela 4. Contagem (UFC/mL ou g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado (LP24h) e em amostras de massa após cozimento (MC) em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).

Amostra	BAL (UFC/mL ou g)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)
P1			
LP24h	$1,6 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	16,2%
MC 40°C	$8,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	24,4%
MC 45°C	$5,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	23,7%
MC 50°C	$6,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	22,1%
P2			
LP24h	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	20,0%
MC 40°C	$3,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	46,7%
MC 45°C	$9,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	33,3%
MC 50°C	$5,2 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	94,2%
P3			
LP24h	$9,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	55,6%
MC 40°C	$7,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	5,0%
MC 45°C	$3,1 \times 10^3$	$6,9 \times 10^2$	22,3%
MC 50°C	$2,7 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$	21,1%

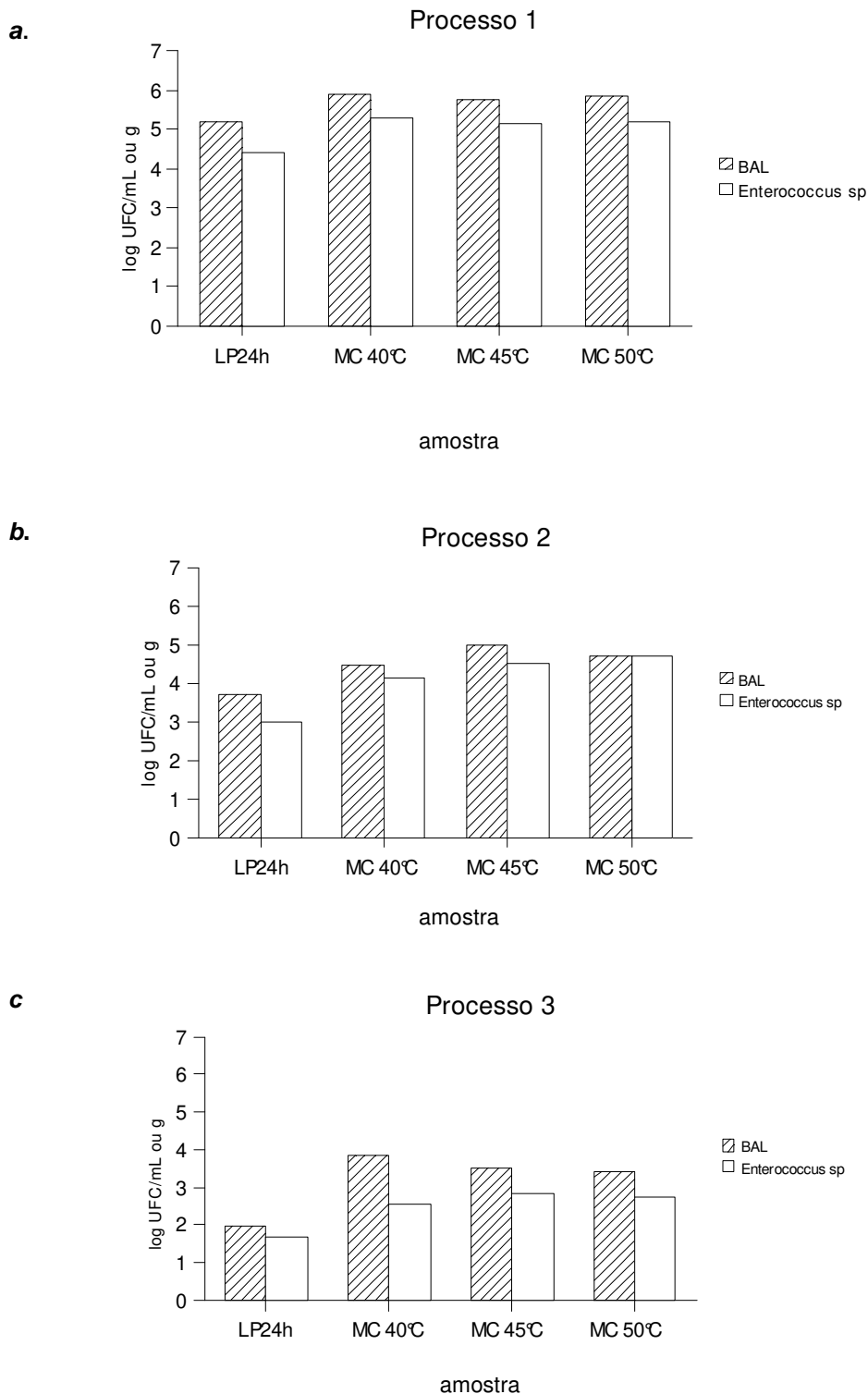


Figura 6. Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (**a**, **b**, e **c**), em amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5°C (LP24h), massa após cozimento (MC) a (a) 40, (b) 45 e (c) 50°C.

5.1.2.2 Presença no soro

Amostras de soro obtidas após o cozimento da massa a 40, 45 e 50°C foram analisadas quanto à contagem de bactérias lácticas e de bactérias do gênero *Enterococcus* e os valores apresentados na **Tabela 5** variaram de 10^3 a 10^5 , e de 10^2 a 10^5 UFC/mL, respectivamente.

De um modo geral, não foram observadas variações maiores que 1 ciclo logarítmico entre as contagens obtidas em amostras após diferentes temperaturas de cozimento, dentro de um mesmo processamento.

As contagens obtidas nas amostras de soro foram semelhantes às obtidas nas amostras de massa após cozimento (**Tabela 4**). Pode-se concluir que houve dispersão de microrganismos da massa para o soro e deste para o ambiente ou para subprodutos, visto que o soro na produção de queijos é desprezado no ambiente ou reaproveitado na produção de bebidas lácticas e/ou ricota.

Tabela 5. Contagem (UFC/mL) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de soro (S) após cozimento da massa em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).

Amostra	Processamento					
	1		2		3	
	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)
S 40°C	$9,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$6,7 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$
S 45°C	$6,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3$	$7,1 \times 10^2$
S 50°C	$7,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$

5.1.2.3 Efeito da salga

Amostras de massa após a salga apresentaram contagens de bactérias lácticas (**Tabela 6**) que variaram de 10^3 a 10^6 UFC/g, porém os resultados não mostram um crescimento maior para uma temperatura específica de cozimento.

De um modo geral, a etapa de salga não inibiu o crescimento da microbiota

lática, permitindo aumento nas contagens obtidas (até 1 ciclo logarítmico) em amostras de massa após salga, em relação às contagens obtidas em amostras de massa após cozimento.

Nestas amostras as contagens de bactérias do gênero *Enterococcus* variaram entre 10^2 e 10^5 UFC/g, e, mais uma vez não se pode destacar nenhuma temperatura específica de cozimento.

Esta etapa, assim como a etapa anterior de cozimento, possibilitou de forma geral, um novo aumento da porcentagem de *Enterococcus* sp no total de bactérias lácticas, também sem destaque para uma temperatura específica de cozimento.

Tabela 6. Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos, em amostras de massa após salga (MS), após cozimento da massa em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).

P1			
Amostra	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)
MS 40°C	2,3x10 ⁶	3,8x10 ⁵	16,5%
MS 45°C	4,0x10 ⁵	2,2x10 ⁵	55,0%
MS 50°C	9,5x10 ⁵	3,1x10 ⁵	32,6%
P2			
MS 40°C	8,4x10 ³	7,1x10 ³	84,5%
MS 45°C	5,7x10 ⁴	2,8x10 ⁴	49,1%
MS 50°C	4,6x10 ⁴	2,2x10 ⁴	47,8%
P3			
MS 40°C	8,3x10 ³	6,0x10 ²	7,2%
MS 45°C	4,9x10 ³	8,0x10 ²	16,3%
MS 50°C	3,5x10 ³	7,6x10 ²	21,7

5.1.2.4 No produto queijo de coalho

Amostras de queijo com 5 dias de produção foram analisadas quanto à contagem de bactérias lácticas (**Tabela 7**) e as contagens variaram de 10^5 a 10^7 UFC/g, de um modo geral, com diferenças menores que 1 ciclo logarítmico entre as contagens obtidas em amostras de queijos com 5 dias de produção à partir de diferentes temperaturas de cozimento da massa, dentro de um mesmo

processamento.

Estes resultados diferem dos obtidos por Carvalho (2007) que relata valores para queijo coalho, com mesmo tempo de produção, variando em torno de 10^6 e 10^9 UFC/g.

Para as bactérias do gênero *Enterococcus* as contagens (**Tabela 7**) variaram de 10^5 a 10^7 UFC/g, de modo geral, com diferenças menores que 1 ciclo logarítmico entre as contagens obtidas em amostras de queijos com 5 dias de produção à partir de diferentes temperaturas de cozimento da massa, dentro de um mesmo processamento, mais uma vez sem destaque para uma temperatura específica de cozimento.

Estes resultados se assemelham àqueles descritos na literatura por Giraffa (2003) e Gelsomino e colaboradores (2001) que relatam valores entre 10^5 e 10^7 para *Enterococcus* sp em queijos com mesmo tempo de produção.

Pelos resultados observou-se que o período de 5 dias após produção do queijo possibilitou um aumento de até 4 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias lácticas totais e um aumento de até 5 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias do gênero *Enterococcus*, em relação às contagens obtidas a partir de amostras de massa após a salga (**Tabela 6**).

Tal favorecimento foi inversamente proporcional à carga de bactérias inicial, ou seja, ao número de bactérias presentes nas amostras de massa após a salga. Este fato que pode ser verificado através da **Figura 7.a., b. e c.:** quanto menor as contagens de bactérias, menor a fase lag de ajuste a um novo meio e maior o favorecimento devido à maior disponibilidade de nutrientes e de menor produção de metabólitos inibidores de crescimento ou mesmo baixa competição.

Pode-se concluir que, nas condições estudadas, o valor de 10^7 UFC/g pode marcar o final da fase logarítmica de crescimento e pode ser considerado um valor limite para contagens nesta etapa (queijo com 5 dias de produção), possivelmente determinado em função do tempo para crescimento da microbiota, da disponibilidade de nutrientes, produção de metabólitos inibidores ou competição.

Tabela 7. Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de queijo com 5 dias de produção (QD5), após cozimento da massa em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C).

Amostra	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)
P1			
QD5 40°C	9,0x10 ⁷	1,0x10 ⁷	11,1%
QD5 45°C	1,3x10 ⁷	9,0x10 ⁶	69,2%
QD5 50°C	2,0x10 ⁷	6,0x10 ⁶	30,0%
P2			
QD5 40°C	1,6x10 ⁶	1,1x10 ⁶	68,7%
QD5 45°C	6,0x10 ⁷	5,4x10 ⁷	90,0%
QD5 50°C	8,0x10 ⁵	4,9x10 ⁵	61,2%
P3			
QD5 40°C	5,6x10 ⁷	3,8x10 ⁷	67,9%
QD5 45°C	8,2x10 ⁷	5,2x10 ⁷	63,4%
QD5 50°C	6,9x10 ⁷	2,4x10 ⁷	34,8%

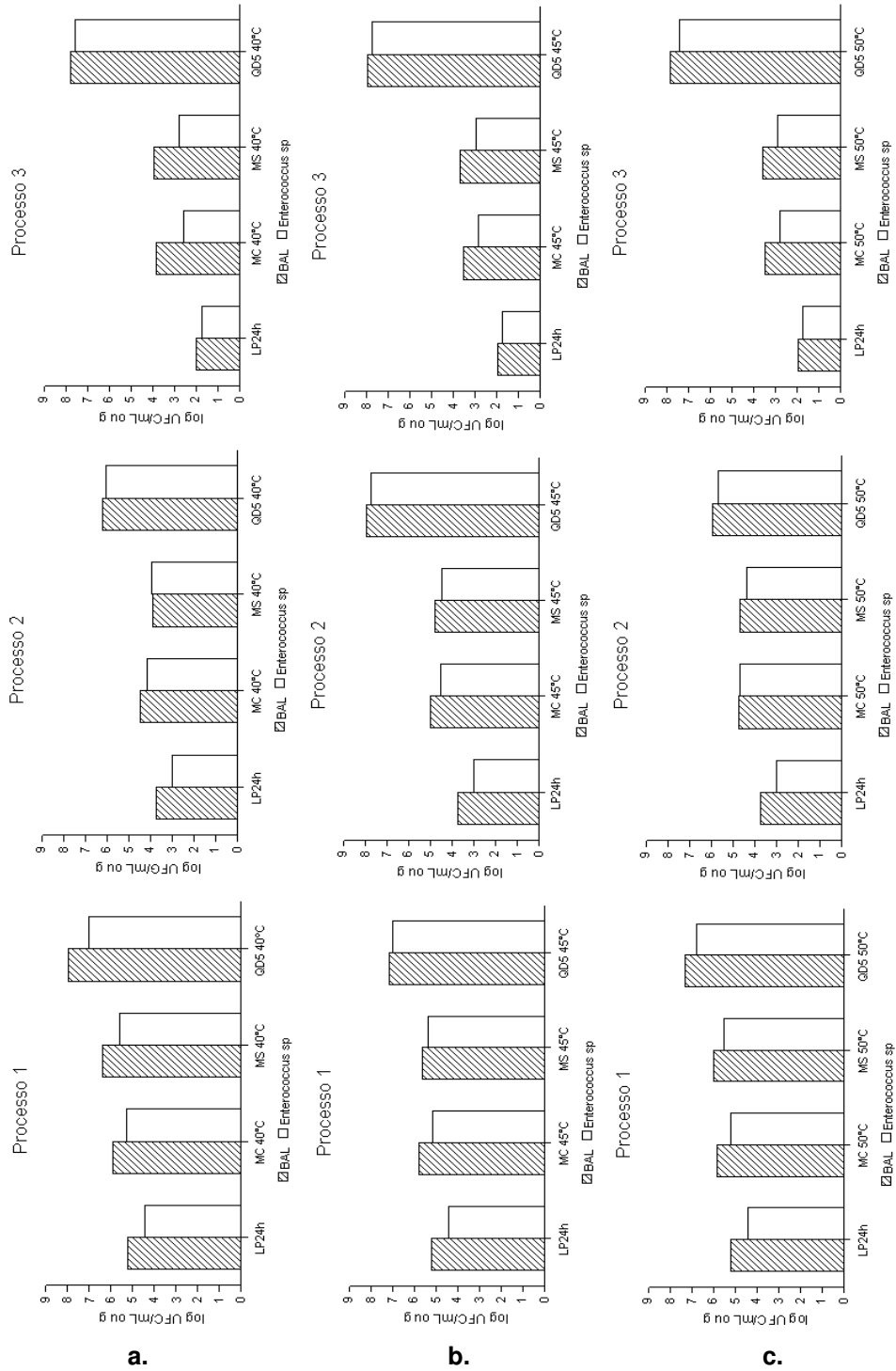


Figura 7. (a, b, c.) Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp, nos 3 processamentos (P), em amostras de leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado à 5 °C (LP24h), massa após cozimento (MC) a 40, 45 e 50°C, massa após salga (MS) e queijo com 5 dias de produção.

Pode-se verificar com base nesses resultados que houve novo aumento da porcentagem de *Enterococcus* sp no total de bactérias lácticas, porém mais uma vez sem destaque uma temperatura específica de cozimento.

Pela análise conjunta dos resultados obtidos (**Tabela 8**) a partir das amostras de massa após o cozimento, massa após salga e queijo com 5 dias de armazenamento refrigerado, verifica-se, de um modo geral, que tais etapas, nas condições estudadas, contribuíram para a seleção e desenvolvimento de *Enterococcus* sp. no queijo de coalho.

Embora a literatura (HARTMAN et al., 2001) considere a temperatura de 45°C a mais favorável e seletiva para bactérias do gênero *Enterococcus*, frente à outras bactérias comuns à microbiota láctica, em nosso trabalho tal favorecimento não foi muito evidentes.

Tabela 8. Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de massa após cozimento (MC) em diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C), massa após salga (MS) e queijo com 5 dias de produção (QD5).

Amostra	BAL (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/mL)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)
P1			
MC 40°C	8,2x10 ⁵	2,0x10 ⁵	24,4%
MS 40°C	2,3x10 ⁶	3,8x10 ⁵	16,5%
QD5 40°C	9,0x10 ⁷	1,0x10 ⁷	11,1%
MC 45°C	5,9x10 ⁵	1,4x10 ⁵	23,7%
MS 45°C	4,0x10 ⁵	2,2x10 ⁵	55,0%
QD5 45°C	1,3x10 ⁷	9,0x10 ⁶	69,2%
MC 50°C	6,8x10 ⁵	1,5x10 ⁵	22,1%
MS 50°C	9,5x10 ⁵	3,1x10 ⁵	32,6%
QD5 50°C	2,0x10 ⁷	6,0x10 ⁶	30,0%
P2			
MC 40°C	3,0x10 ⁴	1,4x10 ⁴	46,7%
MS 40°C	7,1x10 ³	8,4x10 ³	118,3%
QD5 40°C	1,6x10 ⁶	1,1x10 ⁶	68,7%
MC 45°C	9,6x10 ⁴	3,2x10 ⁴	33,3%
MS 45°C	5,7x10 ⁴	2,8x10 ⁴	49,1%
QD5 45°C	6,0x10 ⁷	5,4x10 ⁷	90,0%
MC 50°C	5,2x10 ⁴	4,9x10 ⁴	94,2%
MS 50°C	4,6x10 ⁴	2,2x10 ⁴	47,8%
QD5 50°C	8,0x10 ⁵	4,9x10 ⁵	61,2%
P3			
MC 40°C	7,0x10 ³	3,5x10 ²	5,0%
MS 40°C	8,3x10 ³	6,0x10 ²	7,2%
QD5 40°C	5,6x10 ⁷	3,8x10 ⁷	67,9%
MC 45°C	3,1x10 ³	6,9x10 ²	22,3%
MS 45°C	4,9x10 ³	8,0x10 ²	16,3%
QD5 45°C	8,2x10 ⁷	5,2x10 ⁷	63,4%
MC 50°C	2,7x10 ³	5,7x10 ²	21,1%
MS 50°C	3,5x10 ³	7,6x10 ²	21,7%
QD5 50°C	6,9x10 ⁷	2,4x10 ⁷	34,8%

5.1.3 Durante período de armazenamento refrigerado

Amostras de queijos com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado foram analisadas quanto à contagem de bactérias lácticas e os

resultados obtidos (**Tabela 9**) mostraram que tais contagens variaram entre 10^6 e 10^8 UFC/g para queijos com 20 dias e entre 10^7 e 10^9 UFC/g para queijos com 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado, com diferenças de até 2 ciclos logarítmicos entre as contagens obtidas em amostras de queijos com diferentes dias de armazenamento refrigerado, à partir de diferentes temperaturas de cozimento da massa, dentro de um mesmo processamento (**Figura 8**), porém sem mostrar um crescimento maior para uma temperatura específica.

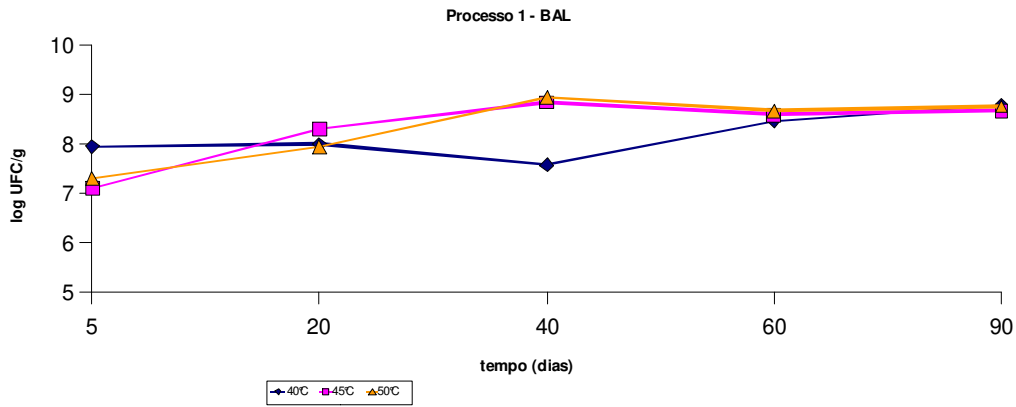
Esses resultados são mais próximos dos obtidos por Carvalho (2007) que relata valores para queijo coalho variando em torno de 10^6 e 10^9 UFC/g.

O período de armazenamento refrigerado possibilitou um aumento de até 2 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias lácticas totais, em relação às contagens obtidas a partir de amostras de queijo com 5 dias após produção. Tal favorecimento foi novamente inversamente proporcional à carga de bactérias lácticas inicial, ou seja, ao número de bactérias lácticas presentes nas amostras de queijo com 5 dias de produção. Por este fato, pode-se concluir que, nas condições estudadas, o valor de 10^9 UFC/g para contagens de bactérias lácticas em queijos com até 90 dias de armazenamento refrigerado pode ser o limite máximo para crescimento, possivelmente determinado em função do tempo para crescimento da microbiota, da disponibilidade de nutrientes, produção de metabólitos inibidores ou competição.

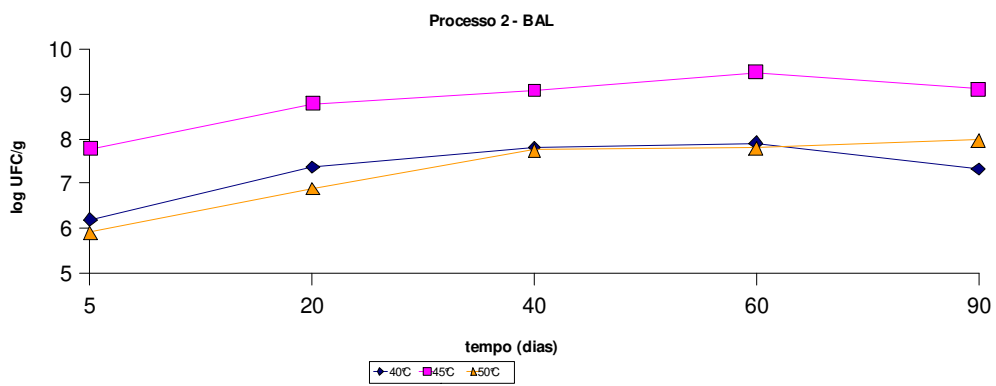
Tabela 9. Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de queijo com 20 (QD20), 40 (QD40), 60 (QD60) e 90 (QD90) dias de armazenamento refrigerado, provenientes de diferentes temperaturas de cozimento da massa (40, 45 e 50°C).

Amostra	BAL (UFC/g)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/g)	Processamento
QD20 40°C	1,0x10 ⁸	5,0x10 ⁷	P1
QD20 45°C	2,0x10 ⁸	1,2x10 ⁸	
QD20 50°C	9,0x10 ⁷	8,0x10 ⁷	
QD20 40°C	2,3x10 ⁷	7,3x10 ⁶	P2
QD20 45°C	6,2x10 ⁸	3,7x10 ⁸	
QD20 50°C	7,8x10 ⁶	5,3x10 ⁶	
QD20 40°C	7,1x10 ⁷	5,1x10 ⁷	P3
QD20 45°C	6,5x10 ⁷	4,2x10 ⁷	
QD20 50°C	6,1x10 ⁷	3,1x10 ⁷	
QD40 40°C	3,8x10 ⁷	2,2x10 ⁷	P1
QD40 45°C	7,1x10 ⁸	1,9x10 ⁸	
QD40 50°C	9,0x10 ⁸	2,0x10 ⁸	
QD40 40°C	6,5x10 ⁷	9,1x10 ⁶	P2
QD40 45°C	1,2x10 ⁹	2,9x10 ⁸	
QD40 50°C	5,7x10 ⁷	8,70x10 ⁶	
QD40 40°C	9,1x10 ⁷	2,1x10 ⁷	P3
QD40 45°C	8,5x10 ⁷	3,4x10 ⁷	
QD40 50°C	7,1x10 ⁷	6,3x10 ⁷	
QD60 40°C	3,0x10 ⁸	5,0x10 ⁷	P1
QD60 45°C	4,0x10 ⁸	4,6x10 ⁷	
QD60 50°C	4,8x10 ⁸	2,4x10 ⁸	
QD60 40°C	8,2x10 ⁷	8,40x10 ⁶	P2
QD60 45°C	3,1x10 ⁹	6,20x10 ⁸	
QD60 50°C	6,3x10 ⁷	3,20x10 ⁷	
QD60 40°C	5,2x10 ⁸	8,3x10 ⁷	P3
QD60 45°C	7,2x10 ⁸	9,4x10 ⁷	
QD60 50°C	1,9x10 ⁸	7,7x10 ⁷	
QD90 40°C	6,2x10 ⁸	7,3x10 ⁷	P1
QD90 45°C	4,8x10 ⁸	5,2x10 ⁷	
QD90 50°C	5,9x10 ⁸	2,1x10 ⁸	
QD90 40°C	2,1x10 ⁷	1,1x10 ⁷	P2
QD90 45°C	1,3x10 ⁹	9,5x10 ⁸	
QD90 50°C	9,3x10 ⁷	8,0x10 ⁷	
QD90 40°C	7,2x10 ⁸	3,0x10 ⁸	P3
QD90 45°C	8,1x10 ⁸	2,5x10 ⁸	
QD90 50°C	7,0x10 ⁸	4,0x10 ⁸	

a.



b.



c.

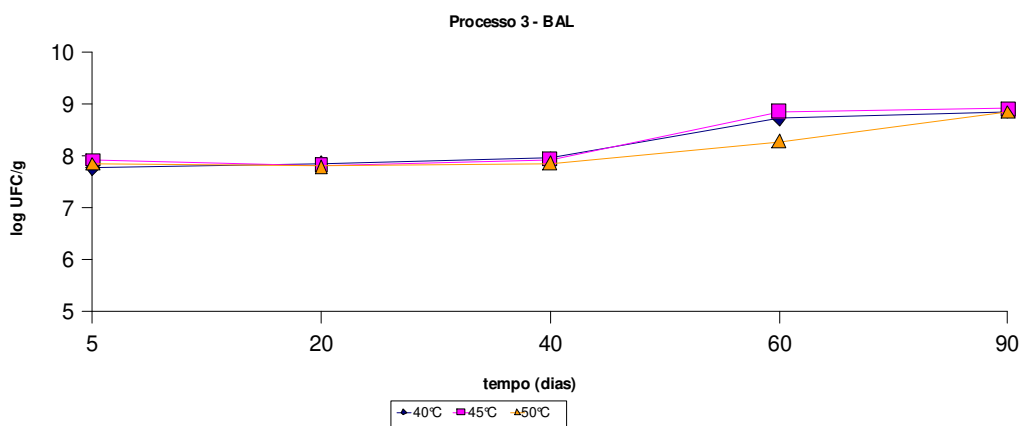


Figura 8. (a, b, c) Contagem de bactérias lácticas totais (BAL) nos 3 processamentos, em amostras queijo com 5 dias de produção e com 20, 40, 60 e 90 dias

de armazenamento refrigerado.

Durante o período de armazenamento refrigerado, pode-se observar que, de um modo geral, o aumento de até 2 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias láticas ocorreu de forma gradativa, principalmente durante os 60 primeiros dias. Após este período, pode-se observar uma estabilização da microbiota ou até discretas reduções nas contagens.

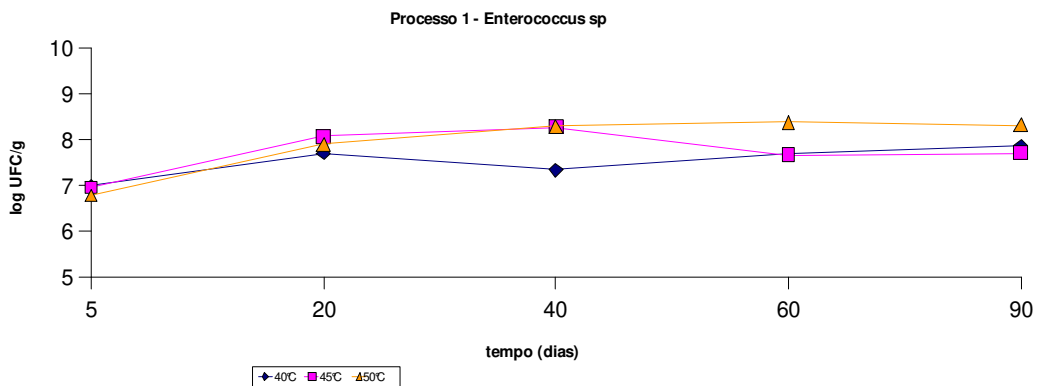
As mesmas amostras foram também analisadas quanto à contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* e os resultados obtidos variaram entre 10^6 e 10^8 UFC/g para queijos com 20, 40 e 60 dias e entre 10^7 e 10^8 UFC/g para queijos com 90 dias de armazenamento refrigerado, com diferenças também de até 2 ciclos log entre as contagens obtidas em amostras de queijos com diferentes dias de armazenamento refrigerado, à partir de diferentes temperaturas de cozimento da massa, dentro de um mesmo processamento (**Figura 9**), porém sem destaque para uma temperatura específica.

Estes resultados diferem dos descritos na literatura por Giraffa (2003) e Gelsomino e colaboradores (2001) que relatam valores entre 10^5 e 10^7 para *Enterococcus* sp em queijos. Esta diferença nos valores obtidos pode estar relacionada à fatores ambientais visto que as amostras de queijos foram obtidas em diferentes países e a partir de diferentes tipos de queijo provenientes de diferentes tipos de processamentos, fatores que podem influenciar na incidência destas bactérias do gênero *Enterococcus*.

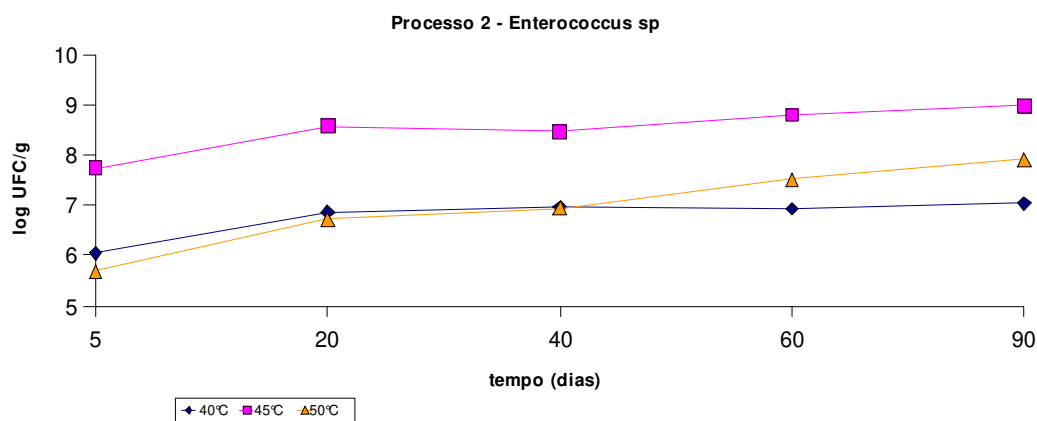
O período de armazenamento refrigerado possibilitou um aumento de até 2 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias do gênero *Enterococcus*, em relação às contagens obtidas a partir de amostras de queijo com 5 dias após produção. Tal favorecimento foi novamente inversamente proporcional à carga de bactérias láticas inicial, ou seja, ao número de bactérias do gênero *Enterococcus* presente nas amostras de queijo com 5 dias de produção, fato que pode levar a concluir que, nas condições estudadas, o valor de 10^8 UFC/g para estas contagens em queijos com até 90 dias de armazenamento refrigerado pode ser o limite máximo para crescimento, possivelmente determinado em função do tempo para crescimento destas bactérias, da disponibilidade de nutrientes, produção de

metabólitos inibidores ou competição.

a.



b.



c.

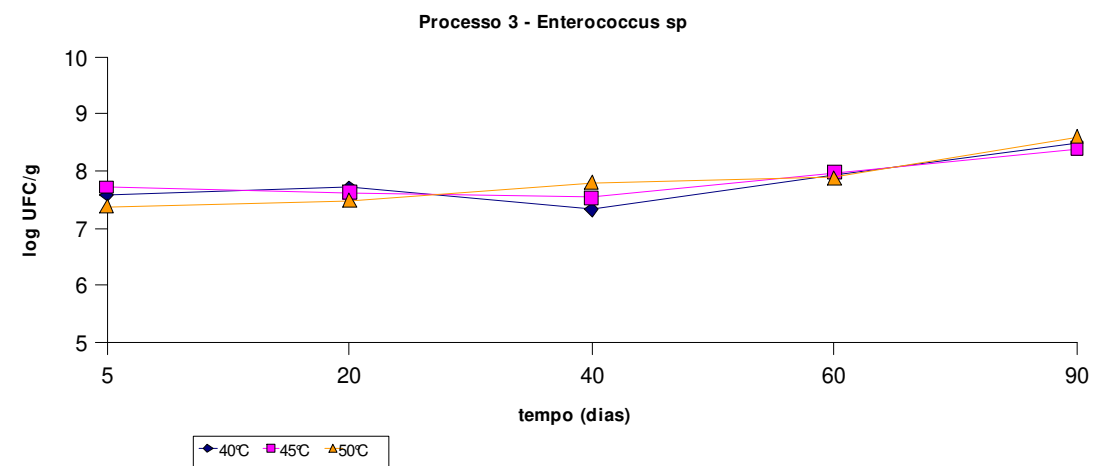


Figura 9. (a, b, c) Contagem de *Enterococcus* sp nos 3 processamentos, em amostras queijo com 5 dias de produção e com 20, 40, 60 e 90 dias de

armazenamento refrigerado.

Da mesma forma que o observado para a microbiota láctica, durante o período de 90 dias de armazenamento refrigerado, pode-se observar que, de um modo geral, o aumento de até 2 ciclos logarítmicos nas contagens para bactérias do gênero *Enterococcus* ocorreu de forma gradativa e contínua.

Se analisarmos conjuntamente os resultados obtidos a partir das amostras de queijos com até 90 dias de armazenamento refrigerado (**Tabela 10**), verificamos que, de um modo geral, o período de 5 a 20 dias, nas condições estudadas, ajudaram a selecionar e favoreceram o desenvolvimento de *Enterococcus* sp. no queijo de coalho.

Já os períodos de 20 a 40 dias e de 40 a 60 dias, nas condições estudadas, foram menos favoráveis ao crescimento da microbiota láctica total porém não tão favoráveis à seleção de *Enterococcus*, proporcionando diminuição da participação destes nessa microbiota.

O período de 60 a 90 dias de armazenamento refrigerado, nas condições estudadas, possibilitaram discreta diminuição nas contagens para microbiota láctica total porém discretos aumentos nas contagens para *Enterococcus*, possibilitando um aumento da participação destes na microbiota láctica total.

Tabela 10. Contagem (UFC/g) de bactérias lácticas totais (BAL) e *Enterococcus* sp nos 3 processamentos (P), em amostras de queijo com 5 (QD5), 20 (QD20), 40 (QD40), 60 (QD60) e 90 (QD90) dias de armazenamento refrigerado, provenientes de diferentes temperaturas de cozimento da massa (40, 45 e 50°C)

Amostra	BAL (UFC/g)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/g)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)	Processamento	BAL (UFC/g)	<i>Enterococcus</i> sp (UFC/g)	<i>Enterococcus</i> sp / BAL (%)	Processamento
QD5 40°C	9,0x10 ⁷	1,0x10 ⁷	11,1%		1,6x10 ⁶	1,1x10 ⁶	68,7%	
QD20 40°C	1,0x10 ⁸	5,0x10 ⁷	50,0%		2,3x10 ⁷	7,3x10 ⁶	31,7%	
QD40 40°C	3,8x10 ⁷	2,2x10 ⁷	57,9%	P1	6,5x10 ⁷	9,1x10 ⁶	14,0%	P2
QD60 40°C	3,0x10 ⁸	5,0x10 ⁷	16,7%		8,2x10 ⁷	8,4x10 ⁶	10,2%	
QD90 40°C	6,2x10 ⁸	7,3x10 ⁷	11,7%		2,1x10 ⁷	1,1x10 ⁷	52,4%	
QD5 45°C	1,3x10 ⁷	9,0x10 ⁶	69,2%		6,0x10 ⁷	5,4x10 ⁷	90,0%	
QD20 45°C	2,0x10 ⁸	1,2x10 ⁸	60,0%		6,2x10 ⁸	3,7x10 ⁸	59,7%	
QD40 45°C	7,1x10 ⁸	1,9x10 ⁸	26,8%	P1	1,2x10 ⁹	2,9x10 ⁸	24,2%	P2
QD60 45°C	4,0x10 ⁸	4,6x10 ⁷	11,5%		3,1x10 ⁹	6,2x10 ⁸	20,0%	
QD90 45°C	4,8x10 ⁸	5,2x10 ⁷	10,8%		1,3x10 ⁹	9,5x10 ⁸	73,1%	
QD5 50°C	2,0x10 ⁷	6,0x10 ⁶	30,0%		8,0x10 ⁵	4,9x10 ⁵	61,2%	
QD20 50°C	9,0x10 ⁷	8,0x10 ⁷	88,9%		7,8x10 ⁶	5,3x10 ⁶	67,9%	
QD40 50°C	9,0x10 ⁸	2,0x10 ⁸	22,2%	P1	5,7x10 ⁷	8,7x10 ⁶	15,3%	P2
QD60 50°C	4,8x10 ⁸	2,4x10 ⁸	50,0%		6,3x10 ⁷	3,2x10 ⁷	50,8%	
QD90 50°C	5,9x10 ⁸	2,1x10 ⁸	35,6%		9,3x10 ⁷	8,0x10 ⁷	86,0%	
QD5 40°C	5,6x10 ⁷	3,8x10 ⁷	67,9%					
QD20 40°C	7,1x10 ⁷	5,1x10 ⁷	71,8%					
QD40 40°C	9,1x10 ⁷	2,1x10 ⁷	23,1%	P3				
QD60 40°C	5,2x10 ⁸	8,3x10 ⁷	16,0%					
QD90 40°C	7,2x10 ⁸	3,0x10 ⁸	41,7%					
QD5 45°C	8,2x10 ⁷	5,2x10 ⁷	63,4%					
QD20 45°C	6,5x10 ⁷	4,2x10 ⁷	64,6%					
QD40 45°C	8,5x10 ⁷	3,4x10 ⁷	40,0%	P3				
QD60 45°C	7,2x10 ⁸	9,4x10 ⁷	13,1%					
QD90 45°C	8,1x10 ⁸	2,5x10 ⁷⁸	30,9%					
			QD5 50°C	6,9x10 ⁷	2,4x10 ⁷	34,8%		
			QD20 50°C	6,1x10 ⁷	3,1x10 ⁷	50,8%		
			QD40 50°C	7,1x10 ⁷	6,3x10 ⁷	88,7%	P3	
			QD60 50°C	1,9x10 ⁸	7,7x10 ⁷	40,5%		
			QD90 50°C	7,0x10 ⁸	4,0x10 ⁸	57,1%		

5.2 Perfil das espécies do gênero *Enterococcus* isoladas

Para fins de confirmação do gênero *Enterococcus*, 5 colônias morfológicamente típicas de cada placa representativa de cada etapa do processamento (leite cru, leite pasteurizado, leite pasteurizado com 24h de armazenamento refrigerado, massa após cozimento, massa após salga, soro, queijo com 5 dias de produção e queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado - **Tabela 11**) foram selecionadas aleatoriamente e de um total de 405 isolados, 94,81% (384/405 - **Anexo I**) confirmaram como pertencentes ao gênero *Enterococcus*. Os demais 5,19% (21/405 - **Anexo II**) apresentaram-se como outros *Streptococcus* sp.

Estes resultados já eram esperados segundo menção na metodologia utilizada (HARTMAN et al., 2001), que prevê o crescimento de possível microbiota acompanhante como por exemplo microrganismos do gênero *Streptococcus*.

A origem destes isolados confirmados para o gênero *Enterococcus* (384) ou não (21) pode ser verificada nas **Tabelas 12 e 13**.

Para identificação em espécie, 162 dos 384 isolados confirmados como pertencentes ao gênero *Enterococcus* foram escolhidos para compor uma amostragem representativa de 2 isolados por etapa do processamento (**Tabela 14**). Do total, 83,9% (136/162) de isolados foram identificados como pertencente à espécie *E. faecium*, 0,6% (1/162) como pertencente à espécie *E. faecalis* e 15,4% (25/162) não puderam ser identificados em espécie (**Tabela 15**), pois os perfis bioquímicos destes isolados não enquadraram-se no previsto pela chave de identificação aqui utilizada.

Estes resultados se assemelham àqueles relatados por Giraffa (2003) e por Gelsomino e colaboradores (2001), que apresentam as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* como as incidentes em produtos lácteos.

Tabela 11. Origem das colônias selecionadas para fins de confirmação em gênero

	P1			P2			P3			TOTAL
LC	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15
LP	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15
LP24h	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15
										45

	P1			P2			P3			TOTAL
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	TOTAL
MC	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
MS	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
S	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD20	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD40	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD60	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD90	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
										360
										405

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; LP24h: leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado; MC: massa após cozimento; MS: massa após salga; S: soro; QD5: queijo com 5 dias após produção; QD20, QD40, QD60 e QD90: queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado; L1, L2 e L3: lote 1, 2 e 3; P1, P2 e P3: processamentos 1, 2 e 3.

Tabela 12. Origem dos isolados confirmados para o gênero *Enterococcus*

	P1			P2			P3			TOTAL
LC	5	5	5	5	5	5	3	3	3	13
LP	3	3	3	3	3	3	3	3	3	13
LP24h	4	4	4	4	4	4	4	4	4	13
										39

	P1			P2			P3			TOTAL
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	TOTAL
MC	5	4	5	5	5	5	5	5	5	44
MS	3	4	5	5	5	5	5	5	5	42
S	4	3	4	5	5	5	5	5	5	41
QD5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD20	5	5	5	5	5	5	4	5	5	44
QD40	5	5	5	4	5	5	5	4	5	43
QD60	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
QD90	5	3	4	5	5	5	5	5	4	41
										345
										384

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; LP24h: leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado; MC: massa após cozimento; MS: massa após salga; S: soro; QD5: queijo com 5 dias após produção; QD20, QD40, QD60 e QD90: queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado; L1, L2 e L3: lote 1, 2 e 3; P1, P2 e P3: processamentos 1, 2 e 3.

Tabela 13. Origem dos isolados não confirmados para o gênero *Enterococcus*

	P1			P2			P3			TOTAL	nº isolado
LC	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2	154, 155
LP	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	122, 124
LP24h	1	-	-	-	-	-	1	-	-	2	526, 540
										6	

	P1			P2			P3			TOTAL	nº isolado
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	TOTAL	nº isolado
MC	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	29
MS	2	1	-	-	-	-	-	-	-	3	142, 143, 149
S	1	2	1	-	-	-	-	-	-	4	157, 160, 165, 171
QD5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
QD20	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	381
QD40	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2	196, 210
QD60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
QD90	-	2	1	-	-	-	-	-	1	4	227, 228, 229, 231
										15	
										21	

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; LP24h: leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado; MC: massa após cozimento; MS: massa após salga; S: soro; QD5: queijo com 5 dias após produção; QD20, QD40, QD60 e QD90: queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado; L1, L2 e L3: lote 1, 2 e 3; P1, P2 e P3: processamentos 1, 2 e 3.

Tabela 14. Origem dos isolados confirmados para o gênero *Enterococcus*, selecionados para identificação em espécie.

	P1			P2			P3			TOTAL
LC	2	-	-	2	-	-	2	-	-	6
LP	2	-	-	2	-	-	2	-	-	6
LP24h	2	-	-	2	-	-	2	-	-	6
										18

	P1			P2			P3			TOTAL
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	TOTAL
MC	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
MS	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
S	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
QD5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
QD20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
QD40	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
QD60	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
QD90	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
										144
										162

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; LP24h: leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado; MC: massa após cozimento; MS: massa após salga; S: soro; QD5: queijo com 5 dias após produção; QD20, QD40, QD60 e QD90: queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado; L1, L2 e L3: lote 1, 2 e 3; P1, P2 e P3: processamentos 1, 2 e 3.

Tabela 15. Características bioquímicas e de crescimento das espécies identificadas

	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus sp</i>
L-arabinose	+	-	+
ribose	+	+	+
sorbitol	±	+	-
D-rafnose	±	-	-
manitol	±	+	-
sacarose	+	+	-
pigmento	-	-	-
L-arginina	+	+	+
50°C	±	-	+
4°C	+	-	+
total de isolados	136 (83,95%)	1 (0,62%)	25 (15,43%)
	162 (100%)		

5.3 Caracterização tecnológica dos isolados

5.3.1 Produção de diacetil

A capacidade de participação em propriedades tecnológicas na produção de queijos pelos 162 isolados identificados em espécie foi investigada e os ensaios com todos eles (**ANEXO III**) apresentaram resultados positivos para a produção de diacetil.

Estes resultados levam a concluir que o sabor e aroma de manteiga, característico no queijo de coalho, pode ser provenientes da ação de bactérias do gênero *Enterococcus*, através de metabolismo do citrato em componentes sápidos e aromáticos como o diacetil.

Mamede (2008) avaliou o teor de diacetil / acetoína nos queijos produzidos e os resultados evidenciaram que a presença de tais compostos e o conseqüente sabor e aroma de manteiga no queijo de coalho podem estar associados ao desenvolvimento de *Enterococcus sp*.

5.3.2 Utilização do citrato

Não apenas a produção de diacetil foi avaliada, mas também a capacidade de utilização do citrato como fonte de carbono. Pelos resultados, obtidos através da observação de zonas claras ao redor das colônias em ágar suco de tomate

suplementado com lactato e citrato de cálcio, tal metabolismo foi detectado em 120 (74,1%) dos 162 isolados testados.

Estes resultados, comparados com os resultados de produção de diacetil (100% dos isolados com resultados positivos) indicam que o citrato pode não ser a única fonte para produção de diacetil.

Giraffa (2003) descreve tanto o metabolismo do citrato quanto do piruvato como característica tecnológica relevante em bactérias lácticas de um modo geral.

Há poucas informações sobre o metabolismo do citrato em bactérias do gênero *Enterococcus* e pesquisas relatam que cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, isoladas de alimentos podem apresentar variações em suas capacidades de utilizar o citrato ou o piruvato como fonte única de carbono, sendo estas capacidades de metabolismo variáveis entre diferentes cepas. Tal característica de metabolismo é em geral mais evidente para *E. faecalis* que para *E. faecium*. Além disso, um co-metabolismo entre citrato e lactose é descrito para o gênero (GIRAFFA, 2003).

Estes resultados evidenciam que, nas condições estudadas, bactérias do gênero *Enterococcus* possuem potencial metabólico para contribuir ativamente com o desenvolvimento de atributos de sabor e aroma característicos ao produto.

5.3.3 Atividade acidificante

Quanto à atividade acidificante avaliada em leite tornasolado, todos os isolados apresentaram resultados positivos com redução do tornassol evidenciando a acidificação do meio pela fermentação da lactose, porém apenas 7 isolados (4,3% - 4 *E. faecium*, 1 *E. faecalis*, 2 *Enterococcus* sp) apresentaram resultados positivos também para formação de coágulo e peptonização com clarificação do meio.

Tais cepas isoladas, apesar de em pequena porcentagem no total da microbiota láctica, podem ter desempenhado papel de fermento termofílico, contribuindo na acidificação.

Esses resultados mostram que os isolados identificados possuem, de um modo geral, baixa atividade acidificante pela fermentação da lactose porém cepas

isoladas são capazes de significativa acidificação complementada por capacidade de peptonização e formação de coágulo, características de cepas descritas como fermentos lácticos.

Com base nos resultados pode-se também dizer que os isolados 117, 118, 119, 183, 189 e 200 podem ser indicados como passíveis de serem utilizados para elaboração de fermento, conforme preconizado por Perri e colaboradores (2007), pois apresentaram resultados tecnológicos satisfatórios como produção de diacetil, digestão da caseína, formação de “coágulo” pela proteólise, fermentação da lactose com acidificação do meio e redução do tornasol.

Tais resultados estão de acordo com os resultados relatados por Giraffa (2003) e Morandi e colaboradores (2006), que descrevem tais bactérias como capazes de baixa atividade acidificante, porém algumas cepas específicas, isoladas de produtos lácteos, apresentam potencial acidificante significativo.

5.3.4 Atividade proteolítica

Os isolados identificados apresentaram também em sua maioria, proteólise fraca ou ausente. Dos 162 isolados identificados, 7 (4,3% - 6 *E. faecium* e 1 *Enterococcus* sp) apresentaram proteólise visível e definida com formação de halos (de até 1mm de diâmetro), 56 (34,6% - 45 *E. faecium* e 11 *Enterococcus* sp) apresentaram proteólise fraca com formação de discreto halo opaco (diâmetro inferior a 1mm) e 99 (61,1%) apresentaram ausência de proteólise.

Os resultados mostram que, de um modo geral, os isolados identificados apresentam proteólise baixa, porém cepas isoladas foram capazes de ação proteolítica significativa. Tais cepas, pela pequena porcentagem que representam no total da microbiota láctica, podem ter contribuído discretamente para o aumento da proteólise observado por Mamede (2008) nos queijos durante o período de armazenamento refrigerado.

5.3.5 Atividade lipolítica

Já quanto à lipólise, dos 162 isolados identificados, 21 (13,0% - 13 *E. faecium*, 8 *Enterococcus* sp) apresentaram lipólise visível e definida com formação de zonas translúcidas e 141 (87,0%) apresentaram ausência de lipólise.

Estes resultados mostram que de um modo geral a ação lipolítica é baixa porém cepas isoladas podem ter atuado produzindo ácidos graxos de cadeia curta.

5.4 Perfil de patogenicidade e de resistência à vancomicina

A determinação do perfil de patogenicidade ocorreu com base nos resultados obtidos por meio da expressão de fatores de virulência como atividade hemolítica, produção de gelatinase e de aminas biogênicas, e de características de resistência intrínseca ao antibiótico vancomicina.

Dos 162 isolados (100%), nenhum apresentou atividade hemolítica, tais resultados corroboram os apresentados por Franz e colaboradores (1999) que relatam bactérias do gênero *Enterococcus* como não produtoras de hemolisinas.

Nenhum dos isolados apresentou resistência ao antibiótico vancomicina, porém cabe colocar que a resistência à antibióticos neste gênero é descrita como característica adquirida, mediada por genes plasmidiais ou residentes em transposons (FRANZ et al., 2003). Dessa forma, pressões seletivas exercidas pelo uso indiscriminado de antibióticos, como por exemplo para controle de mastite em gado leiteiro, podem criar reservatórios de transferência de resistência à antibióticos em vários ecossistemas.

Apenas 1 isolado (0,6%) apresentou produção de gelatinase (isolado 215). Apesar da baixa representatividade, este resultado mostra que cepas com esta característica, antes relatadas apenas em ambientes hospitalares, isoladas de pacientes com endocardites (FRANZ et al., 2003), podem ser encontradas em alimentos.

Quanto à produção de aminas biogênicas, nenhum dos 162 isolados apresentou resultados positivos para descarboxilação enzimática dos aminoácidos

ornitina, lisina e histidina, porém todos foram capazes de descarboxilação da arginina e 37 (22,8%) foram capazes de descarboxilação da tirosina.

O queijo é um excelente meio para produção de aminas biogênicas já que possui condições apropriadas de pH, concentração salina e teor de umidade para sua biossíntese, além dos aminoácidos e bactérias capazes de descarboxilá-los. Em níveis baixos de concentração, as aminas biogênicas não representam um risco sério à saúde, mas podem tornar-se perigosas se o consumo do alimento contaminado for grande ou se as rotas normais de catabolismo das aminas estiverem bloqueadas no consumidor. Já foram relatados casos de crise hipertensiva, acompanhada de forte dor de cabeça em pessoas que ingeriram alimento contaminado com tiramina. Algumas aminas, como putrescina e cadaverina, podem potencializar a ação da histamina, a qual pode provocar intoxicações graves, além de estar envolvida em mecanismos que desencadeiam ataques (PERRY, 2004).

Giraffa (2002) já relatava a capacidade de descarboxilação de aminoácidos livres, principalmente a tirosina, por bactérias do gênero *Enterococcus*, produzindo tiaminas, o que vai de encontro aos resultados obtidos, evidenciando um ponto negativo da presença destas bactérias no produto queijo de coalho.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O processamento de queijo de coalho, nas condições estudadas, apresenta-se seletivo para bactérias do gênero *Enterococcus*, já que a etapa de pasteurização é incapaz da eliminação destas bactérias.

Tanto a etapa de cozimento da massa, quanto de salga favorecem o crescimento das bactérias do gênero *Enterococcus* de modo seletivo.

O período de armazenamento refrigerado possibilita aumento nas contagens para bactérias do gênero *Enterococcus*.

Neste tipo de queijo a espécie *E. faecium* é a que ocorre com maior incidência.

A investigação da capacidade de participação em propriedades tecnológicas, na produção de queijos de coalho, mostrou que o sabor e aroma de manteiga característicos neste tipo de queijo podem ser provenientes da ação de bactérias do gênero *Enterococcus*.

De um modo geral, as bactérias do gênero *Enterococcus* apresentaram baixa atividade acidificante porém há incidência de isolados com características de fermento termofílico, que podem participar na obtenção de resultados tecnológicos satisfatórios.

Embora os isolados não tenham apresentado certas características de patogenicidade, outros estudos mais aprofundados devem ser realizados para se comprovar a inocuidade deste alimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNFP. Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. **MAFF Advisory Committee on Novel Foods and Processes**, Report, Ergon House c/o Nobel House, 17 Smith Square, London SW1 3JR, UK, 1996.

ANDREWES, F.W.; HORDER, T.J. A study of the Streptococci pathogenic for man. **The Lancet**. v.2, p.708-713, 1906.

ARIZCUN, C.; BARCINA, Y., TORRE, P. Identification and characterization of photolytic activity of *Enterococcus* spp. Isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.17-24, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Washington, 1995. v. 1-2, s. 33.2.50.

BARRITT, M. M. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.42, p.441-454, 1936

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; FREITAS, A. N. M. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no Estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e processamento de Alimentos - B.CEPPA**. Curitiba, v.19, n.1, p.139-153, 2001.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijos de coalho produzidos no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - B.CEPPA**. Curitiba, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BOTINA, S.G.; TSYGANKOV, Y.D.; SUKHODOLETS, V.V. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing. **Russian Journal of Genetics**, v.42, n.12, p.1367-1379, 2006.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - B.CEPPA**. Curitiba, v.21, n.2, p.209-430, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001**. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de julho de 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002**. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de setembro de 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº146, de 7 de março de 1996**. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996.

BRIDGE, P. D.; SNEATH, P. H. A. *Streptococcus gallinarum* sp. nov. and *Streptococcus oralis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.410-415, 1982.

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

CARVALHO, M. D.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; SHEWMAKER, P. L.; FALSEN, E.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus sanguinicola* sp. nov., isolated from human blood, comprising the provisional new species of *Enterococcus* CDC PNS-E2, and recognition of strain previously described as *Enterococcus* CDC PNS-E1 as *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.3473-3476, 2008.

CARVALHO, M. G.; SHEWMAKER, P. L.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; SAMPSON, A. J.; JOYCE, K.; BARRETT, T. J.; TEIXEIRA, L. M.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1505-1508, 2006.

CARVALHO, M. G. S.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; SHEWMAKER, P. L.; TEIXEIRA, L. M.; FACKLAM, R. R. Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1192-1198, 2004.

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; HERMIDA, M.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. **International Journal of Microbiology**, v.48, n.2, p.97-111, 1999.

CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.33, n.2-3, p.307-313, 1996.

- CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; FERNADEZ, M. F.; HERNANDEZ, P. E. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, v.15, n.3, p. 289-298, 1998.
- COLLINS, M. D.; FACKLAM, R. R.; FARROW, J. A.; WILLIAMSON, R. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, v.48, p.283-288, 1989.
- COLLINS, M. D.; FARROW, J. A. E.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.8-12, 1986.
- COLLINS, M. D.; JONES, D.; FARROW, J. A. E.; KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.220-223, 1984.
- COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U. M.; PIGOTT, N. E.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, p.95-98, 1991.
- COSENTINO, S.; PISANO, M. B.; CORDA, A.; FADDA, M. E.; PIRAS, C. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **Journal of Dairy Research**, v.71, n.4, p.444-450, 2004.
- DE VAUX, A.; LAGUERRE, G.; DIVIES, C.; PREVOST, H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.383-387, 1998.
- DE GRAEF, E. M.; DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; COLLINS, M. D.; LEFEBVRE, K.; SWINGS, J.; HAESEBROUCK, F. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1069-1074, 2003.
- DEVOYOD, J. J. La flore microbienne du fromage de Roquefort. **Le Lait**, v.49, p.637-650, 1969.
- DEVRIESE, L. A.; DUTTA, G. N.; FARROW, J. A. E.; VAN DE KERCKHOVE, A.; PHILLIPS, B. A. *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, p.772-776, 1983.
- DEVRIESE, L. A.; CEYSSENS, K.; RODRIGUES, U. M. COLLINS, M. D. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS Microbiology Letters**, v.71, p.247-252, 1990.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of Enterococcus spp. 1. Media for isolation and enumeration. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.147-164, 2003.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1628– 1635, 2001.

ELDAR, A.; CLAUDIO, G.; SANTA, L.A.; BOZZETTA, E.; GORIA, M.PREARO, M.; BERCOVIER, H. Enterococcus seriolicida is a junior synonymum of Lactococcus garvieae, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. **Current Microbiology**, v.32, n.2, p.85-88, 1996.

ELDIN, B. B.; ELSODA, M; EZZAT, N. Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of enterococci strains isolated from Egyptian dairy products. **Le Lait**, v. 82, p. 289-304, 2002.

ELSNER, H. A.; SOBOTTKA, I.; MACK, D.; CLAUSSEN, M.; LAUFS, R.; WIRTH, R. Virulence Factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Blood Cluture Isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.19, p.39-42, 2000.

ENNAHAR, S.; YIMIN, C. Biochemical and genetic evidence for the transfer of Enterococcus solitarius Collins et al. 1989 to the genus Tetrigenococcus as Tetrigenococcus solitarius comb.nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.55, p.589-592, 2005

FACKLAM, R.; ELLIOTT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p. 479-495, 1995.

FAO/WHO Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in: **Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**, October, 2001

FARROW, J. A. E.; KRUIZE, J.; PHILLIPS, B. A.; BRAMLEY, A. J.; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on Streptococcus bovis and Streptococcus equinus: description of Streptococcus alactolyticus sp. nov. and Streptococcus saccharolyticus sp. nov. **Systematic Applied Microbiology**, v.5, p.467-482, 1985.

FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. Enterococcus hirae, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.35, p.73-75, 1985.

FEITOSA, T. BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Listeria* sp e microrganismos indicadores higiênico

sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.23, p.162-165, 2003.

FORTINA, M. G.; RICCI, G.; MORA, D.; MANACHINI, P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1717-1721, 2004.

FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.1-24, 1999

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. *Enterococci* in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.105-122, 2003.

FREITAS, A. C.; PINTADO, A. E.; PINTADO, M.E.; MALCATA, M. X. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. **International Dairy Journal**, v.9, p. 593-603, 1999

GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ, M.; MAQUEDA, M. Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. **Canadian Journal Microbiology**, v.35, n.2, p.318-321, 1989.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J.; COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.177-188, 2001.

GILVANOVA, E. A.; PAAVILAINEN, S. K.; MAKELA, M. J.; KORPELA, T. K.; USANOV, N. G. Microorganisms living into the nutrient media containing 1% of sodium azide. Dados não publicados, citados em NCBI (2009).

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.163-171, 2002.

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

GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.96, n.538, p.65-69, 2001.

HAAS, M. J. Lipolytic Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-Producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological**

examination of foods. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology.** 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1998.

HARTMAN, P. A.; DEIBEL, R. H.; SIEVERDING, L. M. Enterococci. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

JOHNSON, A. P. The pathogenicity of enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.33, p.1083-1089, 1994.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.123-131, 2003.

KOORT, J.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; SUKURA, A.; BJORKROTH, J. Enterococcus hermanniensis sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1823-1827, 2004.

KUNZ, B. **Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos.** Zaragoza, Acribia, 1983.

KUSUDA, R; KAWAI, K.; SALATI, F.; BANNER, C. R.; FRYER, J. L. Enterococcus seriolicida sp. Nov., a fish pathogen. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.406-409, 1991.

LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes.** Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Laboratório Nacional de Referência Animal. Brasília/DF: A secretaria, 1981.

LAW-BROWN, J.; MEYERS, P. R. Enterococcus phoeniculicola sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, Phoeniculus purpureus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.683-685, 2003.

MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v.205, n.1, p.25–30, 1997.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.** Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 2000.

MAMEDE, P. L.; **Efeto da temperatura de cozimento sobre as propriedades tecnológicas do queijo de coalho**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MANERO, A.; BLANCH, A. R. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4425-4430, 1999.

MARCY, J. A.; PRUETT, P. J. Proteolytic Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; COLLINS, M. D. Enterococcus sulfureus, a new yellow-pigmented Enterococcus species. **FEMS Microbiology Letters**, v.80, p.69-74, 1991.

MIDURA, T.; BRYANT, R. G. Sampling Plans, Sample Collection, Shipment, and Preparation for Analysis. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

MOELLER, V. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.36, p.158, 1955.

MOORE, W. E. C.; CATO, E.P., AND MOORE, L.V.H. "Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 Approved Lists of bacterial names (1 January 1980 to 1 January 1985)." **Int. J. Syst. Bacteriol.** (1985) 35:382-407.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. **International Dairy Journal**, v.16, n.8, p.867-875, 2006.

MOREIRA, I. V.; DA SILVA, M.; TIAGO, I.; VERISSIMO, A.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Enterococcus inusitatus sp. nov. isolated from treated wastewater. Dados não publicados, citados em NCBI (2009).

NASCIMENTO, M. S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo minas frescal**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

NASER, S. M.; VANCANNEYT, M.; DE GRAEF, E.; DEVRIESE, L.A.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B., SVEC, P.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; SWINGS, J. Enterococcus canintestini sp. nov., from faecal

samples of healthy dogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2177-2182, 2005.

NASER, S. M.; VANCANNEYT, M.; HOSTE, B.; SNAUWAERT, C.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p.413-416, 2006.

NCBI (National Center for Biotechnology Information), Taxonomy Browser, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=1350&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>, acesso em novembro de 2009.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Information Supplement**. CLSI document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. 6th ed. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health Products and Food Branch. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, [MFHPB 30]. Ottawa, 2001.

PARKER, M. TOM; COLLIER, LESLIE H. **Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity**. v.2 - Systematic bacteriology, ed. by M. Tom Parker and Brian I. Duerden. 8th ed. London: Edward Arnold, 1990

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de coalho comercializado no município de Campinas**, S.P. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

PERRI, J. M. ; PITON, M. A. J.; ROSADO, M. S.; MAMEDE, P. L.; KUAYE, A. Y.; VIOTTO, W. H. Caracterização de propriedades tecnológicas de bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas de queijo de coalho. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. **Anais do 7º SLACA**, Campinas, CD-ROM, 2007.

PERRY, K. S. P. queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v.27, n.2, p.293-300, 2004.

- POETA P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. Enterococcus spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.412-414, 2005.
- POMPEI, R.; BERLUTTI, F.; THALLER, M. C.; INGIANNI, A.; CORTIS, G.; DAINELLI, B. Enterococcus flavescens sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v.42, p.365-369, 1992.
- REUTER, G. Culture media for enterococci and Group D-streptococci. Corry, In: J. E. L.; CURTIS, G. D. W., BAIRD, R. M. Culture Media for Food Microbiology. Progress in Industrial Microbiology, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, v.34, p.51-61, 1995.
- RODRIGUES, U.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of Streptococcus saccharolyticus based on 16S rRNA sequencing. **FEMS Microbiology. Letters**, v.59, p.231-234, 1990.
- SABIA, C.; MANICARDI, G.; MESSI, P.; DE NIEDERHÄUSERN, S.; BONDI, M. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by Enterococcus casseliflavus IM 416K1 isolated from Italian sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.75, n.1-2, p.163-170, 2002.
- SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTIZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.125-136, 2002.
- SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.31-34, 1984.
- SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bacteriol. Rev**, v.1, p.3-97, 1937
- SHERMAN, J. M.; WING, H. U. Streptococcus durans nov. sp. **Journal of Dairy Science**, v.20, p.165-167, 1937.
- SKEAN, J. D.; OVERCAST, W. W. Another Medium for Enumerating Citrate-Fermenting Bacteria in Lactic Cultures. **Journal of Dairy Science**, v.45, n.12, p.1530-1531, 1962.
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, (1980) v.30, p.225-420, 1980.

SUKONTASING, S.; TANASUPAWAT, S.; MOONMANGMEE, S.; LEE, J. S.; SUZUKI, K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2151-2154, 2007.

SUKONTASING, S.; TANASUPAWAT, S.; SUZUKI, K. I. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., from fermented tea leaves (Miang). Dados não publicados, citados em NCBI (2009)

SVEC, P.; DEVRIESE, L. A.; SEDLACEK, I.; BAELE, M.; VANCANNEYT, M.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J.; DOSKAR, J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1567-1574, 2001.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; DEVRIESE, L. A.; NASER, S. M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; SWINGS, J. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2183-2187, 2005a.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; KOORT, J.; NASER, S. M.; HOSTE, B.; VIHAVAINEN, E.; VANDAMME, P.; SWINGS, J.; BJORKROTH, J. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2479-2484, 2005b.

SVEC, P.; VANCANNEYT, M.; SEDLACEK, I.; NASER, S. M.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; SWINGS, J. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p.577-581, 2006

TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. S.; ESPINOLA, M. M. B.; STEIGERWALT, A. G.; DOUGLAS, M. P.; BRENNER, D. J.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus porcinius* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1737-1743, 2001.

TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. S.; STEIGERWALT, A. G.; MOREU, R. E.; SHEWMAKER, P. L.; FALSEN, E.; FACKLAM, R. R. Designation of new enterococcal species, provisionally named as CDC PNS-E1, CDC PNS-E2, and CDC PNS-E3, as *Enterococcus italicus*, *Enterococcus sanguinicola* sp. nov. and *Enterococcus hawaiiensis* sp. nov. **2nd International ASM-FEMS Conference on Enterococci. Helsingör, Denmark.** p.28-31, 2005.

THIERCELIN, M. E. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. **C.R. Seances Societe Biologie.** v.5, p.269-271, 1899.

TYRRELL, G. J.; TURNBULL, L.; TEIXEIRA, L. M.; LEFEBVRE, J.; CARVALHO, M. G. S.; FACKLAM, R. R.; LOVGREN, M. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and

Enterococcus pallens sp. nov. isolated from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1140-1145, 2002.

UHL, J. R.; HOPKINS, M.; ZHANG, S.; LESKE, D. A.; HOLMES, J. M.; COCKERILL, F. R. A new Enterococcus species isolated from neonatal rats with diarrhoea. **Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology**, Washington, DC: American Society for Microbiology, v. R-6, p.480, 1998.

VANCANNEYT, M.; ZAMFIR, M.; DEVRIESE, L.A.; LEFEBVRE, K.; ENGELBEEN, K.; VANDEMEULEBROECKE, K.; AMAR, M.; DE VUYST, L.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J. Enterococcus saccharominimus sp. nov., from dairy products. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.2175-2179, 2004.

VANCANNEYT, M.; SANUWAERT, C.; CLEENWERCK, I; BAELE, M.; DESCHEEMAER, P.; GOOSSENS, H.; POT, B.; VANDAMME, P.; SWINGS, J.; HAESBROUCK, F.; DEVRIESE, L.A. Enterococcus villorum sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.393-400, 2001.

VAUGHN, D. H.; RIGGSBY, W. S.; MUNDT, J. O. Deoxyribonucleic acid relatedness of strains of yellow-pigmented group D streptococci. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p.204-212, 1979.

WEISS, N.; SPROEER, C.; SEDLACEK, I. Enterococcus rottae sp. nov., a new urease positive species isolated from water. Dados não publicados, citados em NCBI (2009).

WILLIAMS, A. M.; FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. Reverse transcriptase sequencing of 16s ribosomal RNA from Streptococcus cecorum. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 185-189, 1989.

8. ANEXOS

ANEXO I. Características bioquímicas, morfológicas e de crescimento dos 384 isolados confirmados como pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

isolado	origem		10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
4	MC	L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
5	MC	L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
7	LP	- P2	+	+	-	+	+	+	+
8	LP	- P2	+	+	-	+	+	+	+
9	LC	- P3	+	+	-	+	+	+	+
20	LC	- P3	+	+	-	+	+	+	+
21	LC	- P2	+	+	-	+	+	+	+
24	MC	L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
25	LP	- P3	+	+	-	+	+	+	+
26	LP	- P3	+	+	-	+	+	+	+
27	MC	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
28	S	L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
30	MC	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
31	S	L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
32	S	L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
33	MC	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
34	S	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
38	MS	L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
39	MS	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
40	MS	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
41	MC	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
44	QD5	L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
45	QD5	L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
46	QD5	L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
49	QD5	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
50	QD5	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
51	QD5	L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
54	QD5	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
55	QD5	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
56	QD5	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
59	QD20	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
60	QD20	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
61	QD20	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
64	QD20	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
65	QD20	L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
66	QD20	L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
69	QD20	L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
70	QD20	L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
71	QD20	L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
78	MS	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
79	MS	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
80	S	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
81	S	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
82	MC	L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
83	MC	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
84	MC	L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
85	MC	L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
86	MC	L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
87	MC	L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
90	QD60	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
91	QD60	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
94	QD60	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
95	QD60	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
96	QD60	L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
99	QD60	L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
100	QD60	L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
101	QD60	L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
104	QD90	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
105	QD90	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
106	QD90	L1 P3	+	+	-	+	+	+	+

continuação **ANEXO I.**

isolado	origem	10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
107	QD90 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
108	QD90 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
109	QD90 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
114	QD90 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
115	QD90 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
116	QD90 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
117	LC - P1	+	+	-	+	+	+	+
118	LC - P1	+	+	-	+	+	+	+
119	LC - P2	+	+	-	+	+	+	+
120	MC L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
121	MS L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
123	MS L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
125	MS L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
126	MS L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
130	MS L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
131	MS L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
132	MS L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
133	S L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
134	S L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
135	S L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
136	S L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
137	S L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
138	S L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
139	S L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
140	S L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
146	LC - P1	+	+	-	+	+	+	+
147	LC - P1	+	+	-	+	+	+	+
148	LC - P1	+	+	-	+	+	+	+
150	LC - P2	+	+	-	+	+	+	+
151	LC - P2	+	+	-	+	+	+	+
152	LC - P2	+	+	-	+	+	+	+
153	LC - P3	+	+	-	+	+	+	+
161	LP - P1	+	+	-	+	+	+	+
162	LP - P1	+	+	-	+	+	+	+
163	LP - P1	+	+	-	+	+	+	+
164	LP - P2	+	+	-	+	+	+	+
166	LP - P2	+	+	-	+	+	+	+
167	LP - P2	+	+	-	+	+	+	+
168	LP - P3	+	+	-	+	+	+	+
169	LP - P3	+	+	-	+	+	+	+
170	LP - P3	+	+	-	+	+	+	+
172	QD5 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
177	QD5 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
178	QD5 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
179	QD5 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
180	QD5 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
181	QD5 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
182	QD5 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
183	QD5 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
184	QD5 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
187	QD20 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
188	QD20 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
189	QD40 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
193	MC L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
194	QD20 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
195	QD20 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
197	QD20 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
198	QD20 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
199	QD40 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
200	QD40 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+

continuação **ANEXO I.**

isolado	origem	10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
201	QD20 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
202	QD40 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
203	QD40 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
204	QD40 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
205	QD40 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
206	QD60 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
207	QD60 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
208	QD60 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
209	QD40 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
211	QD60 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
212	QD60 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
213	QD60 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
214	QD40 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
215	QD40 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
216	QD60 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
217	QD60 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
218	QD60 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
219	QD40 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
220	QD40 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
221	QD90 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
222	QD90 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
223	QD90 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
224	QD40 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
225	QD40 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
226	QD90 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
230	QD90 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
232	MC L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
233	MC L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
234	MC L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
235	MC L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
236	MC L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
237	MC L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
238	MC L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
239	MC L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
240	MC L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
241	MC L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
242	MC L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
243	MC L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
244	MC L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
245	MC L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
246	MC L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
247	MC L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
248	MC L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
249	MC L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
250	MC L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
251	MC L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
252	MC L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
253	MC L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
254	MC L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
255	MC L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
256	MC L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
257	MC L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
258	MC L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
259	MC L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
260	MC L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
261	MS L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
271	MS L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
272	MS L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
273	MS L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
274	MS L1 P1	+	+	-	+	+	+	+

continuação do **ANEXO I.**

isolado	origem	10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
275	MS L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
276	MS L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
277	MS L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
278	MS L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
279	MS L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
280	MS L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
281	MS L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
282	MS L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
283	MS L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
284	MS L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
285	MS L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
286	MS L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
287	MS L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
288	MS L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
289	MS L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
290	MS L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
291	MS L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
292	MS L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
293	MS L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
294	MS L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
295	MS L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
296	MS L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
297	MS L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
298	MS L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
299	MS L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
309	S L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
310	S L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
311	S L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
312	S L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
313	S L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
314	S L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
315	S L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
316	S L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
317	S L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
318	S L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
319	S L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
320	S L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
321	S L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
322	S L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
323	S L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
324	S L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
325	S L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
326	S L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
327	S L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
328	S L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
329	S L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
330	S L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
331	S L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
332	S L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
333	S L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
334	S L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
335	S L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
345	QD5 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
346	QD5 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
347	QD5 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
348	QD5 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
349	QD5 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
350	QD5 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
351	QD5 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
352	QD5 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
353	QD5 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+

continuação do **ANEXO I.**

isolado	origem	10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
354	QD5 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
355	QD5 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
356	QD5 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
357	QD5 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
358	QD5 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
359	QD5 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
360	QD5 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
361	QD5 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
362	QD5 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
372	QD20 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
373	QD20 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
374	QD20 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
375	QD20 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
376	QD20 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
377	QD20 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
378	QD20 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
379	QD20 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
380	QD20 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
382	QD20 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
383	QD20 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
384	QD20 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
385	QD20 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
386	QD20 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
387	QD20 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
388	QD20 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
389	QD20 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
399	QD40 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
400	QD40 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
401	QD40 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
402	QD40 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
403	QD40 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
404	QD40 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
405	QD40 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
406	QD40 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
407	QD40 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
408	QD40 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
409	QD40 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
410	QD40 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
411	QD40 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
412	QD40 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
413	QD40 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
414	QD40 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
415	QD40 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
416	QD40 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
417	QD20 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
418	QD20 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
419	QD20 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
420	QD20 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
421	QD20 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
422	QD20 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
423	QD20 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
424	QD20 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
425	QD20 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
426	QD20 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
427	QD40 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
428	QD40 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
429	QD60 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
439	QD60 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
440	QD60 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
441	QD60 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
442	QD60 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+

continuação **ANEXO I.**

isolado	origem	10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
443	QD60 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
444	QD60 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
445	QD60 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
446	QD60 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
447	QD60 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
448	QD60 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
449	QD60 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
450	QD60 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
451	QD60 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
452	QD60 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
453	QD60 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
454	QD60 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
455	QD60 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
456	QD60 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
457	QD5 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
466	QD90 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
467	QD90 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
468	QD90 L1 P1	+	+	-	+	+	+	+
469	QD90 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
470	QD90 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
471	QD90 L2 P1	+	+	-	+	+	+	+
472	QD90 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
473	QD90 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
474	QD90 L3 P2	+	+	-	+	+	+	+
475	QD90 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
476	QD90 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
477	QD90 L1 P3	+	+	-	+	+	+	+
478	QD90 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
479	QD90 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
480	QD90 L2 P3	+	+	-	+	+	+	+
481	QD90 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
482	QD90 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
483	QD90 L3 P3	+	+	-	+	+	+	+
484	QD20 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
485	QD60 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
486	QD60 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
487	QD60 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
488	QD60 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
489	QD60 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
490	QD60 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
491	QD60 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
492	QD60 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
493	QD60 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
495	QD90 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
496	QD90 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
497	QD90 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
498	QD90 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
499	QD90 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
500	QD90 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
501	QD90 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
502	QD90 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
503	QD90 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
504	QD40 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
505	QD40 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
506	QD40 L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
507	QD40 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
508	QD40 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
509	QD40 L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
510	QD40 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
511	QD40 L2 P2	+	+	-	+	+	+	+

continuação **ANEXO I.**

isolado	origem		10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
512	QD40	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
513	QD5	L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
514	QD5	L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
515	QD5	L3 P1	+	+	-	+	+	+	+
516	QD5	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
517	QD5	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
518	QD5	L1 P2	+	+	-	+	+	+	+
519	QD5	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
520	QD5	L2 P2	+	+	-	+	+	+	+
527	LP24h	- P1	+	+	-	+	+	+	+
528	LP24h	- P1	+	+	-	+	+	+	+
529	LP24h	- P1	+	+	-	+	+	+	+
530	LP24h	- P1	+	+	-	+	+	+	+
531	LP24h	- P2	+	+	-	+	+	+	+
532	LP24h	- P2	+	+	-	+	+	+	+
533	LP24h	- P2	+	+	-	+	+	+	+
534	LP24h	- P2	+	+	-	+	+	+	+
535	LP24h	- P2	+	+	-	+	+	+	+
536	LP24h	- P3	+	+	-	+	+	+	+
537	LP24h	- P3	+	+	-	+	+	+	+
538	LP24h	- P3	+	+	-	+	+	+	+
539	LP24h	- P3	+	+	-	+	+	+	+

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; LP24h: leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado; MC: massa após cozimento; MS: massa após salga; S: soro; QD5: queijo com 5 dias após produção; QD20, QD40, QD60 e QD90: queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado; L1, L2 e L3: lote 1, 2 e 3; P1, P2 e P3: processamentos 1, 2 e 3; BE: bile esculina

ANEXO II. Características bioquímicas, morfológicas e de crescimento dos 21 isolados não confirmados como pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

isolado	origem	10°C	45°C	catalase	Gram	BE	6,5%NaCl	pH 9,6
122	LP - P1	+	+	-	+	-	-	-
154	LC - P3	+	+	-	+	-	-	-
155	LC - P3	+	+	-	+	-	-	-
171	S L3 P1	+	+	-	+	-	-	-
196	QD40 L2 P3	+	+	-	+	-	-	-
210	QD40 L1 P2	+	+	-	+	-	-	-
227	QD90 L3 P3	+	+	-	+	-	-	-
228	QD90 L2 P1	+	+	-	+	-	-	-
229	QD90 L2 P1	+	+	-	+	-	-	-
231	QD90 L3 P1	+	+	-	+	-	-	-
540	LP24h - P3	+	+	-	+	-	-	-
29	MC L2 P2	-	+	-	+	-	-	-
124	LP - P1	-	+	-	+	-	-	-
142	MS L1 P1	-	+	-	+	-	-	-
143	MS L1 P1	-	+	-	+	-	-	-
149	MS L2 P1	-	+	-	+	-	-	-
157	S L2 P1	-	+	-	+	-	-	-
160	S L1 P1	-	+	-	+	-	-	-
165	S L2 P1	-	+	-	+	-	-	-
381	QD20 L1 P3	-	+	-	+	-	-	-
526	LP24h - P1	-	+	-	+	-	-	-

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; LP24h: leite pasteurizado após 24h de armazenamento refrigerado; MC: massa após cozimento; MS: massa após salga; S: soro; QD5: queijo com 5 dias após produção; QD20, QD40, QD60 e QD90: queijo com 20, 40, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado; L1, L2 e L3: lote 1, 2 e 3; P1, P2 e P3: processamentos 1, 2 e 3; BE: bile esculina

ANEXO III. Perfil tecnológico dos isolados identificados

PERFIL TECNOLÓGICO										
litmus milk										
isolado	origem	redução do tornasol	formação de coágulo	acidificação do meio pela fermentação da lactose	peptonização com clarificação do meio	produção de diacetil (Barritt)	proteólise (PCA 1%Skim Milk)	utilização de citrato (TJAC)	lipólise (Spirit Blue Agar)	espécie
4	MC	L3	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
5	MC	L3	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
7	LP	-	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
8	LP	-	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
9	LC	-	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
20	LC	-	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
21	LC	-	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
24	MC	L2	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
25	LP	-	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
26	LP	-	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
27	MC	L1	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
28	S	L3	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
30	MC	L1	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
31	S	L1	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
32	S	L3	P3	+	-	+	-	+	-	<i>Enterococcus sp</i>
33	MC	L2	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
34	S	L1	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
38	MS	L2	P2	+	-	+	-	+	-	<i>Enterococcus sp</i>
39	MS	L2	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
40	MS	L2	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
41	MC	L2	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
44	QD5	L3	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
45	QD5	L3	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
46	QD5	L3	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
49	QD5	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
50	QD5	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
51	QD5	L2	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
54	QD5	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
55	QD5	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
56	QD5	L1	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
59	QD20	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
60	QD20	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
61	QD20	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
64	QD20	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
65	QD20	L2	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
66	QD20	L2	P4	+	-	+	-	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
69	QD20	L3	P3	+	-	+	-	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
70	QD20	L3	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
71	QD20	L3	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
78	MS	L1	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
79	MS	L1	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
80	S	L1	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
81	S	L1	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
82	MC	L1	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>

continuação ANEXO III.

PERFIL TECNOLÓGICO										
litmus milk										
isolado	origem	redução do tornasol	formação de coágulo	acidificação do meio pela fermentação da lactose	peptonização com clarificação do meio	produção de diacetil (Barrit)	proteólise (PCA 1%Skim Milk)	utilização de citrato (TJAC)	lipólise (Spirit Blue Agar)	espécie
83	MC	L1	P3	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
84	MC	L1	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
85	MC	L2	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
86	MC	L2	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
87	MC	L3	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
90	QD60	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
91	QD60	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
94	QD60	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
95	QD60	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
96	QD60	L2	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
99	QD60	L3	P3	+	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
100	QD60	L3	P3	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
101	QD60	L3	P4	+	-	+	-	f	-	<i>E. faecium</i>
104	QD90	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
105	QD90	L1	P3	+	-	+	-	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
106	QD90	L1	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
107	QD90	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
108	QD90	L2	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
109	QD90	L2	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
114	QD90	L3	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
115	QD90	L3	P3	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
116	QD90	L3	P4	+	-	+	-	f	+	<i>E. faecium</i>
117	LC	-	P2	+	+	+	+	f	+	<i>E. faecium</i>
118	LC	-	P2	+	+	+	+	f	+	<i>E. faecium</i>
119	LC	-	P3	+	+	+	+	f	+	<i>E. faecium</i>
120	MC	L3	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
121	MS	L2	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
123	MS	L2	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
125	MS	L3	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
126	MS	L3	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
130	MS	L3	P2	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
131	MS	L3	P2	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
132	MS	L1	P3	+	-	+	-	-	+	<i>Enterococcus sp</i>
133	S	L2	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
134	S	L2	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
135	S	L3	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
136	S	L3	P4	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
137	S	L1	P3	+	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
138	S	L2	P3	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
139	S	L2	P3	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
140	S	L3	P3	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
161	LP	-	P2	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
162	LP	-	P2	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
172	QD5	L1	P2	+	-	+	-	f	-	<i>Enterococcus sp</i>
177	QD5	L2	P2	+	-	+	-	f	-	<i>E. faecium</i>
178	QD5	L2	P2	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
179	QD5	L2	P4	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
180	QD5	L1	P4	+	-	+	-	+	+	<i>E. faecium</i>

continuação ANEXO III.

PERFIL TECNOLÓGICO											
litmus milk											
isolado	origem	redução do tornasol	formação de coágulo	acidificação do meio pela fermentação da lactose	peptonização com clarificação do meio	produção de diacetil (Barrit)	proteólise (PCA 1%Skim Milk)	utilização de citrato (TJAC)	lipólise (Spirit Blue Agar)	espécie	
181	QD5	L3	P4	+	-	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
182	QD5	L3	P2	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecium</i>
183	QD5	L3	P2	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus sp</i>
184	QD5	L1	P2	+	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
187	QD20	L1	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
188	QD20	L1	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
189	QD40	L3	P4	+	+	+	+	+	f	+	<i>E. faecium</i>
194	QD20	L2	P2	+	-	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus sp</i>
195	QD20	L2	P2	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecium</i>
197	QD20	L3	P2	+	-	+	-	+	f	+	<i>E. faecium</i>
198	QD20	L3	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus sp</i>
199	QD40	L3	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
200	QD40	L3	P2	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus sp</i>
201	QD20	L3	P3	+	-	+	-	+	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
202	QD40	L1	P2	+	-	+	-	+	f	+	<i>E. faecium</i>
203	QD40	L1	P2	+	-	+	-	+	f	+	<i>E. faecium</i>
204	QD40	L2	P2	+	-	+	-	+	f	-	<i>E. faecium</i>
205	QD40	L2	P2	+	-	+	-	+	f	-	<i>E. faecium</i>
206	QD60	L1	P2	+	-	+	-	+	f	-	<i>E. faecium</i>
207	QD60	L1	P2	+	-	+	-	+	f	-	<i>E. faecium</i>
208	QD60	L1	P4	+	-	+	-	+	f	-	<i>Enterococcus sp</i>
209	QD40	L1	P3	+	-	+	-	+	f	-	<i>E. faecium</i>
211	QD60	L2	P2	+	-	+	-	+	f	+	<i>E. faecium</i>
212	QD60	L2	P2	+	-	+	-	+	-	-	<i>Enterococcus sp</i>
213	QD60	L2	P4	+	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
214	QD40	L2	P3	+	-	+	-	+	-	-	<i>Enterococcus sp</i>
215	QD40	L2	P3	+	+	+	+	+	-	f	<i>E. faecalis</i>
216	QD60	L3	P2	+	-	+	-	+	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
217	QD60	L3	P2	+	-	+	-	+	-	f	<i>E. faecium</i>
218	QD60	L3	P4	+	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
219	QD40	L3	P3	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
220	QD40	L3	P3	+	-	+	-	+	f	+	<i>E. faecium</i>
221	QD90	L1	P2	+	-	+	-	+	-	-	<i>Enterococcus sp</i>
222	QD90	L1	P2	+	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
223	QD90	L1	P4	+	-	+	-	+	f	-	<i>Enterococcus sp</i>
224	QD40	L2	P4	+	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
225	QD40	L3	P4	+	-	+	-	+	-	-	<i>Enterococcus sp</i>
226	QD90	L2	P4	+	-	+	-	+	-	-	<i>Enterococcus sp</i>
230	QD90	L3	P2	+	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
234	MC	L2	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
257	MC	L3	P3	+	-	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus sp</i>
259	MC	L3	P3	+	-	+	-	+	f	f	<i>E. faecium</i>
260	MC	L1	P3	+	-	+	-	+	f	f	<i>Enterococcus sp</i>
261	MS	L1	P3	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
271	MS	L1	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
272	MS	L3	P3	+	-	+	-	+	f	+	<i>Enterococcus sp</i>
273	MS	L3	P3	+	-	+	-	+	f	+	<i>E. faecium</i>
274	MS	L1	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>
276	MS	L2	P2	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>

continuação ANEXO III.

PERFIL TECNOLÓGICO											
litmus milk											
isolado	origem		redução do tornasol	formação de coágulo	acidificação do meio pela fermentação da lactose	peptonização com clarificação do meio	produção de diacetil (Barritt)	proteólise (PCA 1%Skim Milk)	utilização de citrato (T-JAC)	lipólise (Spirit Blue Agar)	espécie
309	S	L1 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
312	S	L2 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
313	S	L2 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
315	S	L3 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
411	QD40	L2 P4	+	-	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
425	QD20	L1 P4	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
426	QD20	L1 P4	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>Enterococcus sp</i>
427	QD40	L1 P4	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
428	QD40	L1 P4	+	-	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
429	QD60	L1 P4	+	-	+	-	+	-	-	+	<i>E. faecium</i>
469	QD90	L2 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
470	QD90	L2 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
481	QD90	L3 P4	+	-	+	-	+	f	+	-	<i>E. faecium</i>
495	QD90	L3 P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
507	QD40	L1 P3	+	-	+	-	+	f	-	-	<i>E. faecium</i>
527	LP24h	- P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
528	LP24h	- P2	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
531	LP24h	- P3	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
532	LP24h	- P3	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
536	LP24h	- P4	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>
537	LP24h	- P4	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. faecium</i>