



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Caracterização da microbiota de queijos artesanais
provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura
iniciadora natural utilizada em sua produção.**

William Ricardo Isidorio

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Christian Hoffmann



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Caracterização da microbiota de queijos artesanais
provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura
iniciadora natural utilizada em sua produção.**

William Ricardo Isidorio

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Christian Hoffmann

William Ricardo Isidório

**Caracterização da microbiota de queijos artesanais
provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura
iniciadora natural utilizada em sua produção.**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Christian Hoffmann
Orientador/Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

I81c	Isidorio, William Ricardo Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção / William Ricardo Isidorio. - São Paulo, 2019. 80 p. + apêndices Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Hoffmann, Christian 1. Queijo. 2. Serra da Canastra. 3. microbiota. 4. sequenciamento 16S rDNA. 5. sequenciamento ITS. I. T. II. Hoffmann, Christian, orientador.
------	--

RESUMO

ISIDORIO, W. R. **Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção.** 2019. 79p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O queijo Canastra possui grande importância na cultura e economia local, é parte do Patrimônio Imaterial do Brasil (IPHAN, 2014) e recebeu o selo de produto com designação de origem em 2012 (INPI, 2016). Sua produção utiliza leite, sal, coalho e uma cultura iniciadora natural, chamada popularmente de “pingo”.

Esse estudo visou a caracterização da microbiota presente no queijo maturado da Serra da Canastra e no pingo utilizado em sua produção utilizando técnicas avançadas de sequenciamento em larga escala para identificação das bactérias e fungos ali presentes. Nossos dados da microbiota bacteriana foram comparados com dados da microbiota de outros queijos brasileiros e do mundo disponíveis na literatura.

As principais bactérias encontradas em amostras de pingo pertencem aos gêneros *Lactococcus* (45.6%), *Streptococcus* (30.3%), *Staphylococcus* (5.1%), e em amostras de queijo aos gêneros *Lactococcus* (22.5%), *Streptococcus* (27.2%), *Corynebacterium* (18.8%), *Staphylococcus* (13.6%), *Leuconostoc* (6.3%) e *Weissella* (6%). Os principais gêneros de fungos encontrados nos queijos foram *Debaryomyces* (78.6%), *Trichosporon* (7.8%).

Nosso estudo foi capaz de separar a microbiota dos queijos produzidos na Serra da Canastra de outros queijos na Europa e América do Norte, sendo o pH um possível fator de segregação. Também foi observada uma diferença entre a microbiota do queijo Canastra com outros queijos Brasileiros. Além disso, visualizamos que a distância geográfica entre produtores e a sazonalidade possuem um efeito sobre a microbiota dos pingos e queijos.

A partir da análise de todos os microrganismos encontrados na microbiota bacteriana, foram detectados táxons que discriminam produtores por suas aplicações de boas práticas de fabricação e por sua infraestrutura. Observamos proporções menores de um táxon de *Kocuria Kristinae* nos pingos e um de *Streptococcus* nos queijos e proporções maiores de um táxon de *Staphylococcus* nos queijos. Também pudemos observar uma diminuição nas proporções de táxons de *Debaryomyces* e aumento na proporção de táxons de *Trichosporon* na composição fúngica dos queijos, possivelmente devido a transição sazonal do período seco para o chuvoso.

Usando técnicas moleculares de sequenciamento em larga escala, demonstramos que há uma diferença na microbiota presente em diferentes áreas da Serra da Canastra, um possível efeito da sazonalidade na composição fúngica e bacteriana. E evidenciamos que táxons de *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Kocuria* estão correlacionados às boas práticas de produção e elucidamos a conexão existente entre a microbiota do pingo e a do queijo. Estes resultados podem influenciar o desenvolvimento de métodos de rastreamento de sub-regiões específicas da Canastra e auxiliar os produtores na produção de queijos de boa qualidade, mantendo as características específicas de sua região.

Palavras-chave: Queijo; Serra da Canastra; microbiota; 16S *rDNA*; *ITS*.

ABSTRACT

ISIDORIO, W. R. **Microbiota characterization of artisanal cheeses from Serra da Canastra - MG and their endogenous starter culture.** 2019. 79p. Thesis (MS) - School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

The Canastra cheese has great importance for the local culture and economy, being part of the Intangible Heritage of Brazil (IPHAN, 2014). It has received the protected designation of origin certification in 2012 (INPI, 2016). It's made using milk, salt, rennet and an endogenous starter culture, popularly called as "pingo".

This study aimed to characterize the microbiota present in the Serra da Canastra's cheese and the pingo used in its production. In order to conduct this research we used next generation sequencing to identify the bacteria and fungi present there. Our bacterial microbiota dataset was compared with microbiota datasets from other Brazilian and world cheeses available in the literature.

The main bacteria found were *Lactococcus* (45.6%), *Streptococcus* (30.3%) and *Staphylococcus* (5.1%) in the endogenous starter samples and *Lactococcus* (22.5%), *Streptococcus* (27.2%), *Corynebacterium* (18.8 %), *Staphylococcus* (13.6%), *Leuconostoc* (6.3%) and *Weissella* (6%) in cheese samples. The main fungi found in the cheeses were *Debaryomyces* (78.6%) and *Trichosporon* (7.8%).

We were able to separate the microbiota from Serra da Canastra cheeses and other cheeses in Europe and North America, being the pH a possible segregation factor. Furthermore, a difference was also observed between the microbiota of Canastra and other Brazilian cheeses. In addition, we observed that the geographical distance between producers and the seasonality could be affecting the pingos and cheeses' microbiota.

We found bacterial taxa that could discriminate producers by their good manufacturing practices and their local infrastructure. Low levels of good manufacturing practices (GMPs) were assigned to bigger proportions of a *Kocuria Kristinae* taxon in the pingos and a *Staphylococcus* taxon in the cheeses. Also, higher levels of GMPs were assigned to smaller proportions of *Streptococcus* taxons in the cheeses. Furthermore We could observe a decrease of *Debaryomyces* and an increase of *Trichosporon* proportions in the fungal composition of cheeses. This could be due to a climate transition: from the dry season to the rainy season.

Using large-scale sampling coupled with molecular sequencing techniques, we observe a connection between pingo and cheeses' microbiota. We show that the microbiota of different areas in Serra da Canastra is different, also, there is a possible effect of seasonality on fungal and bacterial composition. Furthermore, we could see that *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Kocuria* taxons are correlated with good practices. These results may influence the development of tracking methods for specific Canastra subregions and assist producers to manufacture good quality cheeses while maintaining the specific characteristics of their region.

Keywords: cheese; Serra da Canastra; microbiota; 16S rDNA sequencing; ITS sequencing.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa e filha por estarem presentes nessa jornada, tornando meus dias mais felizes.

Ingrid Pires Isidorio

Evellyn Eloá Isidorio

Agradeço aos meus pais e minha irmã por sempre me apoiarem.

Gilberto Isidorio

Maria Aparecida Maximiano Isidorio

Marina Carla Isidorio

Agradeço ao meu orientador por sua presença marcante, tanto pessoal quanto profissional.

Christian Hoffmann

Também deixo meus agradecimentos a todos meus colegas de laboratório, pela companhia e por sempre compartilharem seu conhecimento.

Muito obrigado!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 PRODUÇÃO DE QUEIJO NO ESTADO DE MINAS GERAIS	5
2.2 O QUEIJO CANASTRA	7
2.2.1 MÉTODO DE PRODUÇÃO	7
2.3 MICROBIOTA DE QUEIJOS ARTESANAIS	9
2.3.1 BACTÉRIAS	11
2.3.2 FUNGOS	12
2.4 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA	13
3. JUSTIFICATIVA	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GERAL	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MÉTODOS	17
5.1 COLETA DAS AMOSTRAS	17
5.2 COLETA DE DADOS	19
5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	19
5.4 EXTRAÇÃO DO DNA	20
5.5 SEQUENCIAMENTO DE AMPLICONS	20
5.6 ANÁLISE DOS DADOS DOS SEQUENCIAMENTOS	21
5.7 ANÁLISE DOS DADOS EM CONJUNTO COM QUEIJOS NO MUNDO	23
5.8 ANÁLISE DOS DADOS EM CONJUNTO OUTROS QUEIJOS BRASILEIROS	23
5.9 PONTUAÇÕES PARA BOAS PRÁTICAS DE PRODUÇÃO E INFRAESTRUTURA LOCAL	24
5.10 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS NOS PINGOS E QUEIJOS	25
5.11 GRÁFICOS DE PIZZA EM SUAS LOCALIDADES GEOGRÁFICAS	25

5.12	CORRELAÇÕES	26
5.13	ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS (PCOA) E PERMANOVA	26
5.14	BOXPLOTS DAS PROPORÇÕES DE DETERMINADOS MICRORGANISMOS	27
5.15	OUTRAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS E VISUALIZAÇÕES GRÁFICAS	27
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
6.1	COLETA DE AMOSTRAS E SEQUENCIAMENTO DO RDNA 16S E ITS FÚNGICO	28
6.2	PRINCIPAIS MICRORGANISMOS NOS PINGOS E QUEIJOS DA SERRA DA CANASTRA	28
6.3	A MICROBIOTA DO QUEIJO É MODELADA PELA MICROBIOTA DO PINGO	35
6.4	A MICROBIOTA DOS QUEIJOS DA SERRA DA CANASTRA É INFLUENCIADA POR FATORES LOCAIS	36
6.5	CO-VARIÁVEIS ANALISADAS QUE PODEM INFLUENCIAR A MICROBIOTA DOS PINGOS E DOS QUEIJOS	40
6.6	CORRELAÇÕES ENTRE TÁXONS ENCONTRADOS NO PINGO E NO QUEIJO	45
6.7	MARCADORES DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO	52
6.8	INFLUÊNCIA SAZONAL SOBRE A MICROBIOTA DOS PINGOS E QUEIJOS	56
6.9	OS QUEIJOS CANASTRA POSSUEM UMA MICROBIOTA DIVERSA QUE DIFERE DE OUTROS QUEIJOS DO BRASIL E DO MUNDO	62
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9.	APÊNDICES	81
	APÊNDICE I: Tabela mostrando a quantidade de sequências obtidas no sequenciamento 16S após filtragem por DADA2.	81
	APÊNDICE II: Tabela mostrando a quantidade de sequências obtidas no sequenciamento ITS após filtragem por DADA2.	86
	APÊNDICE III: Modelo de Questionário utilizado para obtenção de dados com os produtores.....	89
	APÊNDICE IV: Tabela com o resumo dos resultados dos questionários realizados com os produtores.....	92

APÊNDICE V: Dados obtidos através dos questionários realizados com os produtores. .	95
APÊNDICE VI: Dados referentes as amostras de pingos obtidas.....	111
APÊNDICE VII: Dados referentes as amostras de queijos obtidas.	117

1. INTRODUÇÃO

O queijo produzido na região da Serra da Canastra, conhecido como queijo Canastra, é um dos queijos de produção artesanal mais conhecidos e apreciados no Brasil (LIMA; DOULA, 2012). Devido à sua grande importância para a região e já fazendo parte da cultura mineira, esse famoso queijo atingiu o “status” de Patrimônio Imaterial Brasileiro em 2002, com reconhecimento pelo IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico Nacional) (LIMA; DOULA, 2012).

A região da Serra da Canastra é a mais conhecida dentre as regiões produtoras de queijos artesanais do estado, sua produção total chega a atingir cerca de 4470 toneladas por ano, sendo a principal fonte de renda para grande parte da população da região. Nela, são incorporados 8 municípios: Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São João Batista do Glória, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita (IMA, 2016). O município de Medeiros concentra o maior percentual da população na zona rural, e contém o segundo maior número de produtores (aproximadamente 430) com a maior produção de queijo anual (1600 toneladas) (EMATER, 2004).

A fabricação do queijo Canastra é um processo que ocorre diariamente nas propriedades rurais de cada um dos fabricantes da região. Consiste da adição de coalho e “pingo” ao leite cru, seguido por processos de manipulação da massa formada e maturação do queijo por bactérias presentes naturalmente naquele meio. O “pingo” é o soro do queijo coletado durante o processo de produção do dia anterior, o seu uso é feito devido à presença de culturas iniciadoras naturais (bactérias ácido-lácticas iniciadoras, BALI) que agregam ao sabor e textura final do queijo. Possui, em sua composição, uma comunidade microbiana variável e desconhecida, sendo comum o seu uso em queijos artesanais feitos a partir do leite cru. Ainda, o uso do pingo é parte do processo de fabricação de vários queijos de origem comprovada amplamente encontrados na Europa, como o Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Provolone Valpadana, Pecorino Romano, Comté, Gruyere, entre outros (DE FILIPPIS *et al.*, 2014; GARABAL, 2007; GATTI *et al.*, 2014).

Produtos com denominação de origem protegida são aqueles em que todas as etapas de fabricação, incluindo a obtenção da matéria prima, são originários da região de origem do produto. Na Europa, esses produtos recebem um

logo para identificação, sendo identificados como “*Protected Designation of origin*” (PDO) (COMISSÃO EUROPÉIA, 2017a). Há um total de 188 variedades de queijos artesanais com denominação de origem protegida na Europa e Reino Unido (COMISSÃO EUROPÉIA, 2017b). No Brasil, existem 3 queijos com indicações de procedência (registro semelhante ao PDO europeu), o queijo Minas Artesanal do Serro, o Queijo Canastra e o Queijo da colônia Witmarsum – Santa Catarina (INPI, 2016). Todos esses queijos se destacam devido à sua rica diversidade microbiana e cada um deles pode ser considerado como um ecossistema único (GARABAL, 2007).

Essa rica e diversa microbiota presente nesses queijos é ocasionada devido a vários fatores no processo de produção, podendo ser proveniente de várias fontes, como do leite cru, do processo de ordenha, do ambiente de processamento e da manipulação humana. As culturas iniciadoras empregadas no processo, como o pingo, também são uma fonte de microrganismos para esses queijos e são consideradas indefinidas, pois não se sabe exatamente quais microrganismos compõem esse subproduto da fabricação do queijo. Ainda assim, elas podem ser variáveis, dependendo da sazonalidade e da região de produção do queijo (NÓBREGA, JULIANA E. *et al.*, 2008a, b).

Nosso estudo visou determinar a diversidade bacteriana presente no pingo e no queijo, assim como a diversidade fúngica no queijo. Para isso, foram utilizadas técnicas avançadas de sequenciamento em larga escala em conjunto com ferramentas de bioinformática e estatística para análise dos dados. Para que fosse possível estabelecer fortes correlações entre os produtores e a microbiota de seus pingos e queijos, também coletamos dados da temperatura durante a maturação, características da infraestrutura do produtor, características de boas práticas de produção e coordenadas geográficas.

Para a análise dos dados brutos do sequenciamento foi utilizada a plataforma QIIME 2 (BOLYEN *et al.*, 2018) e o controle de qualidade de sequências DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016). O sequenciamento da região V4 do amplicon 16S gerou 6.526.167 sequências válidas. Encontramos 931 variantes de sequências de amplicons (*Amplicon Sequence Variants* - ASVs) distintas distribuídas em 283 taxonomias distintas, referentes às bactérias presentes nos pingos e 893 ASVs distintas distribuídas em 204 taxonomias distintas nos queijos. O sequenciamento do

amplicon ITS gerou 349.983 sequências válidas, das quais foram assinaladas 1248 ASVs distintas distribuídas em 25 diferentes taxonomias.

Foi possível identificarmos a presença de grandes proporções dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* distribuídas na amostras de pingo e *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Weissella* nas amostras de queijo. Esses mesmos gêneros foram encontrados também em queijos Canastra e outros queijos Brasileiros (KAMIMURA *et al.*, 2019; PERIN *et al.*, 2017; SANT'ANNA *et al.*, 2019).

Também foram analisadas as relações existentes entre as bactérias nos pingos e queijos, as relações entre bactérias e fungos somente nos queijos e a relação de determinados microrganismos com as boas práticas de fabricação do produtor e infraestrutura da queijaria. Isso nos permitiu observar que produtores que aplicavam boas práticas de fabricação tiveram proporções menores de *Kocuria Kristinae* (ASV 16) nos pingos, *Streptococcus* (ASV 14) nos queijos e proporções maiores de *Staphylococcus* (ASV 56) nos queijos. Além disso, foi possível observar uma maior proporção do fungo *Trichosporon coremiiforme* (ASVs 7f e 23f) em produtores com boas práticas de produção.

Observamos uma possível relação temporal existente em nossa amostragem durante o período de julho de 2017 a abril de 2018. Ocorreu diminuição da proporção de alguns táxons de *Debaryomyces* e aumento de *Trichosporon* na composição fúngica dos queijos. Possivelmente isto ocorreu devido a transição sazonal do período seco para o chuvoso. Também foram detectadas alterações nas proporções de alguns táxons de *Streptococcus* em pingos e táxons de *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* em queijos.

Por fim, foram observadas diferenças entre a microbiota dos queijos amostrados e a microbiota de queijos de outros estudos no Brasil (KAMIMURA *et al.*, 2019) e na América do Norte e Europa (WOLFE *et al.*, 2014). Também foram observadas as diferenças existentes entre a microbiota dos queijos Canastra amostrados. Isso nos permitiu identificar que a microbiota bacteriana do pingo de produtores mais distantes são mais diferentes ($p = 0.003$, $r = 0.31$). O mesmo ocorreu para a microbiota fúngica do queijo ($p = 0.024$, $r = 0.24$). Entretanto, não observamos esse resultado para a microbiota bacteriana dos queijos ($p = 0.084$, $r = 0.21$). Esse resultado comprova discussões já levantadas sobre a influência

geográfica e condições de produção de cada queijaria na microbiota dos queijos produzidos (PERIN *et al.*, 2017).

Estes resultados podem influenciar o desenvolvimento de métodos de rastreamento de sub-regiões específicas da Canastra e auxiliar os produtores na produção de queijos de boa qualidade, mantendo as características específicas de sua região.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de queijo no estado de Minas Gerais

Minas Gerais é um estado localizado na região sudeste do Brasil. Muito conhecido pelo seu queijo produzido de forma artesanal, o estado é o maior produtor de queijos do Brasil, alcançando uma produção anual de 29 toneladas, empregando cerca de 26.792 pessoas (EMATER, 2004). Apesar da produção de queijo ocorrer por todo o estado, existem 7 microrregiões principais onde o queijo tem sua identidade de origem: Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra da Canastra e Serro, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro (Figura 1).



Figura 1 – Microrregiões produtoras de queijo Minas Artesanal. Fonte: <https://portaldoqueijo.com.br/sobre-queijos/queijos-artesanais/>.

O início da produção de queijos na região ocorreu entre os séculos 17 e 18, sendo empregada principalmente para o aproveitamento e conservação do leite nos sítios e fazendas da região, especialmente onde a distribuição é dificultada devido a péssimas condições das estradas como nas regiões serranas. A receita básica foi herdada dos portugueses que colonizaram a região (leite cru, coalho e sal), à qual os mineiros acrescentaram o “pingo”, um fermento natural obtido do soro drenado do

próprio queijo. A inclusão do pingo no modo de produção do queijo conferiu ao queijo características microbiológicas específicas da região, caracterizadas pelas condições climáticas e geográficas (IPHAN, 2014).

Apesar de sua forte presença na cultura e economia da região, esse importante queijo já teve sua produção proibida pelo Ministério Público Federal devido a várias denúncias de contaminação do leite cru. Tal medida exigiu sua retirada do mercado, a não ser que se enquadrassem nos padrões oficiais estabelecidos pela legislação sanitária em vigor, com base no decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 (IPHAN, 2014). Diante disso, produtores de queijo do Serro e de outras regiões, organizações da sociedade civil, instituições do poder público e da iniciativa privada de Minas Gerais se moveram para defender a continuidade da produção e consumo de Queijo Minas artesanal. Como resultado, foi aprovada a Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal. Logo após, surgiram várias portarias e decretos do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), regulamentando o processo de produção, medidas sanitárias, cuidados com os animais e credenciamento dos produtores que se adequem a essas novas legislações (IPHAN, 2014). Destaca-se ainda, o registro do queijo Artesanal do Serro como Patrimônio Cultural Imaterial de Minas Gerais, em 7 de agosto de 2002, e a inclusão do Modo de Fazer do Queijo Artesanal de Minas Gerais no livro dos saberes pelo IPHAN como um patrimônio imaterial do Brasil, em 15 de maio de 2008 (IPHAN, 2014). Pesquisas e legislações sobre o processo de produção desse queijo não pararam de surgir, como o decreto nº 44.864, de 1º de agosto de 2008 (MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2008), que regulamenta o processo de produção do queijo minas artesanal, e pesquisas com o intuito de caracterizar o queijo minas artesanal e identificar quais fatores o tornam peculiares (BEMFEITO, 2016). Atualmente, foi aprovado o Projeto de Lei 3859/15, em Março de 2018, uma atualização da Lei nº 1.283 de 1950 (DE MELO, 2015). Esse projeto prevê regras simplificadas para a inspeção industrial e sanitária de pequenas agroindústrias artesanais de origem animal e propõe a liberação do comércio interestadual de seus produtos, através da premissa de que a fiscalização por órgãos estaduais ou municipais seja equivalente à federal.

2.2 O Queijo Canastra

O queijo canastra é produzido na região da Serra da Canastra - MG que compreende os municípios de Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e São João Batista do Glória, os quais totalizam uma área de aproximadamente 8005 Km² contendo, em 2004, 1529 produtores com uma produção total de 4470 toneladas por ano (Figura 2) (EMATER, 2004).



Figura 2 - Mapa dos municípios produtores de Queijo Minas Artesanal na região da Serra da Canastra.

Disponível em: <https://www.targetmap.com/viewer.aspx?reportId=61768>

2.2.1 Método de produção

A produção do Queijo Canastra é feita com a utilização do leite cru, de um soro de leite rico em bactérias chamado “pingo”, coalho (enzima quimosina obtida do estômago de bezerros utilizada para coagulação do leite), sal e um processo de prensagem manual.

O método de produção começa pela ordenha para a obtenção do leite, que é filtrado para separação de contaminantes do local da ordenha e levado para a queijaria. Em seguida, ocorre a adição do pingo (cultura iniciadora natural) e coalho no leite ainda morno. Após a coagulação do leite (cerca de 1 hora), ocorre o corte e a mexedura da massa seguida de sua prensagem e enformagem utilizando tecidos próprios para a produção de queijo. Todo o processo de prensagem e enformagem do queijo é feito sobre uma superfície com uma leve inclinação, o qual direciona o escorrimento do soro do leite para um recipiente de coleta, esse soro de leite poderá ser utilizado para produção de algum subproduto ou descarte. A primeira salga é realizada logo após a enformagem e a segunda salga é feita cerca de 6 horas após a primeira. A partir da segunda salga, dá-se início a coleta do soro de leite que escorre do queijo de forma natural; a coleta é feita por 12 horas e, após esse período, o queijo é transferido para a tábua de maturação. O soro obtido após a segunda salga é armazenado para utilização na produção do dia seguinte dando origem ao soro-fermento chamado “pingo” pelos produtores locais. O queijo permanece na tábua de maturação por mais 21 dias até a obtenção do queijo maturado de 22 dias e sua liberação para comercialização (Figura 3) (IPHAN, 2014).

Sua produção segue uma linha de baixa escala na propriedade de residência do produtor e, como não há uma padronização no modo produção, cada produtor aprimora seu próprio método, com diferentes quantidades de pingo, coalho e sal adicionados, aplicando diferentes modos de prensagem manual. Essas diferenças fazem com que os queijos artesanais de uma mesma região tenham diferenças marcantes.

Outro fator importante e característico do queijo de cada região é o pingo utilizado. Ele é obtido pela coleta do soro fermentado no processo de dessoramento do queijo do dia anterior. Ele é responsável por carregar grande parte das bactérias utilizadas na produção anterior para a produção atual, transferindo populações de microrganismos entre as produções. Microrganismos presentes em várias fontes no processo de produção podem estar presentes nesse soro - microrganismos do leite, da mão do ordenhador ou da pessoa que fará a prensagem, do ambiente e até da vegetação local presente no local da ordenha. Esses microrganismos são os responsáveis pelos processos fermentativos que ocorrem na maturação do queijo, aprimorando suas características sensoriais (NÓBREGA, JULIANA E. *et al.*, 2008a).

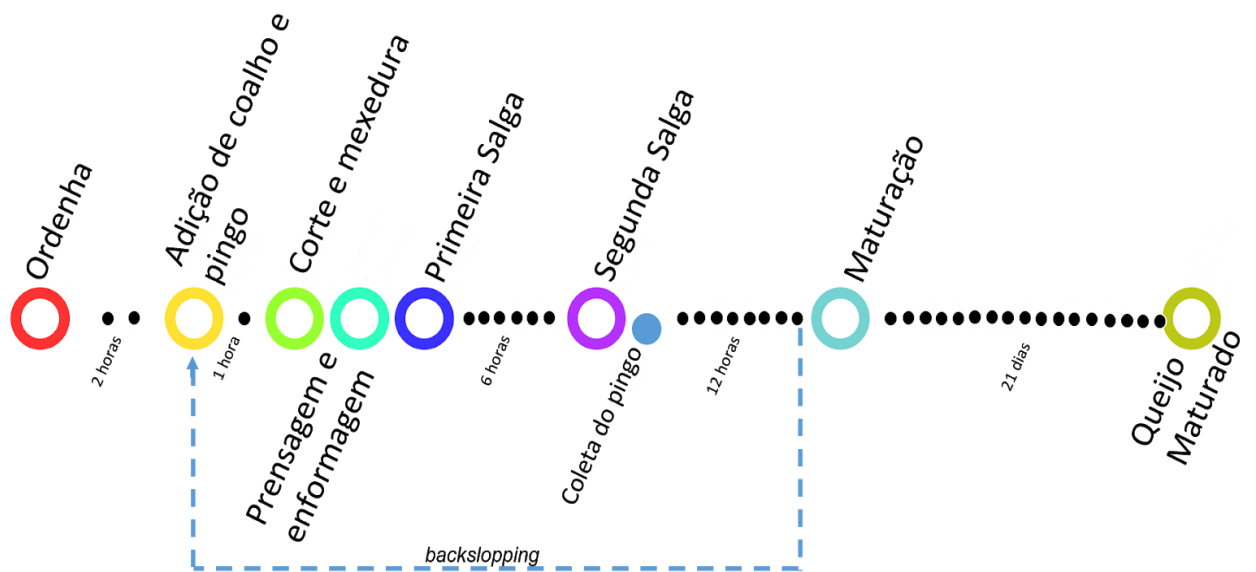


Figura 3 – Etapas do processo de produção do queijo Canastra. Fonte: IPHAN, 2014 (ADAPTADO).

2.3 Microbiota de queijos artesanais

Anteriormente ao aparecimento das plantas e dos primeiros animais, os microrganismos já eram parte fundamental do ecossistema do planeta Terra. Estes microrganismos começaram a viver juntamente com outros no ecossistema terrestre, formando comunidades microbianas e estas podem afetar consideravelmente o ambiente em que vivem. Conseqüentemente, alteram as propriedades químicas e físicas desse ambiente devido à complexas alterações de metabólitos que ocorrem com a presença de cada população de microrganismos (MADIGAN *et al.*, 2014; MCSWEENEY, 2004).

A microbiota é definida como a comunidade microbiana (conjunto de populações) de determinado “habitat” (WHITESIDE *et al.*, 2015). Em queijos, a microbiota é formada principalmente por bactérias ácido-lácticas iniciadoras (BALI) e

não iniciadoras (BALNI) que podem ser originadas do leite cru, do ambiente ou inoculadas pelo produtor. Tais microrganismos modificam a composição físico-química inicial do leite coalhado, transformando a coalhada em queijo propriamente dito (MCSWEENEY, 2004).

Devido à sua importância no mercado, surgiram pesquisas procurando caracterizar a diversidade da microbiota de diversos queijos. As BALNI são conhecidas por serem responsáveis pela acidificação inicial do queijo, transformando lactose em ácido láctico e auxiliando na construção de um ambiente ideal para o desenvolvimento das BALNI. Já as BALNI são conhecidas pelo desenvolvimento de características sensoriais do queijo na etapa de maturação (LICITRA; CARPINO, 2014).

As comunidades de BALNI em queijos são formadas principalmente por lactobacilos mesófilos (desenvolvem-se em condições de temperatura moderada com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C), como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* e ainda, podendo apresentar espécies de *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococci* e *Streptococci* (BERESFORD *et al.*, 2001; CALLON; MILLET; MONTEL, 2004). Esses microrganismos são importantes na produção de queijos por estarem envolvidos na fermentação do citrato, assim como proteólise e outros processos enzimáticos que ocorrem durante a fabricação do queijo (CROW; CURRY; HAYES, 2001). Como exemplo, os queijos de origem italiana (Caciocavallo Podolico, Ragusano, Castelmagno, Fiore Sardo, entre outros) são compostos por diferentes microbiotas. Porém os principais microrganismos presentes no produto final são lactobacilos (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*), lactococos (*Lactococcus lactis*), entre outras espécies do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus* termofílicos ou mesófilos (LICITRA; CARPINO, 2014). Além disso, estão presentes microrganismos do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foram encontrados em queijos Castelmagno com alta frequência, indicando uma baixa higiene durante os processos de ordenha e armazenagem. Entretanto, esses microrganismos também podem estar relacionados com a intensa atividade lipolítica observada nesses queijos (LICITRA; CARPINO, 2014).

Uma comparação entre a microbiota bacteriana de queijos italianos, belgas, camulcos e cazaquistaneses foi capaz de identificar os queijos de origens diferentes, mostrando a possibilidade do uso da microbiota de um queijo como um *fingerprint* para sua origem (LI *et al.*, 2017).

Na América Latina, queijos são uma parte integral da alimentação, e queijos tradicionalmente produzidos nestas regiões são frescos ou com pouco tempo de maturação. Estes queijos denominados “queijos frescos” são produzidos com leite pasteurizado e têm uma vida de prateleira mais curta, de cerca de 2 semanas. Sua microbiota é diferente, menos diversa em comparação aos queijos feitos a partir de leite cru, sendo encontradas bactérias do gênero *Clostridiaceae*, *Exiguobacterium* e *Lactococcus* (LUSK *et al.*, 2012).

O queijo Canastra é um queijo consumido com pouco tempo de maturação (22 dias). Alguns estudos já foram realizados, identificando as espécies *Lactobacillus. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. paraplantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Enterococcus spp.* e *Lactococcus spp.* utilizando um método de análise de restrição do DNA ribossomal (ARDRA) 16S-23S em microrganismos isolados (RESENDE *et al.*, 2011). Outro estudo identificou *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis* e *Enterococcus faecalis* pela comparação de perfis de qPCR de amplicons da região V1-V2 do 16S rDNA (LH-PCR) com perfis de isolados já identificados (PERIN *et al.*, 2017).

Porém, ainda não foi encontrado na literatura um estudo utilizando o sequenciamento 16S sobre essa microbiota total em queijos e pingos.

2.3.1 Bactérias

A microbiota de queijos artesanais é um dos principais fatores que determina as características físico-químicas do queijo, sendo diretamente relacionada com o sabor do queijo, sua textura e seu aroma. Outros fatores, como o tipo de leite utilizado, cru ou pasteurizado, o pH, a salinidade e fatores ambientais como o teor de umidade e a altitude também influenciam na comunidade de bactérias ácido lácticas (BAL) encontradas no queijo (BUTTON; DUTTON, 2012; RESENDE *et al.*, 2011). Estas covariáveis físico-químicas do ambiente do queijo (pH, salinidade e umidade) selecionam e modulam a comunidade de microrganismos no queijo,

concedendo características naturalmente atribuídas à localização geográfica (WOLFE; DUTTON, 2015).

Em pesquisa sobre o queijo canastra, foi comprovado que existem diferenças no fermento endógeno (pingo) utilizado em diferentes estações do ano (por exemplo: períodos secos *versus* períodos chuvosos). Essas diferenças no pH, acidez titulável e salinidade provocam uma mudança na microbiota do fermento endógeno e foi verificado no estudo que o aumento da salinidade no período das águas concomitou em uma diminuição na comunidade de mesófilos (NÓBREGA, JULIANA E. *et al.*, 2008a).

Outra pesquisa com queijos estilo latinos frescos utilizou 3 diferentes marcas de queijo de aparência semelhante. Foi constatada que sua microbiota era distinta para cada um deles, sendo os principais gêneros encontrados: *Clostridiaceae*, *Exiguobacterium* e *Lactococcus* (LUSK *et al.*, 2012). Em outro trabalho utilizando queijos Cotija (México), os principais gêneros encontrados foram *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus*. Esses fatos evidenciam a grande diversidade da comunidade microbiana que pode ocorrer em diferentes tipos de queijos (ESCOBAR-ZEPEDA; SANCHEZ-FLORES; QUIRASCO BARUCH, 2016).

2.3.2 Fungos

Além das bactérias, fungos também são fundamentais para a fabricação de queijos, sendo os principais responsáveis pela formação do biofilme em sua superfície. As complexas interações formadas nesse biofilme possibilitam a formação de crostas com características diferentes, geralmente denominadas crostas moles, semi duras ou duras (BUTTON; DUTTON, 2012).

Apesar da maior facilidade de encontrar fungos nessas crostas, fungos também são encontrados em seu interior e, comumente, ocorre a inoculação proposital deles em seu interior. Essa inoculação proposital é feita para se obter características peculiares no queijo, gerando sabor, textura e cores diferenciadas. Por exemplo, a inoculação do fungo filamentosso *Penicillium candidum* na superfície de queijos Camembert para que a superfície do queijo tenha uma textura mais macia, ou a inoculação de *P. roqueforti* que produz uma coloração azul nos queijos e um sabor e aroma diferente devido ao seu metabolismo (BUTTON; DUTTON, 2012).

2.4 Identificação da microbiota

Projetos que visam identificar e entender as interações existentes dentro de um mesmo microbioma estão sendo conduzidos por todo o mundo nos mais diversos habitats (GILBERT; JANSSON; KNIGHT, 2014). Esses estudos são de grande importância pois pouco se sabe sobre o funcionamento dessas comunidades e seu entendimento e identificação pode gerar grandes inovações com a descoberta de novas enzimas, biomarcadores e processos relevantes para a indústria, meio ambiente e combate a doenças (KNIGHT *et al.*, 2012).

Devido à grande dificuldade de encontrar um meio de cultivo para todos os microrganismos em uma comunidade, atualmente, são utilizadas técnicas de sequenciamento em larga escala para identificação do conjunto de genomas de todos os microrganismos presentes em um determinado habitat, o metagenoma. Esse método mostrou-se mais eficiente para a identificação de microrganismos, e tornando desnecessário o estabelecimento de uma cultura em laboratório. Além do mais, unida a ferramentas de bioinformática, torna possível a identificação de correlações exercidas entre os microrganismos dessa microbiota e variáveis ambientais (WOO *et al.*, 2008).

Técnicas de sequenciamento como Next Generation Sequencing (NGS) estão com o custo cada vez mais baixos. O surgimento das plataformas Illumina MiSeq e HiSeq torna possível a obtenção de imensas quantidades de informação genética em um curto período de tempo. Sua utilização em conjunto com metodologias aplicadas a identificação de microrganismos, como a amplificação por PCR de regiões de genes conservados (e.g. 16S rDNA), torna o estudo de comunidades de microrganismos cada vez mais acessível (CAPORASO *et al.*, 2012; ERCOLINI *et al.*, 2011; ESCOBAR-ZEPEDA; SANCHEZ-FLORES; QUIRASCO BARUCH, 2016; QUIGLEY *et al.*, 2012).

A identificação de bactérias é feita através da análise de uma das regiões da subunidade menor do DNA cromossômico. Essas regiões são conservadas entre microrganismos de mesmo gênero e espécie e variam em microrganismos de gêneros e espécies diferentes (WOO *et al.*, 2008).

Um estudo grande visando identificar o microbioma de diversas regiões do planeta vem sendo conduzido através da colaboração entre mais de 500

pesquisadores (GILBERT; JANSSON; KNIGHT, 2014). Nele, a identificação de microrganismos procariotos (archaea e bactérias) é realizada através do sequenciamento, em plataforma Illumina, da amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando “primers” que tem como alvo somente a região V4 da subunidade ribossomal menor 16S do rRNA (16S SSU rRNA). Essa região escolhida foi utilizada por ser uma das regiões conservadas entre organismos de mesma espécie (GILBERT; JANSSON; KNIGHT, 2014).

Em queijos, já foram encontrados estudos da microbiota utilizando outras regiões do gene 16S rRNA como a V1-V3 (LUSK *et al.*, 2012), a região espaçadora 16S-23S do rDNA (RESENDE *et al.*, 2011) e da região V1-V4 do rRNA 16S rDNA utilizando “primers” específicos para bactérias (DELCENSERIE *et al.*, 2014). Outras pesquisas em queijos procuram utilizá-lo como um modelo de estudo para monitorar como as comunidades microbianas trabalham o metabolismo de substratos do ambiente, até a formação do ambiente maturo do queijo (WOLFE; DUTTON, 2015).

Logo após o sequenciamento, há a necessidade do uso de ferramentas de bioinformática para a análise da grande quantidade de dados obtidos. Essa análise pode ocorrer de diversas formas, dependendo da natureza do sequenciamento. Para o sequenciamento de amplicons, geralmente isso ocorre primeiramente agrupando as sequências em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), seguido pela identificação taxonômica de microrganismos pela comparação de sequências de DNA com bancos de dados de sequências disponíveis na internet (*eg.* Greengenes, Silva database, RDP). Atualmente, esse agrupamento é feito com sequências idênticas uma a outra (100% de similaridade), após a filtragem dos dados para eliminação de sequências quiméricas e correção de erros de sequenciamento, resultando na seleção de sequências biologicamente relevantes (CALLAHAN *et al.*, 2016). Esses dados são analisados como comunidades microbianas em amostras, através da obtenção de métricas de diversidade alfa e beta, correlações e aplicação de testes estatísticos adequados (LI *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

Os queijos Canastra artesanais são produzidos a partir do uso de leite cru, coalho, pingo e sal. O pingo é o soro do leite coletado durante a produção do dia anterior, sendo utilizado como uma cultura que carrega os microrganismos da produção do dia anterior para a produção do dia seguinte. Devido ao seu modo de obtenção natural, essa cultura iniciadora natural é indefinida, sendo que a comunidade de microrganismos presente nela é adquirida do ambiente e do sistema de produção.

Atualmente existem na literatura pesquisas sobre a microbiota leveduriforme do pingo (NÓBREGA et al., 2008b) e pesquisas sobre a microbiota do queijo (RESENDE et al., 2011; KAMIMURA et al., 2019). Ainda assim, há pouca informação sobre os microrganismos presentes nos pingos e queijos da Serra da Canastra e da importância do uso do pingo no sistema de produção. Logo, nosso estudo têm como principais objetivos a identificação da microbiota dos pingos e queijos da Serra da Canastra e o esclarecimento da relação existente entre a microbiota bacteriana desses pingos e queijos, por meio da obtenção de amostras pareadas.

A caracterização da microbiota dos queijos Canastra pode ajudar na identificação de um perfil de microrganismos presentes nesse produto, resultando em melhores métodos de controle e identificação de origem desse produto. A caracterização da microbiota do pingo permite que sejam identificados os microrganismos que entram no sistema de produção. Paralelamente, a obtenção de amostras pareadas de pingos e queijos possibilita que sejam estabelecidas as relações existentes entre a microbiota do pingo e a microbiota do queijo. Essa relação tem grande importância pois possibilita a identificação do pingo como um possível modelador da microbiota do queijo. Também, através do estudo dessas relações, foi possível identificar as correlações existentes entre microrganismos presentes nos pingos e nos queijos possibilitando a construção de redes de interações entre esses microrganismos.

Essas informações podem ser importantes tanto para a caracterização do Queijo Canastra Artesanal quanto para auxiliar os produtores no processo de produção de seus queijos, além de valorizar a importância do pingo em sua fabricação.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar a microbiota dos queijos artesanais produzidos na Serra da Canastra e do pingo utilizado em sua produção.

4.2 Objetivos Específicos

Nossos objetivos específicos foram:

- Identificar a microbiota dos queijos Canastra;
- Identificar a microbiota dos pingos utilizados na produção dos queijos Canastra;
- Identificar a influência do pingo na produção dos queijos e as possíveis influências que microrganismos presentes na microbiota do pingo possam causar no queijo;
- Verificar a existência de uma segregação geográfica entre os queijos produzidos na Serra da Canastra
- Comparar os queijos Canastra com outros queijos do Brasil e do mundo.

5. MÉTODOS

5.1 Coleta das amostras

Amostras foram coletadas de maneira pareada: o pingo (cultura iniciadora natural) usado na produção de um determinado dia, e o queijo (produto final) resultante daquela produção após 22 dias de maturação (Figura 4), que é o período mínimo de maturação necessária para liberação para o comércio, conforme a legislação vigente (IMA, 2013). Dessa forma, foram obtidas 81 amostras de pingo, 46 de produtores do município de Medeiros-MG e 35 de produtores de São Roque de Minas-MG.

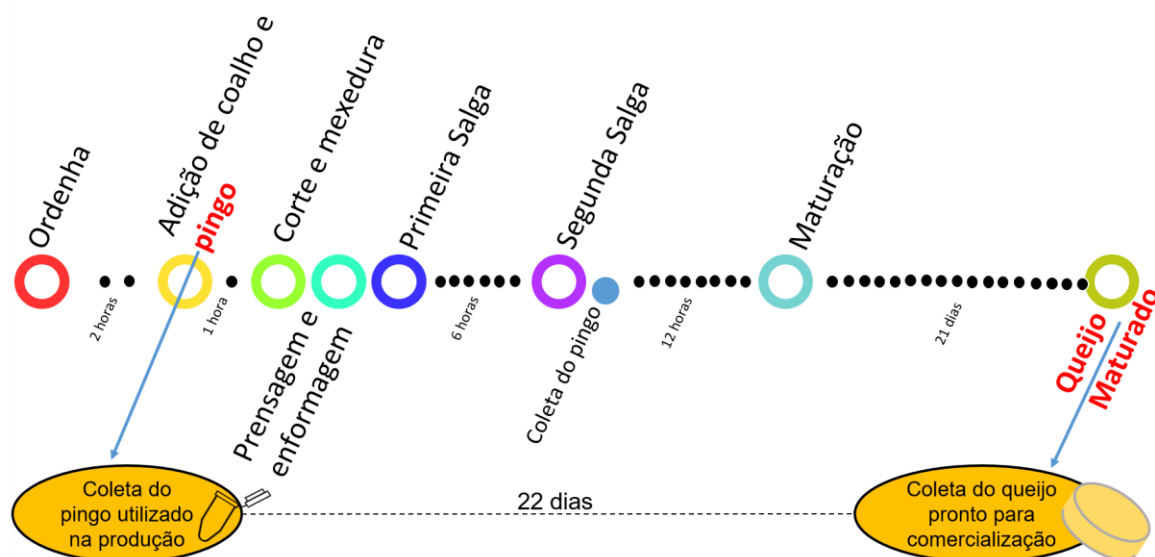


Figura 4 – Amostras coletadas durante o processo de produção. A cor vermelha indica a amostra coletada. Foi coletado primeiramente o pingo no local de produção e, 21 dias depois, foi coletado o queijo produzido com a utilização daquele pingo.

Os queijos produzidos com estes pingos foram coletados de 42 produtores de Medeiros e 34 produtores de São Roque de Minas, totalizando 76 amostras de queijo pareadas com uma amostra do pingo usado em sua produção.

As amostras coletadas foram mantidas em caixas de isopor resfriadas com gelo reutilizável e transportadas na noite do mesmo dia de coleta para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foram processadas e estocadas para análise futura. No recebimento, a remessa sempre chegou com temperaturas entre 4 e 10°C. Aliquotas de 3 mL do pingo foram centrifugadas a

16.000g por 10 minutos (2 centrifugações consecutivas de 1.5 mL), e o pellet obtido foi separado por decantação e congelado a -80°C até serem analisadas (Figura 5).

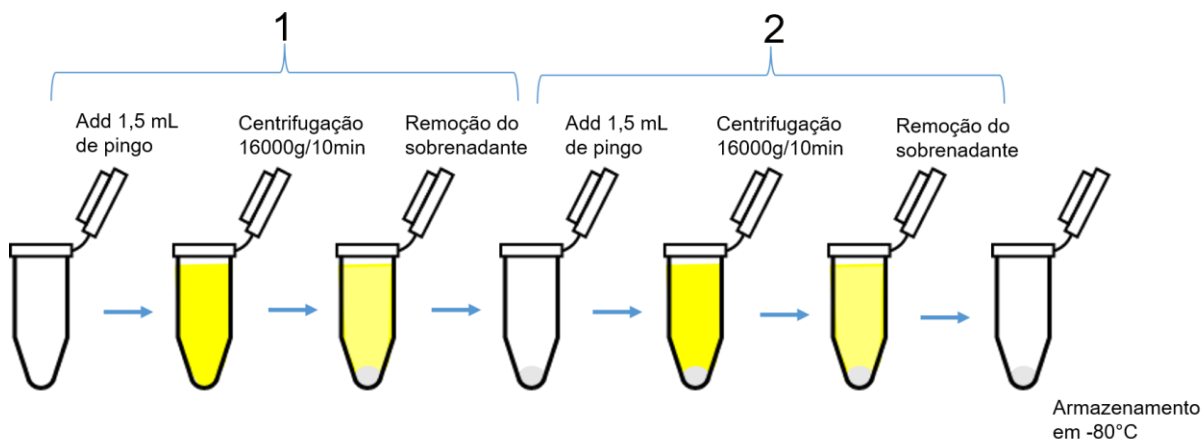


Figura 5 – Processamento das amostras de pingo.

Uma fração da crosta do queijo em uma das faces foi usada para a análise do rDNA 16S. Para tanto, foi cortado com bisturi estéril um pequeno cubo de 0,5 cm de largura, por 1cm de comprimento, por 0.5 cm de profundidade, obtendo uma amostra de aproximadamente 0,25g que foi acomodada em um tubo de 1,5 mL e congelada a -80°C até serem analisadas (Figura 6). Todo o procedimento de aliquotagem e fracionamento foi realizado em uma capela de fluxo laminar devidamente esterilizada.

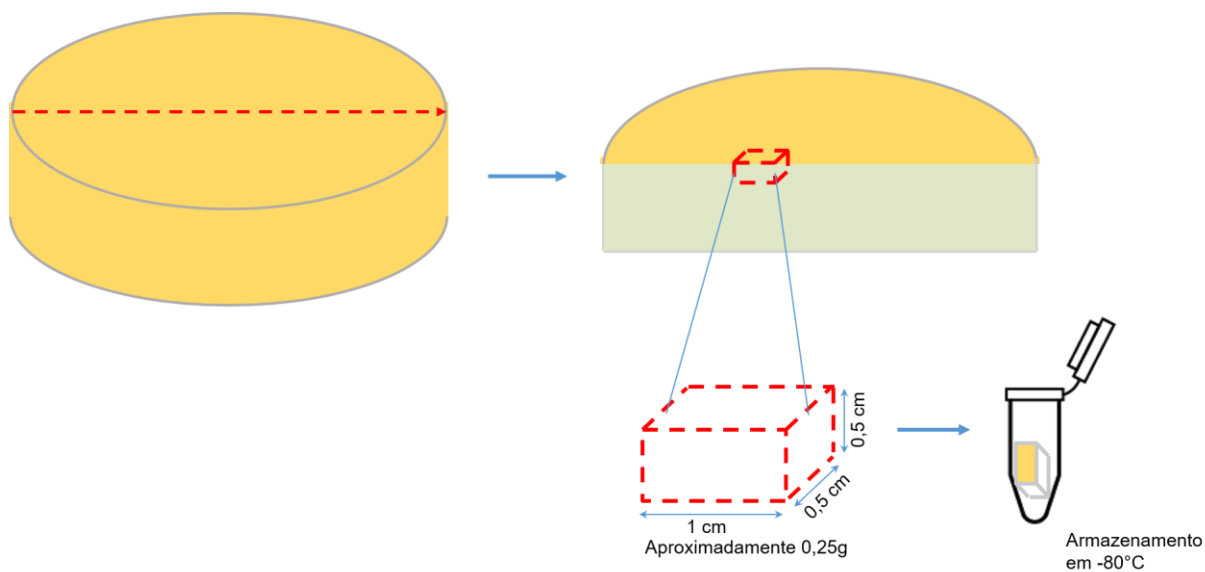


Figura 6 – Processamento das amostras de queijo.

5.2 Coleta de dados

Foi elaborado um questionário com os produtores para obtenção de informações sobre as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e sobre a Infraestrutura Local (IL). As variáveis de BPF foram: Limpeza da sala de Ordenha, Limpeza dos tetos da vaca, produto utilizado para a limpeza dos tetos, sistema de ordenha, uso de touca, uso de bota, uso de máscara, uso de avental, banho antes da produção, frequência de limpeza da tábua de maturação, produto utilizado para a limpeza da tábua de maturação e produto utilizado para a limpeza da queijaria. As variáveis da IL foram: teto da queijaria, revestimento do chão da queijaria, revestimento da parede da queijaria, tela na janela da queijaria, fonte de água, uso de clorador, material do contêiner de coagulação, material da pá, uso de dessorador, material da bancada, ambiente de alimentação das vacas, alimentação das vacas, tipo da sala de ordenha, revestimento do chão da sala de ordenha. As coordenadas geográficas das queijarias foram obtidas através da ferramenta online Google Earth (GOOGLE EARTH, 2018).

Também foi aferida a temperatura no início das atividades diárias da queijaria de 41 produtores, durante um período de 20 dias ao longo do período da coleta de amostras. Para esse fim, foi utilizado um termohigrômetro digital Incoterm modelo 7666.02, posicionado na sala de maturação.

5.3 Análises Físico-Químicas

O pH do pingo foi aferido diretamente no pingo assim que recebido, utilizando pHmetro digital 827 pH lab (Metrohm). Aliquotas de 1mL de pingo foram enviadas para o Instituto Mauá de Tecnologia (Mauá, SP) para a análise de sua salinidade com o Fotômetro de chama B462 (Micronal, Brasil). Amostras de 5 g dos queijos também foram enviadas para a obtenção da umidade dos queijos pelo método da AOAC 925.23 (AOAC, 2011), utilizando estufa de secagem com circulação de ar a 105 °C (Ethik Technology modelo 400-4ND). Dados do pH e atividade de água (aW) das amostras de queijo foram obtidos em colaboração com Gabriela Zampieri Campos. Resumidamente, 10g de queijo foram homogeneizadas em 100 ml de água destilada durante 30 minutos usando um agitador magnético (Fisatom). A amostra homogeneizada foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e o pH da

suspensão foi afetado em pHmetro digital (BEL engineering® PHS3BW). Amostras de 3g de queijo foram usadas para mediar a atividade de água (aW) dos queijos usando o analisador de atividade de água digital AquaLab (análise realizada em duplicata).

5.4 Extração do DNA

As amostras de pingo (pellet) e queijo (fração de 0.25g) foram homogeneizadas utilizando a matriz de lise E (MP Biomedicals) e a extração do DNA total de cada uma delas foi realizada utilizando o kit E.Z.N.A.® Soil DNA (Omega Bio-Tek) seguindo as instruções do fabricante, com as seguintes alterações introduzidas para compatibilizar o protocolo padrão com o fluxo de amostragem: 1) A homogeneização das amostras foi realizada utilizando a matriz E (MP Biomedicals) e o homogeneizador Fastprep-24® (MP Biomedicals) utilizando a potência de 5M/s por 30s para as amostras de pingo e 5M/s por 120s para a completa homogeneização das amostras de queijo; 2) foi adicionado um período de incubação à 95°C por 2 minutos para extração de DNA de bactérias gram-positivas. Após esta homogeneização e incubação o protocolo foi seguido conforme recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado espectrofotometricamente usando um nanodrop (Implen, modelo N60) e armazenado à -20°C até ser utilizado.

5.5 Sequenciamento de amplicons

Bibliotecas de amplicons para as regiões V4 do rDNA 16S foram preparadas de acordo com os protocolos disponibilizados pelo Earth Microbiome Project (EMP, <http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/>). A amplificação por PCR foi feita em triplicata com primers adequadamente codificados (CAPORASO et al., 2011). As bibliotecas produzidas foram normalizadas, misturadas em um pool único e enviadas para o sequenciamento no sequenciador MiSeq (Illumina) no Laboratório de Análise e Investigação do Genoma (GENIAL-CEFAP).. O mesmo procedimento foi realizado para os amplicons da região ITS1 fúngica. Para o sequenciamento 16S foi utilizado o kit de reagentes Illumina MiSeq V3 de 600 ciclos e para o

sequenciamento ITS foi utilizado um kit de reagentes Illumina Nano MiSeq V2 de 500 ciclos.

5.6 Análise dos dados dos sequenciamentos

Os dados do sequenciamento 16S foram analisados usando QIIME 2 2019.1 (BOLYEN *et al.*, 2018). Os dados brutos foram separados por amostra utilizando q2-demux plugin. As sequências foram filtradas por sua qualidade e foi feita a remoção de ruídos do sequenciamento por meio do programa DADA2, para isso, as sequências diretas foram cortadas na posição 223 e as sequências reversas na posição 98. Estas posições foram escolhidas pois o primeiro quartil do escore de qualidade das sequências era maior ou igual à 20. O método “*pooled*” foi utilizado para detectar variantes de sequências dos amplicons ou “*Amplicon Sequence Variants*” (ASVs) com baixa frequência em várias amostras (CALLAHAN *et al.*, 2016; <https://benjjneb.github.io/dada2/pool.html>). Estes passos foram conduzidos usando a implementação do DADA2 no ambiente R de computação estatística (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). Deste ponto em diante, os dados foram divididos em dois conjuntos, um para os queijos e outro para os pingos. A classificação taxonômica das sequências foi obtida usando o plugin q2-feature-classifier classify-sklearn juntamente com um classificador taxonômico providenciado pelo grupo responsável pelo QIIME2 (<https://data.qiime2.org/2019.1/common/silva-132-99-515-806-nb-classifier.qza>), gerado a partir do banco de dados Silva v1.32 (QUAST *et al.*, 2013) agrupado em 99% de similaridade e treinado para os primers da região V4 do 16S rDNA (primers 515F-806R). Para a obtenção da árvore filogenética, todas as ASVs foram alinhadas utilizando mafft (KATOH *et al.*, 2002) (via q2-alignment) e utilizadas para a construção da árvore filogenética utilizando fasttree2 (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010) (via q2-phylogeny). A árvore filogenética e as tabelas ASV não rarefeitas foram usadas para se calcular índices de diversidade beta weighted Unifrac e unweighted Unifrac, usando o pacote Gunifrac em R (CHEN, 2018; LOZUPONE, *et al.*, 2007; LOZUPONE; KNIGHT, 2005);

Para preservar ASVs raras, foram construídas novas tabelas de ASVs a partir da média de 100 rarefações em 14017 sequências por amostra, para os queijos , e

23995 sequências por amostra, para os pingos. Esses valores de rarefação foram escolhidos considerando o número de sequências obtidas para cada amostra (Apêndice I). Estas tabelas ASVs rarefeitas foram carregadas no QIIME 2 2019.1 para a obtenção das métricas de diversidade alfa: riqueza (número de ASVs), equitabilidade de Pielou (PIELOU, 1966), índice de diversidade de Shannon (SHANNON; WARREN WEAVER, 1949) e índice de diversidade filogenética (FAITH, 1992).

Os dados do sequenciamento ITS seguiram o mesmo padrão de análise do 16S com algumas modificações:

1) a qualidade das leituras reversas das sequências foi considerada demasiado baixa para análise, sendo usadas portanto somente as sequências da leitura direta. Foram removidas os primeiros 13 pb da leitura direta pois possuíam baixos escores de qualidade ($q < 20$);

2) A rarefação foi realizada em 1368 sequências por amostra. Esse valor foi utilizado com base nos valores de cada sequência por amostra (Apêndice II);

3) As taxonomias foram obtidas pelo alinhamento local das sequências com um banco de dados personalizado, para isso foi utilizado o BLAST+ (CAMACHO *et al.*, 2009) (via `q2-feature-classifier classify-consensus-blast`) e os parâmetros `--p-strand plus` e `--p-min-consensus 0.7`. O banco de dados criado para obtenção das taxonomias foi elaborado coletando todas as sequências do NCBI com comprimento entre 250 e 1500 pb e parâmetros de busca "internal transcribed spacer 1" OR "ITS1" NOT "bacteria" seguindo uma metodologia disponível online (ZAHN, 2016).

4) Devido à alta variabilidade da região ITS, não foi possível obter um alinhamento de boa qualidade dessas sequências para construção de árvore filogenética (SCHOCH *et al.*, 2012). Portanto, a taxonomia das sequências, compreendendo os níveis Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero, espécie e ASV, foram usados para a criação de uma matrix de distância taxonômica (CLARKE; WARWICK, 1998, 2001), a qual foi usada para a criação de uma árvore de distâncias que representasse as relações existentes entre cada espécie. Para isso, foi usado o pacote `ade4`, e a função `dist.taxo()` (DRAY; DUFOUR, 2007). A árvore foi construída usando o método de neighbor joining, implementado em R no pacote `ape` (PARADIS; SCHLIEP, 2019). Esta árvore foi usada como input para o cálculo das distâncias UniFrac, e a diversidade filogenética oriundas do sequenciamento da

região ITS. Análise de coordenadas principais feitas com as matrizes de distância foram calculadas usando o pacote ape em R (GOWER, 1966) (via ape v. 5.2).

5.7 Análise dos dados em conjunto com queijos no mundo

Foram obtidos dados do estudo da microbiota de 362 amostras das cascas de queijos provenientes de 137 diferentes tipos de queijos (WOLFE *et al.*, 2014) sob o número de acesso 4562556.3 no MG-RAST (MEYER *et al.*, 2008). Este estudo contém somente leitura diretas de 100 pares de base. Portanto, para uma melhor compatibilidade dos estudos, foi utilizado somente a leitura direta do sequenciamento cortadas em 100 pb. Os dois conjuntos de dados foram combinados e importados no QIIME 2-2019.1, e usado para a construção de OTUs (do inglês: *Operational taxonomic unit* - OTU) agrupadas em 97% de similaridade (os dados obtidos no banco de dados não possuem a qualidade do sequenciamento, não sendo possível usar ASVs e o programa DADA2). Sequências foram decodificadas em suas respectivas amostras usando o programa VSearch (ROGNES *et al.*, 2016) (via plugin q2-vsearch dereplicate-sequences), sequências quiméricas foram encontradas com VSearch (via q2-vsearch uchime-denovo) e removidas (via q2-feature-table filter-features e q2-feature-table filter-seqs). As sequências com identidade de 97% foram agrupadas utilizando o banco de dados SILVA v. 1.32 (via q2-vsearch cluster-features-open-reference). Sequências representativas de cada OTU foram alinhadas utilizando mafft (via q2-alignment) e utilizadas para a construção da árvore utilizando fasttree2 (via q2-phylogeny). Replicatas presentes da mesma amostra de queijo do estudo depositado no banco de dados foram agrupadas pela sua mediana maior (via q2-feature-table group). As métricas de diversidade beta unweighted e weighted UniFrac foram obtidas usando o plugin q2-diversity após as amostras serem rarefeitas para 10263 sequências por amostra. As matrizes de distância UniFrac foram carregadas na plataforma R para as análises de coordenadas principais e elaboração de figuras.

5.8 Análise dos dados em conjunto outros queijos brasileiros

Foram obtidos dados do estudo da microbiota de 200 grupos homogêneos de queijos provenientes de diferentes regiões do Brasil (KAMIMURA *et al.*, 2019) sob o

número de acesso SRP165151 depositados no *Sequence Read Archive*, do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Através desse número de acesso foram obtidos os dados no formato fastq das leituras diretas e reversas com 250 bases sequenciadas cada uma.

Os dados obtidos foram provenientes de um sequenciamento da região V3-V4 do rDNA 16S. Logo, para uma melhor compatibilidade dos estudos, foi utilizado somente as sequências de leitura reversa. Estas sequências foram carregadas no QIIME 2-2019.1 onde todas as sequências foram cortadas de tal forma que o primeiro quartil dos escores de qualidade das sequências fosse maior ou igual a 20. Dessa forma, foram utilizadas somente aquelas que estavam entre as posições 7 e 150. Em seguida, as sequências foram filtradas por sua qualidade e realizada a remoção de ruídos do sequenciamento por meio do DADA2 (via q2-dada2 denoise-single) para obtenção das ASVs. O mesmo procedimento foi realizado para as sequências de leitura reversa dos nossos dados. Os dados dos dois estudos foram então agrupados (via q2-feature-table merge e q2-feature-table merge-seqs). Todas essas ASVs foram alinhadas utilizando mafft (via q2-alignment) e utilizadas para a construção da árvore filogenética utilizando fasttree2 (via q2-phylogeny). As métricas de diversidade beta unweighted e weighted UniFrac foram obtidas usando o plugin q2-diversity após as amostras serem rarefeitas para 19007 sequências por amostra. As matrizes de distância UniFrac foram carregadas na plataforma R para as análises de coordenadas principais e elaboração de figuras.

5.9 Pontuações para Boas Práticas de produção e Infraestrutura Local

Os dados obtidos com cada tipo de questionário usado (BPF e IL) (Apêndice III) foram usados em uma análise de correspondência múltipla (LÊ; PAGÈS; HUSSON, 2008). Foram criados 2 pontos de referência para parametrizar a análise, um para o pior caso possível de BPF e IL e outro para o melhor caso possível. A análise de correspondência múltipla dessas variáveis resultou numa explicação de 49% da variância presente nos dados no primeiro eixo extraído usando o questionário de BPF, e 50.6% usando o questionário de IL. Logo, esse primeiro eixo foi utilizado como indicador geral das BPF e IL. Os valores de BPF e IL foram

escalonados para valores entre 0-100 de tal forma que o valor 0 remete ao pior caso possível e o valor 100 ao melhor.

5.10. Principais microrganismos nos pingos e queijos

As tabelas com as contagens da quantidade de ASVs (tabela ASV) em cada amostra da comunidade de bactérias dos pingos e dos queijos foram carregadas no R, assim como a tabela contendo suas taxonomias. A partir de cada tabela ASV foram calculadas as proporções de cada ASV por amostra. A média de cada organismo foi calculada, levando em consideração somente as amostras que continham a ASV em questão.

5.11 Gráficos de pizza em suas localidades geográficas

Primeiramente, foram escolhidos táxons (ASVs) presentes em grandes proporções na microbiota dos pingos e queijos. Estes táxons foram selecionados para aparecer na figura, enquanto que os demais foram colocados em um grupo nomeado “Outros”.

Para elaboração da figura foi obtido o mapa de uma determinada região da Serra da Canastra - MG por meio do pacote ggmap v. 3.0.0.901 (KAHLE; WICKHAM, 2013), utilizando os parâmetros: location = "-20.1 -46.3", zoom = 10, source = "google", maptype = "hybrid", scale = 2. Nesse mapa, foram plotados os valores da longitude no eixo X e latitude no eixo Y das queijarias onde foram coletadas as amostras e o gráfico de pizza foi colorido de acordo com a composição das amostras para os táxons escolhidos previamente. Para isso, foram utilizados os pacotes ggplot2 v. 3.1.0 (WICKHAM, 2009) e scatterpie v. 0.1.2(YU, 2018).

Foi obtida uma matriz de distâncias geográficas via q2-coordinates (BOKULICH; CAPORASO, 2018), a qual foi utilizada para testes de procrustes com as matrizes de distância weighted UniFrac das amostras de pingos e queijos utilizando a função “protest” disponível no pacote vegan v. 2.5-4.

5.12 Correlações

Para a elaboração das figuras de correlações, os dados foram primeiramente filtrados para a eliminação de ruídos. ASVs com uma presença em menos de 10% das amostras e com proporções menores que 10% do valor de rarefação utilizado dividido pelo número de amostras foram removidas. A partir desses dados foram realizadas as correlações entre a microbiota bacteriana dos pingos e dos queijos e entre a microbiota bacteriana e a microbiota fúngica dos queijos. Foi utilizado o método de Spearman (SPEARMAN, 1904) através do comando “rcorr” disponível no pacote Hmisc v. 4.2-0 (HARRELL JR *et al*, 2019). Os valores p obtidos dos testes aplicados foram corrigidos para diminuir o número de falsos positivos pelo método *fdr* (false discovery rate) (MANDAL *et al.*, 2015). Para isso foi utilizada a função *p.adjust*, já disponível na biblioteca base do R. Em seguida, foram selecionadas somente as correlações com *fdr* < 0.05 para elaboração dos mapas de calor (heatmaps) e análise de redes.

Para a elaboração dos mapas de calor, foram filtradas as correlações com $|r| > 0.5$. Esses dados foram transformados em um mapa de calor utilizando o pacote *ggcorrplot* v. 0.1.2 (KASSAMBARA, 2018a).

Para a elaboração dos diagramas de grafos foi utilizado o pacote *igraph* v. 1.2.4 (CSARDI; NEPUSZ, 2006).

5.13 Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e Permanova

Análises multivariadas permutacionais da variância (ANDERSON, 2001) foram aplicadas nas matrizes de distância unweighted e weighted UniFrac da microbiota bacteriana dos pingos e queijos e fúngica dos queijos para verificar se a dispersão das amostras, com suas respectivas microbiotas, foi causada devido as variáveis obtidas para os pingos e queijos. Para isso foi utilizada a função *adonis* disponível no pacote *vegan* v. 2.5-4.

A partir das matrizes de distância UniFrac foram extraídas as suas coordenadas principais através da função *coa* disponível no pacote *ape*. As duas primeiras coordenadas foram plotadas nos eixos x e y, respectivamente, utilizando o pacote *ggplot2*.

5.14 Boxplots das proporções de determinados microrganismos

As pontuações de BPF e IL foram divididas por 10 e arredondadas, de tal forma que foi criado uma nova pontuação de 0-10. Essas novas pontuações foram utilizadas como categorias para a Análise de Composição de Microbiomas (ANCOM) (MANDAL *et al.*, 2015). Os resultados significativos foram utilizados para seleção de ASVs para a construção das figuras de mudança de proporções conforme a aplicação de boas práticas de produção (ggplot2). Para comprovar a diferença das médias foram aplicados os testes estatísticos de Wilcoxon (REY; NEUHÄUSER, 2011) para 2 grupos e Kruskal-Wallis (MCKIGHT; NAJAB, 2010) para 3 ou mais grupos por meio do pacote ggpubr v.0.2 (KASSAMBARA, 2018b). O mesmo procedimento foi realizado para a construção das figuras de mudança de proporções de determinadas ASVs no decorrer dos meses de coleta.

5.15 Outras análises estatísticas e visualizações gráficas

As proporções de cada ASV por amostra foram usadas para a construção de mapas de calor (heatmaps) utilizando o pacote pheatmap (KOLDE, 2019), selecionando somente as ASVs em que a soma de suas proporções fosse maior que 5%.

Testes de procrustes (GOWER, 1975) foram realizados entre as matrizes UniFrac da microbiota bacteriana dos pingos e queijos e fúngica dos queijos. Para isso foi utilizada a função “protest” disponível no pacote vegan v. 2.5-4 (OKSANEN *et al.*, 2019).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Coleta de amostras e sequenciamento do rDNA 16S e ITS fúngico

Durante o período de Julho de 2017 a Abril de 2018, foram obtidas e processadas amostras de pingos e queijos de 81 produtores distintos e situados nas cidades de Medeiros - MG e São Roque de Minas - MG. O sequenciamento dos amplicons 16S dessas amostras gerou um total de 8.353.374 sequências, das quais 6.769.813 passaram no controle de qualidade DADA2 e pelo filtro de quimeras. Destas, 2.621.883 são referentes às 76 amostras de queijo, 4.079.063 são referentes às 87 amostras de pingo e 68.867 as 26 amostras controle utilizadas durante a extração de DNA (brancos de extração) e amplificação da região V4 do rDNA 16S (controles negativos de PCR).

O sequenciamento dos amplicons ITS gerou um total de 828.515 sequências, das quais 353.022 passaram no controle de qualidade DADA2 e pelo filtro de quimeras. Destas, 352.872 sequências são referentes às 76 amostras de queijos e 150 são referentes às 13 amostras controle utilizados durante a extração de DNA e amplificação da região ITS do rDNA.

Nossos dados da microbiota dos queijos Canastra foram comparados com dados similares disponíveis na literatura para se obter uma visão geral dos queijos Canastra em comparação com o Brasil (KAMIMURA *et al.*, 2019) e com o mundo (WOLFE *et al.*, 2014). Adicionalmente analisamos as relações geográfica existente entre nossas amostras, a influência do pingo na produção do queijo Canastra, assim como as possíveis relações existentes entre a microbiota dos pingos e dos queijos amostrados. Por fim, verificamos a existência de uma possível relação temporal/sazonal na microbiota dos pingos e queijos amostrados.

6.2 Principais microrganismos nos pingos e queijos da Serra da Canastra

Foram encontradas 931 ASVs de bactérias nos pingos das quais 130 foram classificadas em nível de espécies, 712 em nível de gênero e 89 tiveram classificações acima do nível de gênero. Nos queijos foram encontradas 893 ASVs

de bactérias das quais 123 foram classificadas em nível de espécie, 682 em nível de gênero e 88 tiveram classificações acima do nível de gênero. Já o sequenciamento do ITS fúngico obtidos dos queijos possibilitou identificar 1248 ASVs de fungos, das quais 912 foram classificadas em nível de espécies, 252 em nível de gênero e 84 tiveram classificações acima do nível de gênero.

As figuras 7, 8 e 9 mostram algumas das ASVs encontradas na microbiota bacteriana das amostras dos pingos, dos queijos e na microbiota fúngica dos queijos, respectivamente.

A figura 7 mostra a microbiota do pingo. A partir dela podemos observar que existem amostras com grandes proporções da ASV 1 (*Lactococcus*), grandes proporções da ASV 2 (*Streptococcus*) e proporções equilibradas das duas ASVs, indicando a possível existência de uma correlação entre táxons de *Lactococcus* e *Streptococcus*.

Foi possível observar que as amostras na microbiota dos queijos (Figura 8) são dominadas pelas ASVs de 1 a 8, pertencendo aos gêneros *Lactococcus* (ASV 1), *Streptococcus* (ASVs 2, 4 e 6), *Staphylococcus* (ASV 3), *Corynebacterium* (ASV 5), *Leuconostoc* (ASV 7) e *Weissella* (ASV 8). Indicando a grande diversidade de perfis de microbiotas de queijos existentes dentro de uma mesma região, cada uma resultando em queijos característicos de seu produtor.

A microbiota fúngica dos queijos (Figura 9) apresentou uma dominância da ASV 1f (*Debaryomyces hansenii*), presente em todas as amostras. Também foram observados táxons de *Trichosporon*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, e *Candida* porém em menores proporções. Apesar de não termos verificado a microbiota fúngica em nossas amostras de pingo, Nóbrega caracterizou a microbiota fúngica de pingos do município de Medeiros - MG, encontrando estes mesmo gêneros de microrganismos (NÓBREGA, 2007).

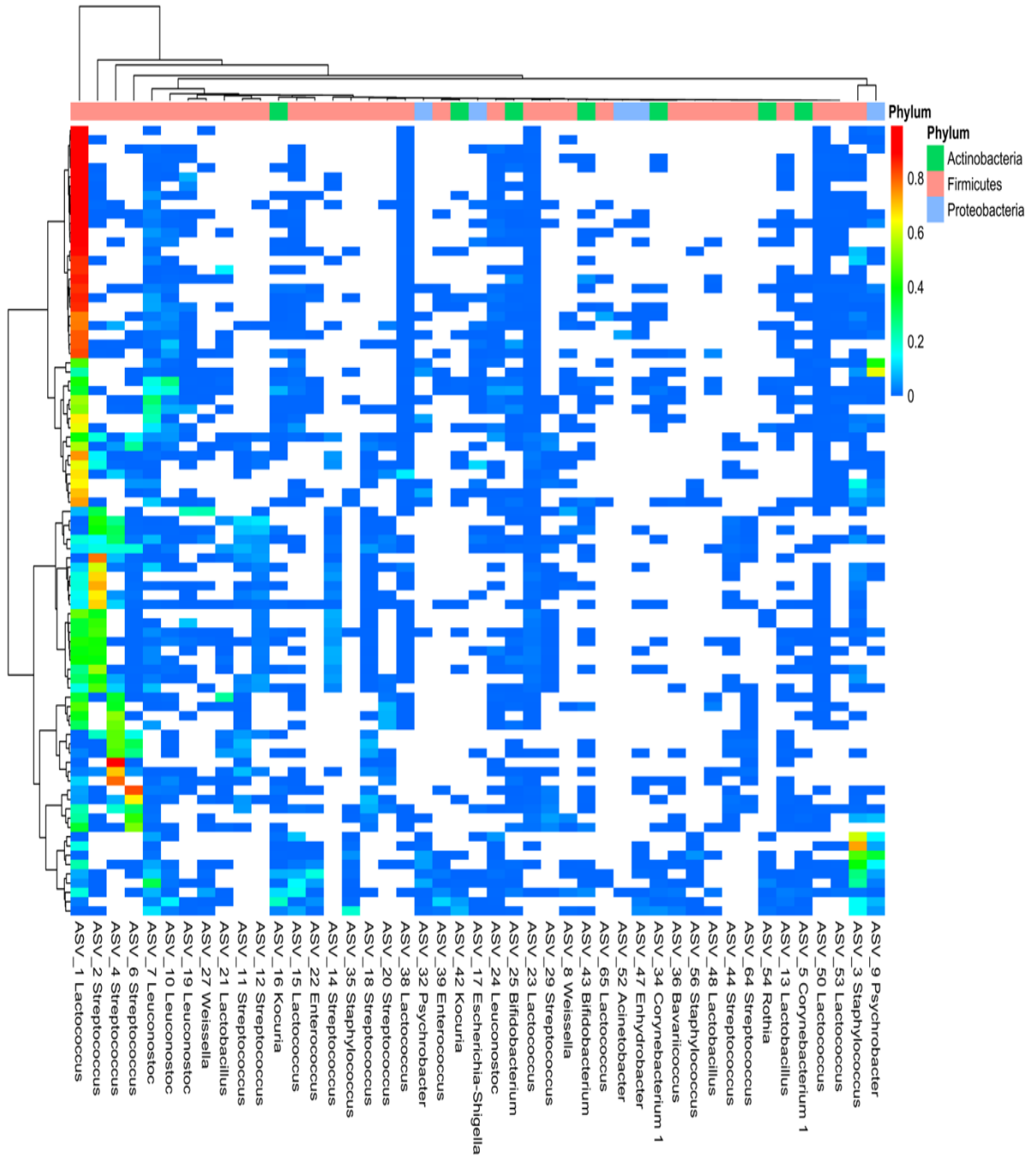


Figura 7: Mapa de calor mostrando as principais ASVs bacterianas encontradas nas amostras de pingo. Cada linha refere-se à uma amostra e cada coluna à uma ASVs. A legenda na região superior do gráfico indica o filo da ASV. As ASVs mostradas são aquelas em que a soma de suas proporções em todas as amostras é maior que 5%. As linhas e as colunas foram agrupadas utilizando o método Ward.D2.

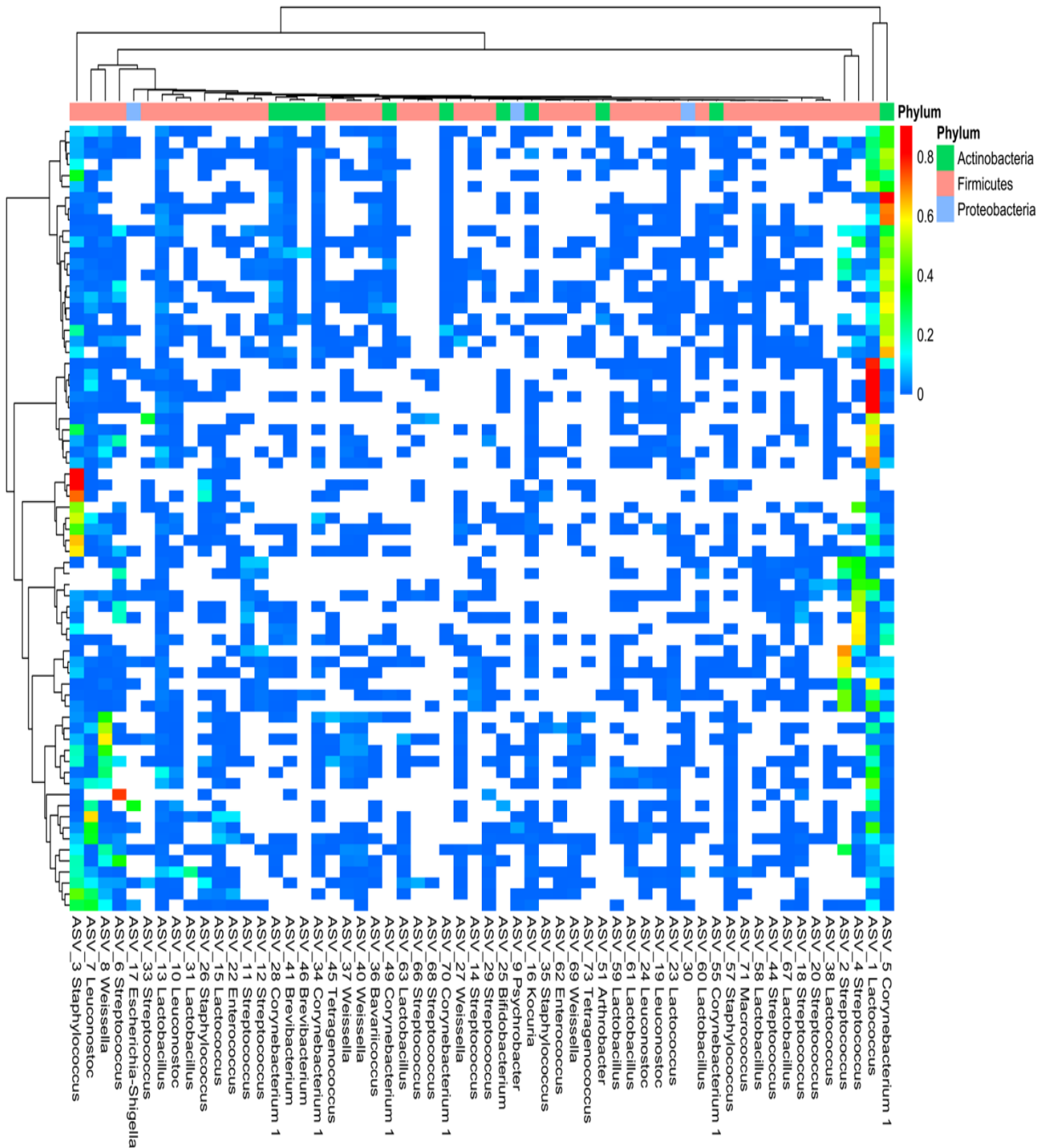


Figura 8: Mapa de calor mostrando as principais ASVs bacterianas encontradas nas amostras de queijo. Cada linha refere-se à uma amostra e cada coluna à uma ASVs. A legenda na região superior do gráfico indica o filo da ASV. As ASVs mostradas são aquelas em que a soma de suas proporções em todas as amostras é maior que 5%. As linhas e as colunas foram agrupadas utilizando o método Ward.D2.

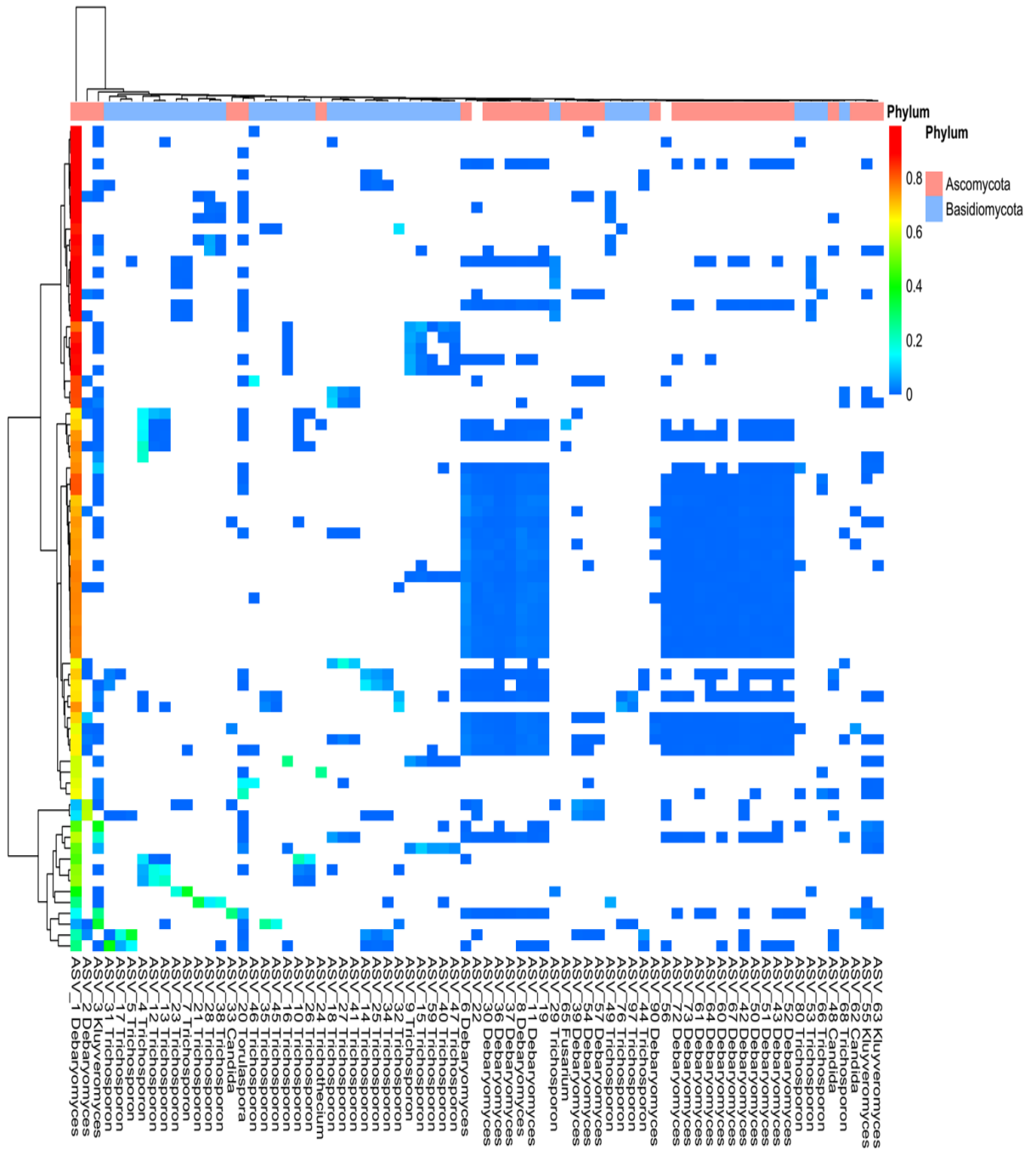


Figura 9: Mapa de calor mostrando as principais ASVs fúngicas encontradas nas amostras de queijo. Cada linha refere-se à uma amostra e cada coluna à uma ASVs. A legenda na região superior do gráfico indica o filo da ASV. As ASVs mostradas são aquelas em que a soma de suas proporções em todas as amostras é maior que 5%. As linhas e as colunas foram agrupadas utilizando o método Ward.D2.

A tabela 1 mostra os principais microrganismos encontrados nos pingos e também nos queijos; a microbiota dominante do pingo é composta por *Lactococcus* (45,6%) e *Streptococcus* (33,8%), e sua microbiota rara contém *Leuconostoc* (6,1%), *Staphylococcus* (5,1%) e *Psychrobacter* (4,1%) *Escherichia-Shigella* (0,6%), *Weissella* (0,5%), *Lactobacillus* (0,2%), *Corynebacterium 1* (0,1%). A microbiota bacteriana dominante do queijo é composta por *Streptococcus* (27,2%), *Lactococcus* (22,5%), *Corynebacterium 1* (18,8%) e *Staphylococcus* (13,6%), e sua microbiota rara contém *Leuconostoc* (6,3%), *Weissella* (6%), *Escherichia-Shigella* (2%), *Lactobacillus* (1,8%) e *Psychrobacter* (0,3%). Já a microbiota fúngica dos queijos é composta principalmente por *Debaryomyces* (77,4%), e pequenas proporções de *Trichosporon* (3,1%), *Kluyveromyces* (1,7%) e *Torulaspora* (0,4%).

Esses mesmos microrganismos também já foram encontrados na microbiota dominantes de outros queijos já estudados: *Debaryomyces*, *Psychrobacter*, *Lactococcus*, *Streptococcus* foram os microrganismos dominantes em queijos tradicionais Franceses (DUGAT-BONY *et al.*, 2016); *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* em queijos Mexicanos Cotija (ESCOBAR-ZEPEDA; SANCHEZ-FLORES; QUIRASCO BARUCH, 2016); *Lactococcus* e *Streptococcus* em queijos Pico (RIQUELME *et al.*, 2015); *Streptococcus* e *Lactobacillus* em queijos Poro (ALDRETE-TAPIA *et al.*, 2014); *Lactococcus*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* em queijos Belgas macios de casca lavada (DELCENSERIE *et al.*, 2014); *Lactococcus* e *Streptococcus* em queijos artesanais de leite cru de ovelha (FUKA *et al.*, 2013); *Lactococcus* foi a microbiota dominante em queijos artesanais irlandeses (QUIGLEY *et al.*, 2012); *Streptococcus* e *Lactobacillus* em queijos mussarela tradicionais (ERCOLINI *et al.*, 2012); *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* em queijos dinamarqueses semi-duros de leite cru (MASOUD *et al.*, 2011).

Tabela 1: Panorama geral da abundância relativa de microrganismos nos pingos e nos queijos.

ASV.ID	Abundância relativa no Pingo	Abundância relativa no Queijo	Taxonomia
ASV_1	45.6%	22.5%	<i>Lactococcus</i>
ASV_2	13.1%	10.0%	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>
ASV_4	10.1%	9.2%	<i>Streptococcus</i>
ASV_6	5.6%	4.9%	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>
ASV_3	5.1%	13.6%	<i>Staphylococcus</i>
ASV_7	4.1%	5.5%	<i>Leuconostoc</i>
ASV_9	4.1%	0.3%	<i>Psychrobacter meningitidis</i>
ASV_10	2.0%	0.8%	<i>Leuconostoc fallax</i>
ASV_14	1.8%	0.7%	<i>Streptococcus</i>
ASV_12	1.7%	1.2%	<i>Streptococcus</i>
ASV_11	1.5%	1.2%	<i>Streptococcus</i>
ASV_17	0.6%	2.0%	<i>Escherichia-Shigella</i>
ASV_8	0.5%	6.0%	<i>Weissella</i>
ASV_13	0.2%	1.8%	<i>Lactobacillus</i>
ASV_5	0.1%	18.8%	<i>Corynebacterium 1</i>
619 ASVs	-----	77.4%	<i>Debaryomyces hansenii</i>
59 ASVs	-----	3.1%	<i>Trichosporon coremiiforme</i>
89 ASVs	-----	1.7%	<i>Kluyveromyces lactis</i>
45 ASVs	-----	0.4%	<i>Torulaspora delbrueckii</i>

Um estudo dos queijos da Serra do Salitre - MG identificou os microrganismos presentes no leite, pingo e queijos durante a maturação (SANT'ANNA *et al.*, 2019). Foi possível observar que a microbiota desses pingos é dominada pelos mesmos gêneros de microrganismos que dominam a microbiota dos pingos analisados nesse estudo (*Streptococcus* e *Lactococcus*). Além disso, eles identificaram que a microbiota dominante do interior dos queijos da Serra do Salitre é composto por grupos de microrganismos oriundos dos pingos. Todavia, até o momento, não encontramos dados na literatura revisada sobre a influência da microbiota do pingo na produção dos queijos Canastra. Logo, nossas análises buscaram esclarecer essa relação.

6.3 A Microbiota do Queijo é modelada pela microbiota do pingo

O pingo é a cultura iniciadora natural utilizadas na produção do queijo Canastra. É esperado que grande parte dos microrganismos encontrados no pingo também sejam encontrados no queijo, com exceção daqueles que não sobreviveram no queijo, devido à competição, e aqueles que entraram no queijo através de outros meios como, por exemplo, a manipulação do queijo pelo produtor ou contato com materiais utilizados na produção.

Dentre as ASVs encontradas nos pingos, 575 também foram encontradas nos queijos, indicando que 64% da diversidade bacteriana encontrada em queijos são provavelmente bactérias que entraram no sistema de produção artesanal do queijo através do pingo. Individualmente, uma média de 44% das espécies encontradas no Pingo de cada produtor também foram encontradas nos queijos produzido com estes pingos.

A ASV 1 correspondente a *Lactococcus* foi identificada como um microrganismo que possui uma abundância de 45,6% no pingo e também é parte importante da microbiota do queijo com uma abundância de 22,5% indicando que microrganismos em grandes proporções no pingo são encontrados nos queijos, porém em proporções diferentes (Tabela 1). Isto pode ser devido ao tempo de maturação do queijo, onde mudanças que ocorrem durante a fermentação e maturação auxiliam na estabilização destes microrganismos no queijo com o decorrer do tempo.

A relação global entre a microbiota dos pingos e dos queijos foi comparada utilizando o teste de procrustes entre as matrizes UniFrac dos pingos e queijos (Tabela 2). Foi observada uma forte correlação entre a estrutura da microbiota de pingos e queijos, evidenciando que microbiota bacteriana do pingo tem forte influência na microbiota bacteriana e fúngica do queijo.

Tabela 2: Resultados dos testes de procrustes entre as matrizes de distância UniFrac dos dados da microbiota bacteriana dos pingos e queijos e da microbiota fúngica dos queijos. Todos os resultados tiveram valor de $p < 0.001$

Tipo de Matriz UniFrac	Natureza da matriz	r
Unweighted	Pingo x Queijo_16S	0.64
Unweighted	Queijo_16S x Queijo_ITS	0.66
Unweighted	Pingo x Queijo_ITS	0.67
Weighted	Pingo x Queijo_16S	0.47
Weighted	Queijo_16S x Queijo_ITS	0.42
Weighted	Pingo x Queijo_ITS	0.41

6.4 A microbiota dos queijos da serra da Canastra é influenciada por fatores locais

As tabelas 3, 4 e 5 mostram os índices de diversidade alfa para a microbiota bacteriana do pingo, do queijo e para a microbiota fúngica do queijo, respectivamente. Foi observado que o pingo da cidade de Medeiros possui uma microbiota mais diversa, com uma maior distância filogenética entre os organismos observados que o pingo da cidade de São Roque de Minas (Tabela 3). Entretanto, a distribuição desses microrganismos na microbiota não é influenciada pela cidade (Equitabilidade, $p = 0,72$; Shannon, $p = 0,96$). Na microbiota bacteriana dos queijos não foi observada nenhuma diferença significativa para os índices de diversidade alfa entre as cidades amostradas (Tabela 4). A microbiota fúngica dos queijos da cidade de Medeiros se mostrou mais diversa que a cidade de São Roque de Minas (Riqueza, $p = 2,9 \times 10^{-5}$; chao1, $p = 1,5 \times 10^{-5}$; Shannon, $p = 0,0096$), os

microrganismos estão filogeneticamente mais distantes (PD, $p = 9,9 \times 10^{-4}$) e possuem a mesma distribuição (Equitabilidade, $p = 0,83$) (Tabela 5).

Tabela 3: Diversidade Alfa da microbiota bacteriana dos pingos de Medeiros-MG e São Roque de Minas-MG. Os valores p indicados na tabela são referentes aos testes de Wilcoxon.

	Medeiros	São Roque de Minas	valor p	Total
Riqueza	103.8 ± 48.96 (50)	72.4 ± 23.89 (35)	0.0012	90.87 ± 43.25 (85)
Chao	191.03 ± 87.86 (50)	148.87 ± 75.81(35)	0.026	173.67 ± 85.23 (85)
Equitabilidade	0.27 ± 0.13 (50)	0.27 ± 0.12 (35)	0.72	0.27 ± 0.13 (85)
Shannon	1.85 ± 1.02 (50)	1.68 ± 0.78 (35)	0.96	1.78 ± 0.93 (85)
PD	5.64 ± 2.27 (50)	4.16 ± 1.02 (35)	0.0039	5.03 ± 1.99 (85)

* media+-D.P (n)

Tabela 4: Diversidade Alfa da microbiota bacteriana dos queijos. Os valores p indicados na tabela são referentes aos testes de Wilcoxon.

	Medeiros	São Roque de Minas	valor p	Total
Riqueza	87.77 ± 26.80 (39)	90.44 ± 24.15 (32)	0.64	88.97 ± 25.49 (71)
Chao	166.81 ± 142.00 (39)	154.87 ± 52.31 (32)	0.45	161.43 ± 111.12 (71)
Equitabilidade	0.34 ± 0.11 (39)	0.37 ± 0.07 (32)	0.18	0.35 ± 0.1 (71)
Shannon	2.17 ± 0.83 (39)	2.37 ± 0.48 (32)	0.23	2.26 ± 0.7 (71)
PD	3.86 ± 1.22 (39)	3.76 ± 0.91 (32)	0.89	3.81 ± 1.08 (71)

* media+-D.P (n)

Tabela 5: Diversidade Alfa da microbiota fúngica dos queijos. Os valores p indicados na tabela são referentes aos testes de Wilcoxon.

Cidade	Medeiros	São Roque de Minas	valor p	Total
Riqueza	82.37 ± 51.50 (41)	29.91 ± 30.89 (34)	$2,9 \times 10^{-5}$	58.59 ± 50.5 (75)
Chao	308.47 ± 320.22 (41)	66.69 ± 102.79 (34)	$1,5 \times 10^{-5}$	198.86 ± 273.54 (75)
Equitabilidade	0.31 ± 0.10 (41)	0.29 ± 0.16 (34)	0.83	0.3 ± 0.13 (75)
Shannon	1.90 ± 0.82 (41)	1.39 ± 0.93 (34)	0,0096	1.67 ± 0.9 (75)
PD	60.61 ± 38.18 (41)	26.41 ± 22.10 (34)	$9,9 \times 10^{-4}$	45.11 ± 36.05 (75)

* media+-D.P (n)

Essa diferença na diversidade alfa para as duas cidades pode ser atribuída a dois fatores principais: 1) a distância geográfica entre os dois locais resulta em características de microclima ligeiramente diferentes, ou 2) cada região concentra queijarias com melhores infraestruturas local (IL) e boas práticas de fabricação (BPF). Os produtores de ambas as regiões possuem infraestrutura (Wilcoxon $p = 0,65$) e boas práticas de fabricação (Wilcoxon $p = 0,51$) similares, o que evidencia outros fatores locais como responsáveis pela segregação da microbiota bacteriana do pingo e da microbiota fúngica do queijo.

A Figura 10 mostra a distribuição das amostras de pingo e queijos de acordo com a posição geográfica e os principais microrganismos de cada amostra. É possível observar que a maior parte das amostras são compostas de *Lactococcus* e *Streptococcus*, com algumas sendo dominadas totalmente por *Lactococcus*, e outras por *Streptococcus*. Entretanto, também é possível observar que existem amostras com grande abundância de *Staphylococcus*, que apesar de poder influenciar características sensoriais em produtos fermentados (AQUILANTI *et al.*, 2007), também é um gênero de microrganismos potencialmente patogênicos. A cidade de Medeiros apresentou uma maior quantidade de *Staphylococcus* e em São Roque de Minas foram encontradas quantidades maiores de *Streptococcus*.

Na distribuição das amostras de queijo foi possível identificar amostras com grandes proporções de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Weissella*, e com micro-regiões dominadas por mais ou menos destes microrganismos, evidenciando a grande diversidade de queijos existentes numa mesma região. Os gêneros *Staphylococcus*, *Weissella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Escherichia* podem estar associados à mastite bovina e má qualidade de higiene (KEEFE, 1997; SILVA *et al.*, 2018; SUOJALA; KAARTINEN; PYÖRÄLÄ, 2013; WALD *et al.*, 2016; YERUHAM *et al.*, 1996). Entretanto, com exceção de *Escherichia-Shigella*, esses gêneros também fazem parte da microbiota do leite e da pele de animais e humanos (GRICE *et al.*, 2009; SANT'ANNA *et al.*, 2019).

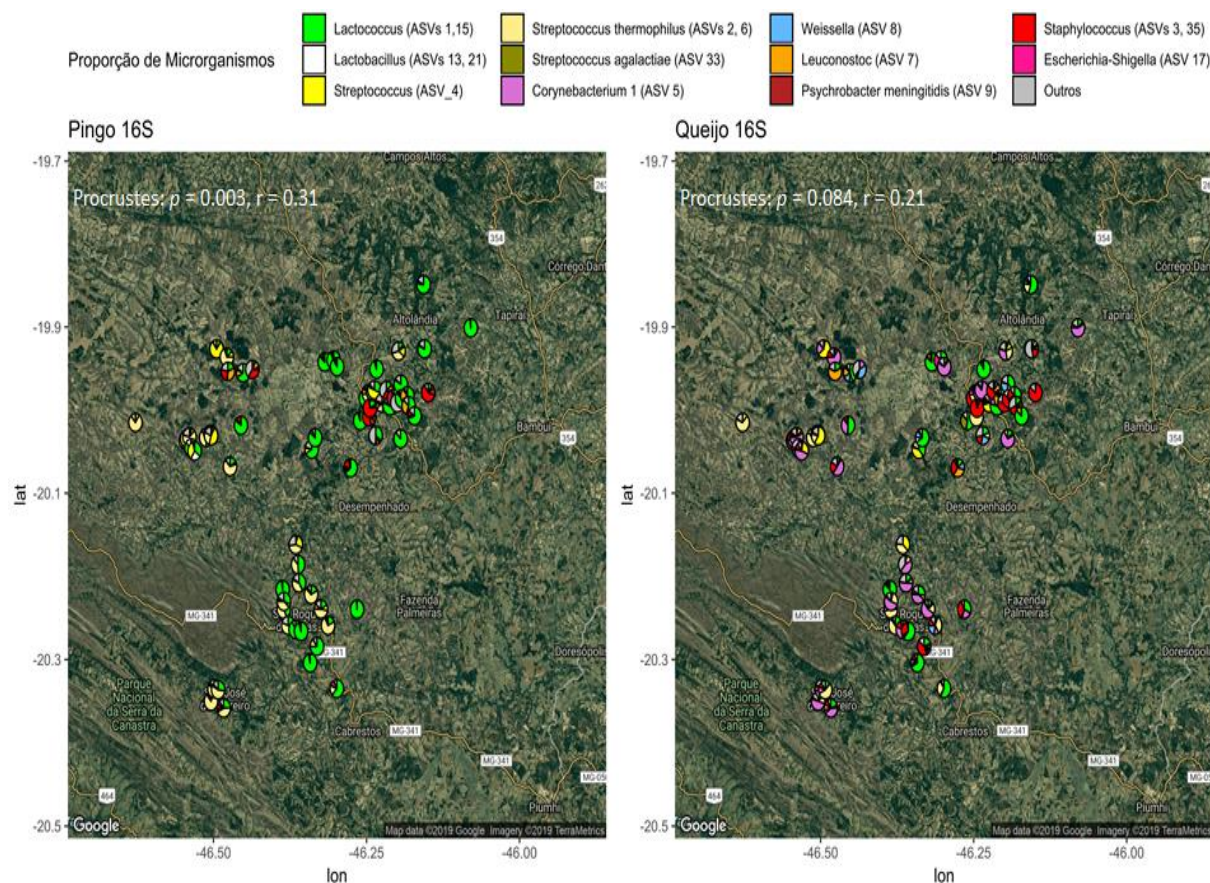


Figura 10: Gráficos de pizza mostrando as proporções dos microrganismos mais abundantes encontrados nas amostras de pingos e queijos de acordo com a localização geográfica de seus produtores. Os testes de procrustes indicados na região superior esquerda dos gráficos foram realizados entre as distâncias geográficas e as distâncias Weighted UniFrac.

Para determinar se existe uma relação espacial entre as amostras, a distância física entre os produtores e a distância filogenética entre o microbioma de amostras destes produtores foi comparada com o teste Procrustes. Foi observada uma correlação entre as distâncias geográfica dos produtores e a microbiota dos pingos ($p = 0.003$, $r = 0.31$) e uma tendência de agrupamento espacial na microbiota dos queijos ($p = 0.083$, $r=0.21$). Isso demonstra que amostras de produtores mais próximos tendem a possuir uma microbiota mais semelhante que amostras de produtores mais distantes, indicando a possível existência de micro-regiões dentro da Serra da Canastra. Curiosamente, uma prática comum nesta região é a doação de pingo entre produtores: quando um produtor tem um problema de produção que ele atribui ao pingo sendo utilizado, o produtor passa a utilizar o pingo de outro produtor próximo. Essa substituição de pingos possivelmente contribui para que a microbiota dos pingos seja melhor correlacionada com a distância geográfica.

6.5 Co-variáveis analisadas que podem influenciar a microbiota dos pingos e dos queijos.

Nós avaliamos a relação entre Altitude, pH, salinidade, aW, cidade de origem, boas práticas de fabricação, infraestrutura da queijaria e valor comercial do queijo com a composição global da microbiota dos queijos e pingos. As tabelas 6, 7 e 8 mostram os resultados dos testes de Análise Permutacional Multivariada da Variância (adônisis) (ANDERSON, 2001) para estas variáveis e a microbiota bacteriana dos pingos, dos queijos e a microbiota fúngica dos queijos, respectivamente.

O Cadastro no IMA, valor do queijo, Boas Práticas de Fabricação e Infraestrutura Local possuem uma relação entre si: um produtor cadastrado no IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) precisa seguir Boas Práticas de Fabricação e possuir infraestrutura adequada. Conseqüentemente, esses produtores cobram um valor mais alto pelo seu queijo. Assim, todas essas variáveis influenciam quais microrganismos estão presentes na microbiota dos pingos e queijos (Tabela 6, unweighted UniFrac). Entretanto, quando consideradas as proporções dos microrganismos presentes (weighted UniFrac), foi observada uma relação estatisticamente significativa somente com as boas práticas de fabricação e com o valor do queijo.

Isso sugere que a Infraestrutura local funciona como uma barreira para a entrada de microrganismos do meio externo. Entretanto esses microrganismos não são capazes de deslocar os microrganismos principais dos pingos e queijos. Já Boas Práticas de Fabricação (BPF), além de selecionarem a entrada de microrganismos do meio, influenciam a microbiota dominante dos pingos e queijos.

Tabela 6: Resultados dos testes adonis para a comunidade de bactérias dos pingos. As regiões coloridas demarcam os testes que tiveram o valor p significativo ($p < 0,05$).

Variável	Unweighted UniFrac		Weighted UniFrac	
	R ²	valor p	R ²	valor p
Altitude	0.018	0.1063	0.022	0.1339
BPF_score	0.046	0.0004	0.036	0.0309
CadastroIMA	0.038	0.0008	0.022	0.1314
Cidade	0.064	0.0001	0.137	0.0001
Infrastructure_score	0.022	0.0359	0.014	0.2774
pH do pingo	0.092	0.0001	0.280	0.0001
salinidade do pingo	0.038	0.0028	0.015	0.2992
Semana de coleta do Pingo	0.021	0.0634	0.040	0.0321
Valor do queijo	0.036	0.0018	0.039	0.0267

*BPF_score = pontuação (score) de Boas Práticas de Fabricação

Tabela 7: Resultados dos testes adonis para a comunidade de bactérias dos queijos.. As regiões colorida demarcam os testes que tiveram o valor p significativo ($p < 0,05$).

Variável	Unweighted UniFrac		Weighted UniFrac	
	R ²	valor p	R ²	valor p
Altitude	0.014	0.4458	0.010	0.5692
aw	0.041	0.0001	0.183	0.0001
BPF_score	0.030	0.0022	0.045	0.0238
CadastroIMA	0.023	0.0226	0.036	0.0550
Cidade	0.028	0.0034	0.057	0.0091
Infrastructure_score	0.029	0.0017	0.025	0.1388
pH do pingo	0.036	0.0011	0.064	0.0090
pH do Queijo	0.022	0.0452	0.047	0.0207
Semana de coleta do Queijo	0.020	0.0844	0.043	0.0295
Umidade	0.018	0.1838	0.042	0.0326
Valor do queijo	0.031	0.0010	0.056	0.0083

*BPF_score = pontuação (escore) de Boas Práticas de Fabricação

Tabela 8: Resultados dos testes adonis para a comunidade de fungos dos queijos. As regiões coloridas demarcam os testes que tiveram o valor p significativo ($p < 0,05$).

Variável	Unweighted UniFrac		Weighted UniFrac	
	R ²	valor p	R ²	valor p
Altitude	0.033	0.0096	0.016	0.2769
aw	0.114	0.0001	0.083	0.0009
BPF_score	0.034	0.0060	0.035	0.0402
Cadastro no IMA	0.025	0.0396	0.028	0.0887
Cidade	0.103	0.0001	0.069	0.0026
Infrastructure_score	0.029	0.0155	0.020	0.1861
pH do Pingo	0.067	0.0001	0.063	0.0062
pH do Queijo	0.012	0.5414	0.014	0.3500
Semana de coleta do Queijo	0.051	0.0001	0.025	0.1129
Umidade	0.019	0.1030	0.010	0.5433
Valor do queijo	0.046	0.0004	0.020	0.1798

*BPF_score = pontuação (escore) de Boas Práticas de Fabricação

O valor do queijo é uma variável dada aos queijos pelos próprios produtores. Essa variável foi construída com a experiência dos produtores, a partir da obtenção de queijos de melhor qualidade, com melhores características sensoriais e sua própria experiência ao saber denominar um valor ao seu queijo. Logo, essa variável demonstrou uma forte relação tanto na definição dos microrganismos que compõem microbiota dos queijos e pingos quanto dos na definição dos microrganismos que dominam a microbiota dos queijos e pingos.

O pH e a salinidade são variáveis conhecidas por selecionarem os microrganismos que sobrevivem num meio. Foi possível observar uma relação entre o pH e a microbiota no pingo (unweighted UniFrac, adonis p = 0.0001) e no queijo (unweighted UniFrac, adonis p = 0.045), assim como a salinidade do pingo (unweighted UniFrac, adonis p = 0.0028). Entretanto, a salinidade do pingo não parece influenciar sua microbiota dominante (unweighted UniFrac, adonis p = 0.2992). Além disso, o pH do pingo foi relacionado a microbiota bacteriana (unweighted UniFrac, adonis p = 0.0011) e com a microbiota fúngica do queijo (unweighted UniFrac, adonis p= 0.0001).

Fatores climáticos como temperatura e umidade também podem afetar a microbiota do pingo e do queijo. Uma vez que realizamos nossa amostragem de forma contínua durante um período de 10 meses, a semana de coleta das amostras pode ser uma variável indicativa da existência de uma relação entre fatores sazonais e a microbiota dos pingos e queijos. Assim, nós identificamos a relação entre a semana de coleta e a microbiota bacteriana dos pingos (weighted UniFrac, adonis p = 0.0321), dos queijos (weighted UniFrac, adonis p = 0.0295) e a microbiota fúngica dos queijos (unweighted UniFrac, adonis p = 0.0001) (Tabela 8), evidenciando presença de um fator sazonal. Um estudo mostrou que as contagens médias de bactérias ácido-lácticas são influenciadas pela altitude (RESENDE *et al.*, 2011). Nós não observamos nenhuma relação entre a altitude e a microbiota bacteriana dos pingos e queijos, mas sim, entre a altitude e a comunidade fúngica dos queijos da Serra da Canastra.

A atividade de água é um parâmetro físico-químico utilizada no controle de microrganismos. Isso fica evidente quando observamos o mesmo sendo um fator de seleção dos microrganismos presentes e dominantes na microbiota bacteriana dos queijos (Unweighted UniFrac, adonis p = 0.0001 e Weighted UniFrac, adonis p = 0.0001). O pH do queijo tem efeito semelhante (Unweighted UniFrac, adonis p = 0.0452 e Weighted UniFrac, adonis p = 0.0207). Já a umidade do queijo afetou significativamente somente sua microbiota dominante (Weighted unifrac, Adonis p = 0.0326), indicando que queijos com diferentes níveis de umidade possuem uma microbiota dominante distinta.

A microbiota bacteriana dominante nos pingos e queijos foram associadas com a semana de coleta da amostra (Weighted Unifrac, Adonis teste, p=0.0321,

$p=0.0295$, respectivamente). Isto indica uma possível existência de variação sazonal na microbiota observada no sistema de produção de queijos artesanais na Serra da Canastra. Alguns estudos já buscaram evidenciar alguns eventos que acontecem devido a mudança sazonal na microbiota dos pingos da região da Canastra e em queijos artesanais da Amazônia (MARTINS *et al.*, 2018; NÓBREGA, JULIANA E. *et al.*, 2008a).

A Figura 11 mostra a visualização gráfica das distâncias unweighted UniFrac por meio de uma análise de coordenada principal (PCoA), possibilitando a visualização da dispersão da microbiota. Nela é possível observar as amostras de pingo (região superior da figura) de Medeiros estão concentradas na direita do gráfico e as amostras de São Roque de Minas estão à esquerda do gráfico, indicando uma segregação geográfica. As amostras de produtores com melhores pontuações de BPF e IL estão concentradas nos gráficos. A dispersão da microbiota fúngica dos queijos (região inferior da figura) teve uma separação por cidade similar à do pingo com amostras de Medeiros concentradas ao lado direito dos gráficos e São Roque de Minas na região inferior esquerda. Também foi possível observar que amostras com menores pontuações de BPF e IL estão nas extremidades dos gráficos.

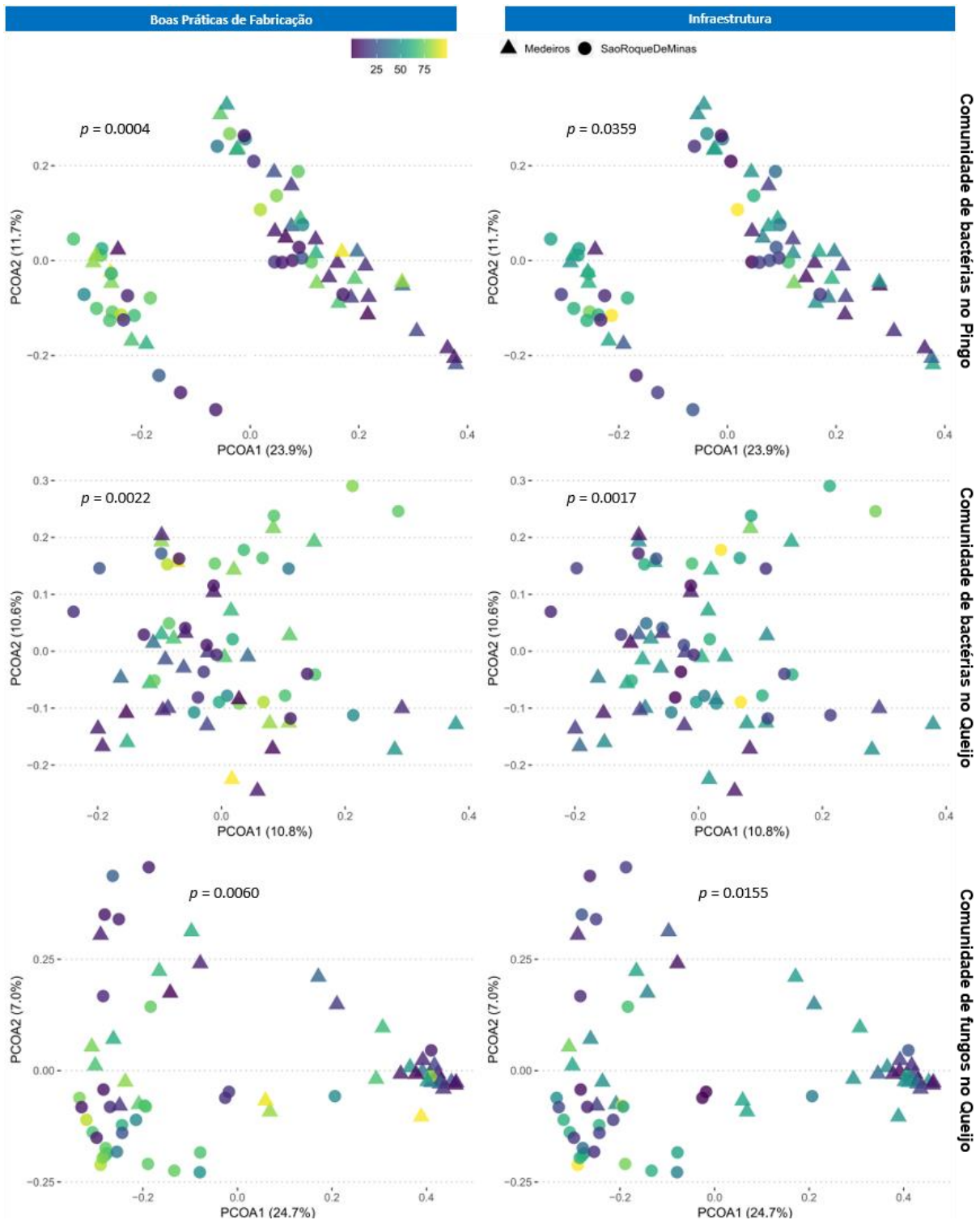


Figura 11: Análise de Coordenada Principal (PCoA - Principal Coordinates Analysis) das matrizes Unweighted UniFrac para a comunidade de bactérias dos pingos e queijos e para a comunidade de fungos dos queijos. A escala de cores representa as pontuações de Boas Práticas de Fabricação (à esquerda) e Infraestrutura local (à direita). Triângulos representam produtores na cidade de São Roque de Minas e círculos representam produtores na cidade de Medeiros. Os valores p mostrados no gráfico são referentes ao teste Adonis com as pontuações das Boas Práticas de Fabricação (à esquerda) e Infraestrutura (à direita).

6.6 Correlações entre táxons encontrados no Pingo e no Queijo

A Figura 12 mostra as correlações de Spearman entre as bactérias presentes nos pingos e nos queijos. As correlações positivas mais fortes geralmente são de ASVs presentes nos pingos que também foram encontradas nos queijos. Muitas ASVs que correspondem a um mesmo gênero também apresentam correlações positivas fortes entre si. As correlações negativas apresentadas indicam ASVs presentes no pingo que possivelmente exercem algum efeito de controle nas ASVs presentes no queijo ou a existência de algum fator seletivo no meio que favorece o crescimento de uma em relação a outra.

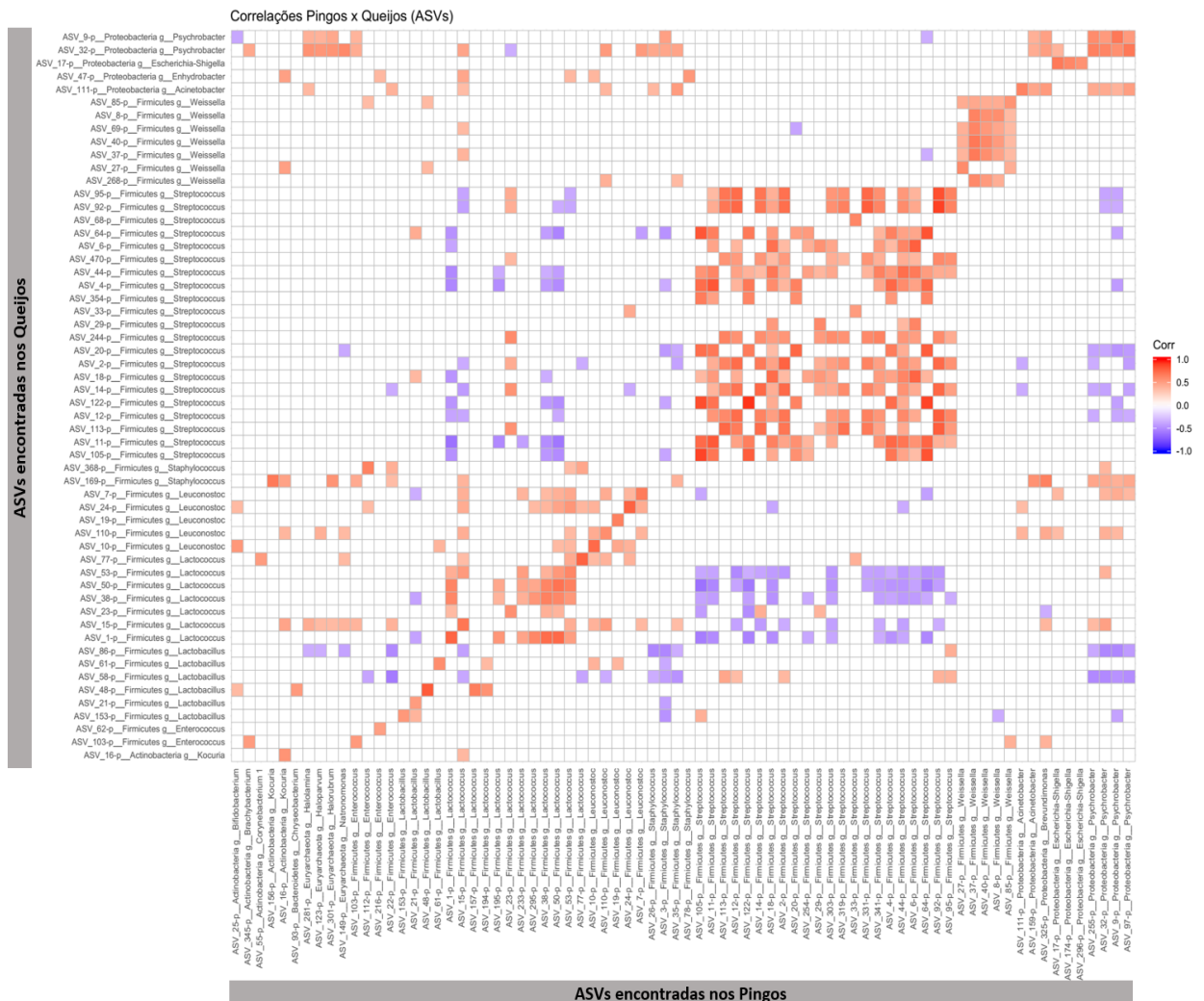


Figura 12: Heatmap das correlações entre a microbiota bacteriana dos pingos e dos queijos. A figura mostra as correlações de Spearman significativas ($p < 0,05$) e maiores que 0.5.

Para o gênero *Lactococcus* foram encontradas 12 ASVs com correlações significantes. A ASV 1 (*Lactococcus*), a mais abundante no pingo, assim como outras ASVs do mesmo gênero (ASVs 15, 195, 38, 50, 53 e 77) foram negativamente correlacionadas com várias ASVs de *Streptococcus* queijo. Indicando um possível efeito de competição entre esses táxons num mesmo meio. A dominância de uma sobre a outra poderia definir características diferentes para os queijos artesanais amostrados. Entretanto, seria necessário a análise de seu metabolismo.

Somente a ASV 15 foi identificada em nível de espécie como *Lactococcus garviae*. Ela apresentou correlações positivas com *Staphylococcus* (ASV 169), *Leuconostoc* (ASVs 7, 24, 110), *Kocuria* (ASV 16), com as halobactérias *Psychrobacter* (ASV 32), *Enhydrobacter* (ASV 47) e *Acinetobacter* (ASV 111), e correlações negativas com *Lactobacillus* (ASVs 58, 86). A espécie *Lactococcus garviae* é responsável por causar mastite em ruminantes e esse perfil de correlações observadas nos indica a presença de ruminantes com casos de mastite (HAGUINGAN *et al.*, 2010; HIRAKAWA *et al.*, 2011).

Foram observadas correlações positivas entre *Leuconostoc* e os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter* e *Psychrobacter*. Ainda, a ASV 24 (*Leuconostoc*) encontrada no pingo mostrou correlação positiva com a ASV 33 e negativa com a ASV 14, ambas do gênero *Streptococcus*. Isto pode indicar que diferentes cepas da mesma espécie têm efeitos diferentes no sistema de produção do queijo.

Para os gêneros de halobactérias *Halolamina*, *Haloparvum* e *Natronomonas* encontrados foram observadas correlações positivas com o gênero *Psychrobacter*. Uma vez que esses gêneros são halófilos, essa correlação evidencia a seleção do meio devido a grande quantidade de sal utilizada na produção do queijo. Além disso, é importante notar que o gênero *Psychrobacter* é produtor de amins biogênicas (e.g. histamina, tiramina, putrescina, cadaverina) que em altas concentrações podem se tornar um problema de saúde pública (SIMON SARKADI, 2017).

A Figura 13 apresenta as correlações observadas entre a microrganismos do pingo e do queijo em forma de diagrama de Grafos. Cada seta indica uma correlação entre ASVs, e ASVs de mesmo gênero estão agrupadas espacialmente. Observa-se que a quantidade de *Kocuria*, *Escherichia-Shigella*, *Weissella*,

Enterococcus, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactococcus* nos queijos é relacionada positivamente com sua quantidade no Pingo. Isso nos indica que estas espécies são oriundas provavelmente do Pingo, e que uma contaminação do pingo pode resultar na contaminação do queijo por microrganismos indesejados. Ainda, é interessante observar que *Streptococcus* possui correlações somente com *Lactococcus*, sendo elas positivas ou negativas, e *Lactococcus* possui várias outras correlações com outros microrganismos.

A presença de todos os gêneros ligados à alta salinidade, inclusive *Psychrobacter*, no pingo apresentam correlações positivas com a presença de *Psychrobacter* no queijo, ainda, um deles também apresenta correlação positiva com a presença de *Staphylococcus* nos queijos. Além disso, a presença de *Psychrobacter* no pingo é negativamente correlacionada com a presença de *Lactobacillus* no queijo e positivamente correlacionada com a presença de *Enterococcus* no queijo. É interessante observar que a presença de *Psychrobacter*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* são indicações de má qualidade, causando problemas no sistema de produção de queijos (RAWAT, 2015). A fim de evitar possíveis problemas nos queijos, muitos produtores adicionam grandes quantidades de sal nos queijos para controlar o crescimento de microrganismos, e esse sal é carregado para o pingo. O uso contínuo de grandes quantidades de sal pode resultar em um sistema de interação de microrganismos adaptados ao meio, como o descrito anteriormente.

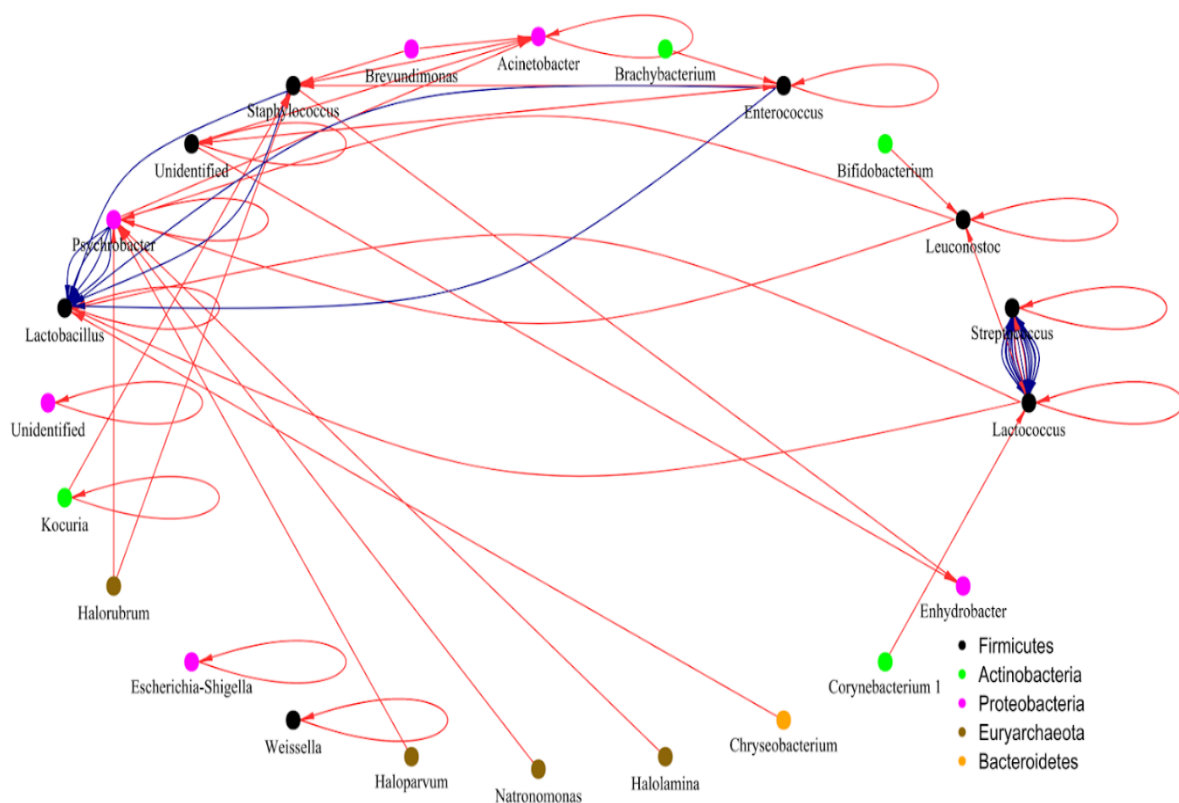


Figura 13: Representação em forma de Grafo das correlações existentes entre a microbiota bacteriana dos pingos e queijos. As setas estão apontadas na direção pingo-queijo com a cor vermelha indicando correlações positivas e a cor azul indicando correlações negativas.

A Figura 14 mostra as correlações mais fortes existentes entre a microbiota bacteriana e a microbiota fúngica dos queijos. De modo geral, são correlações negativas entre ASVs de *Debaryomyces* e ASVs de *Corynebacterium 1* e *Lactobacillus*, com algumas correlações positivas com ASVs de *Psychrobacter*. Todas as ASVs do gênero *Trichosporon* apresentaram correlações positivas com as ASVs 153 (*Lactobacillus*), 64 e 122 (*Streptococcus*). Além disso, foram encontradas algumas correlações positivas com as ASVs 193 (*Lactococcus*), 368 (*Staphylococcus*) e 111 (*Acinetobacter*).

A Figura 15 elucidava todas as correlações entre as microbiotas bacteriana e fúngica dos queijos. Foi possível observar que a maioria das correlações acontecem com ASVs de *Debaryomyces*. Foram observadas correlações negativas para bactérias do gênero *Corynebacterium 1*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bavariicoccus* e positivas para *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Weissella*, *Psychrobacter*, *Tetragenococcus*, *Enhydrobacter* e *Rothia*. Ainda, alguns

gêneros apresentaram ASVs com correlações positivas e outras negativas, como: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Brachybacterium*, *Streptococcus*, *Kocuria*, *Brevibacterium* e *Arthrobacter*.

É interessante observar as mudanças do tipo de correlação para os outros gêneros de fungos. Como o gênero *Lactococcus* que possui um maior número de ASVs positivamente correlacionadas com *Debaryomyces* e *Kluyveromyces*, entretanto é negativamente correlacionado com *Trichosporon*. O mesmo padrão é observado para o gênero *Leuconostoc*. Já os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* possuem grandes quantidades de ASVs com correlações negativas com *Debaryomyces* e é positivamente correlacionado com *Kluyveromyces* e *Trichosporon*. O gênero *Streptococcus* possui tanto correlações positivas quanto negativas com *Debaryomyces* e somente correlações positivas com *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e *Torulaspora*. O gênero *Kocuria* apresentou microrganismos com correlações positivas com *Trichosporon* e negativas com *Kluyveromyces* e ambas com *Debaryomyces*.

De modo geral, as correlações com os fungos do gênero *Debaryomyces* e *Trichosporon* são inversas, o que pode significar que existem pelo menos dois tipos de queijos diferentes, marcados pela presença destes fungos. Ainda, apesar de todos os queijos apresentarem o gênero *Debaryomyces*, somente uma parcela também apresentou *Trichosporon*.

Apesar de muitos queijos utilizarem fungos durante sua maturação, seu uso nos queijos Canastra não é considerado tradicional. Entretanto, a produção de queijos que são deixados formar uma casca fungada (*Bloomy*, no inglês) vem crescendo e se estabelecendo na Serra da Canastra. Há produtores que consideram a presença de fungos na casca dos queijos uma característica negativa e há produtores que mantêm uma umidade maior na sala de maturação para favorecer o crescimento de fungos (observação em campo, e relatos de produtores para a equipe de trabalho), resultando em um produto diferenciado dos demais. De certa forma, o crescimento de fungos em queijos, aumenta seu fator de proteólise, resultando num queijo mais macio (MCSWEENEY, 2004). Entretanto, o desconhecimento da natureza desse fungo pelos produtores gera uma preocupação entre eles, resultando na necessidade de estudos futuros para sua identificação e seu melhor entendimento no ambiente de produção dos queijos.

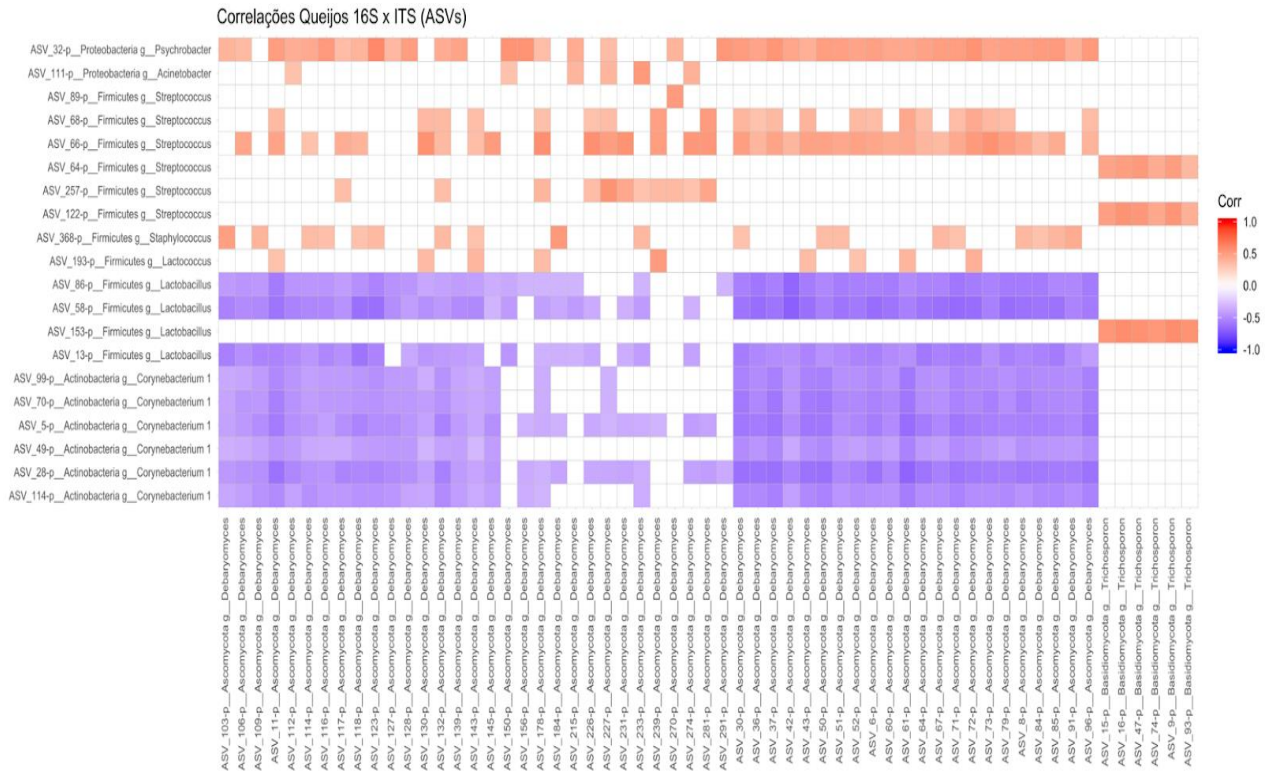


Figura 14: Mapa de calor das correlações entre microbiota fúngica e bacteriana dos queijos. A figura mostra as correlações de spearman significativas ($p < 0,05$) e maiores que 0.5.

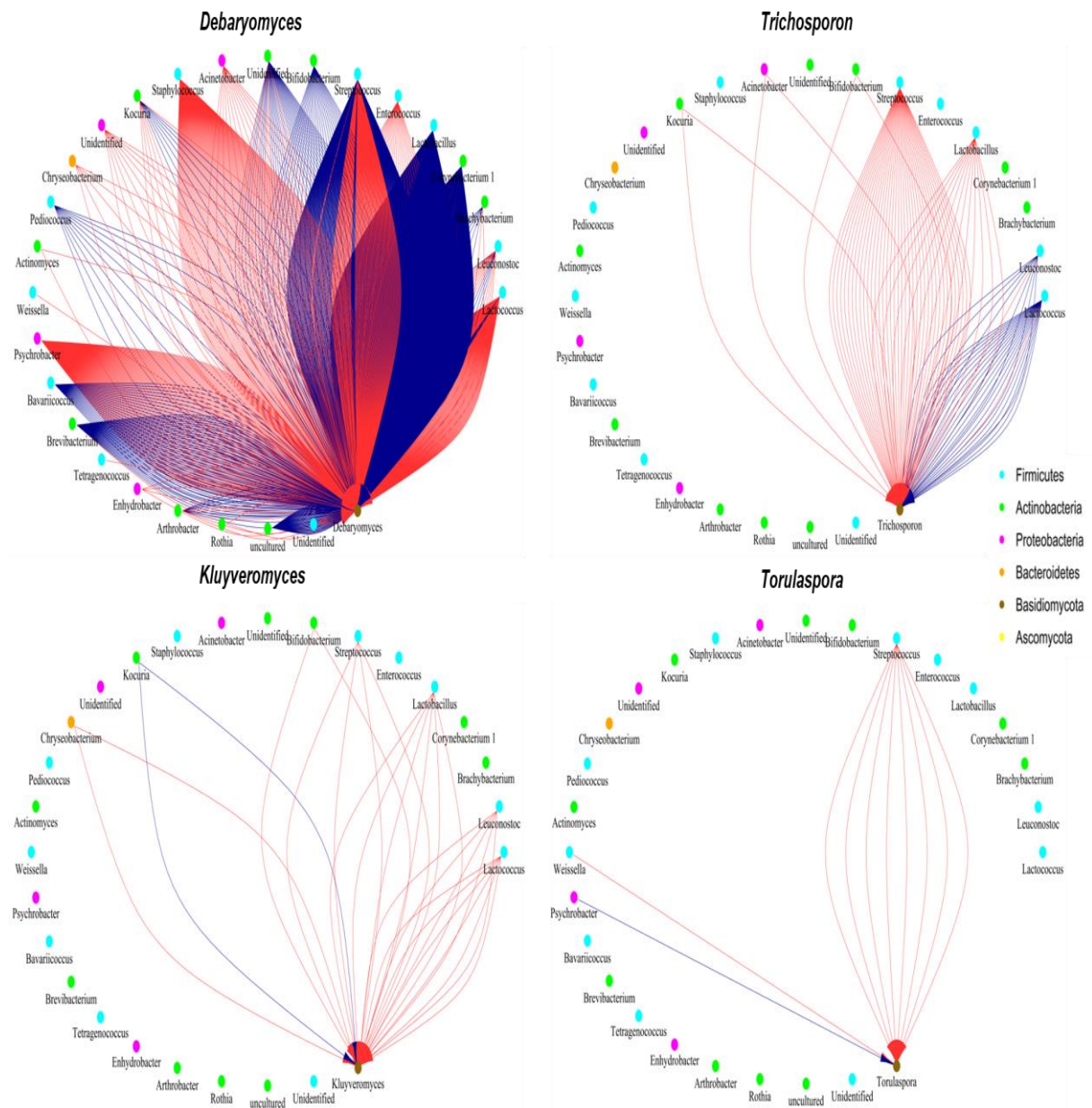


Figura 15: Representação em forma de Grafo das correlações existentes entre a microbiota bacteriana e fúngica dos queijos. As setas estão apontadas na direção bactéria-fungo com a cor vermelha indicando correlações positivas e a cor azul indicando correlações negativas.

6.7 Marcadores de Boas Práticas de Fabricação

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são procedimentos aplicados durante a fabricação de um produto que auxiliam na produção de um alimento mais seguro, livre de contaminações e de melhor qualidade (IMA, 2002). A partir da coleta de dados sobre o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), práticas de higiene pessoal, práticas de higiene durante a ordenha e práticas de higiene na queijaria e durante a produção dos queijos, criamos uma escala de pontuação para esses produtores, normalizada entre 0 (BPF baixa) e 10 (BPF alta). Assim, obtivemos uma distribuição das amostras de pingos e queijos obtidas de acordo com esta pontuação das BPF de seu produtor (Tabela 9).

A análise dessas pontuações para cada ASV bacteriana encontrada nos pingos e queijos revelou que algumas ASVs estão mais presentes em produtores com pontuações altas de BPF, enquanto outras estão mais presente em produtores com baixas pontuações. A Figura 16 e 18 mostram 2 ASVs que podem ser possíveis marcadores das práticas de produção, medidas no pingo e no queijo Canastra, respectivamente. O gênero *Streptococcus*, detectado como ASV 14, foi encontrado em quantidades menores em amostras de produtores com pontuações baixas de BPF (0 a 4) e em quantidades maiores em produtores com pontuações mais altas (5 a 10). Ainda, a ASV 16, identificada como sendo da espécie *Kocuria kristinae*, foi observada com quantidades maiores em produtores com baixas pontuações de BPF, podendo ser considerada como um possível marcador de pingos e queijos de baixa qualidade. Investigação futura ainda é necessária para confirmar o uso destas ASVs como marcadores de qualidade e segurança dos queijos produzidos na Serra da Canastra.

A Figura 17 também mostra outras duas ASVs identificadas como *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (ASV 2) e *Staphylococcus* (ASV 56). A ASV 2 segue o mesmo padrão da ASV 14, de mesmo gênero, com quantidades maiores sendo encontradas em amostras de queijos de produtores com pontuações altas de BPF. A ASV 56 foi identificada como pertencente ao gênero *Staphylococcus*, ao qual fazem parte microrganismos com potencial patogênico e são vistos como contaminantes no processo de produção de queijos, apesar de sua presença no processo de produção de queijos artesanais possa influenciar as características sensoriais do produto final (AQUILANTI *et al.*, 2007). Ainda, é

possível que presença dessa ASV em amostras ligadas a menores pontuações de BPF seja um indicativo de que este microrganismo esteja entrando no meio de produção por alguma fonte de contaminação, e assim como a ASV 16, esse também poderia ser um possível marcador de baixa qualidade em queijos.

Tabela 9: Distribuição das amostras de pingos e queijos obtidas de acordo com a pontuação das BPF de seu produtor.

Pontuação de BPF	N° de amostras de pingo	N° de amostras de queijo
0	4	3
1	23	20
2	10	6
3	5	5
4	3	2
5	6	5
6	7	5
7	15	14
8	8	7
9	3	3
10	1	1

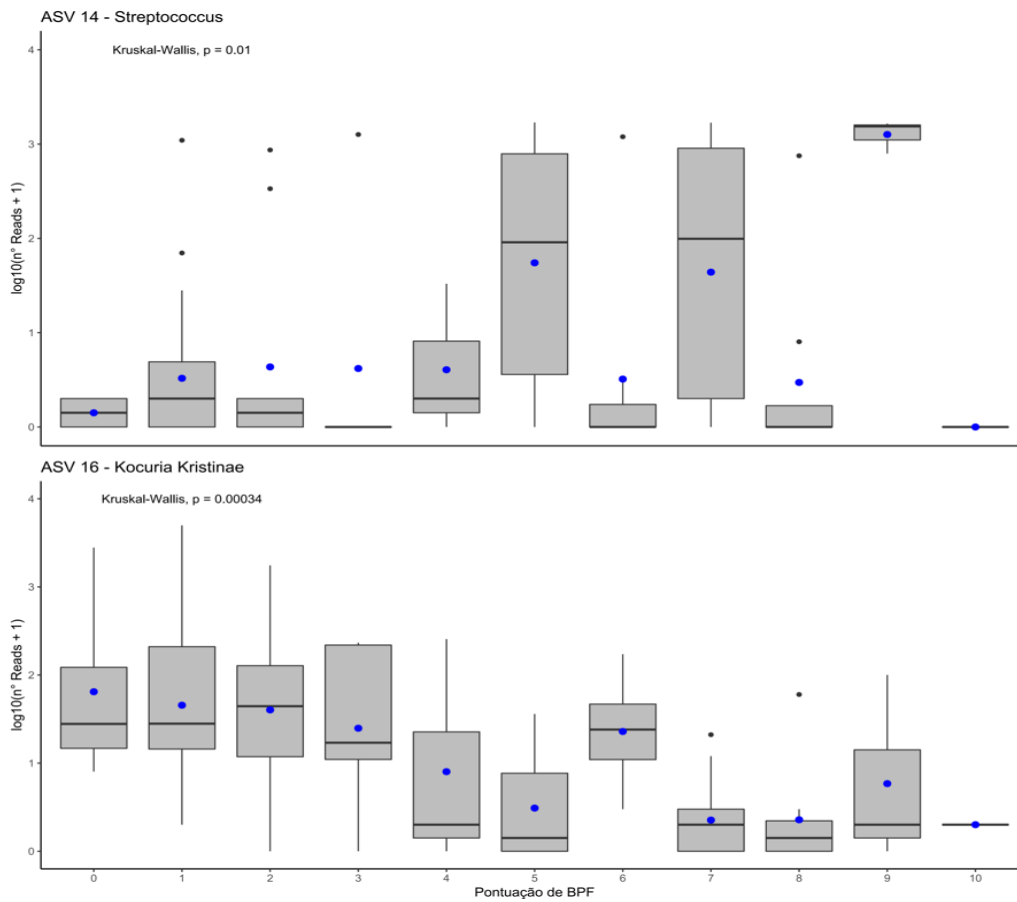


Figura 16: Boxplots mostrando a relação de táxons bacterianos com as pontuações de boas práticas de fabricação em amostras de pingo. As caixas denotam o intervalo interquartil (IIQ) entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha cortando a caixa representa a mediana (2º quartil). Os fios de bigode mostram os limites inferiores e superiores dos dados que estão dentro de 1.5 x IIQ. Os pontos azuis indicam a média e os pontos pretos são discrepantes.

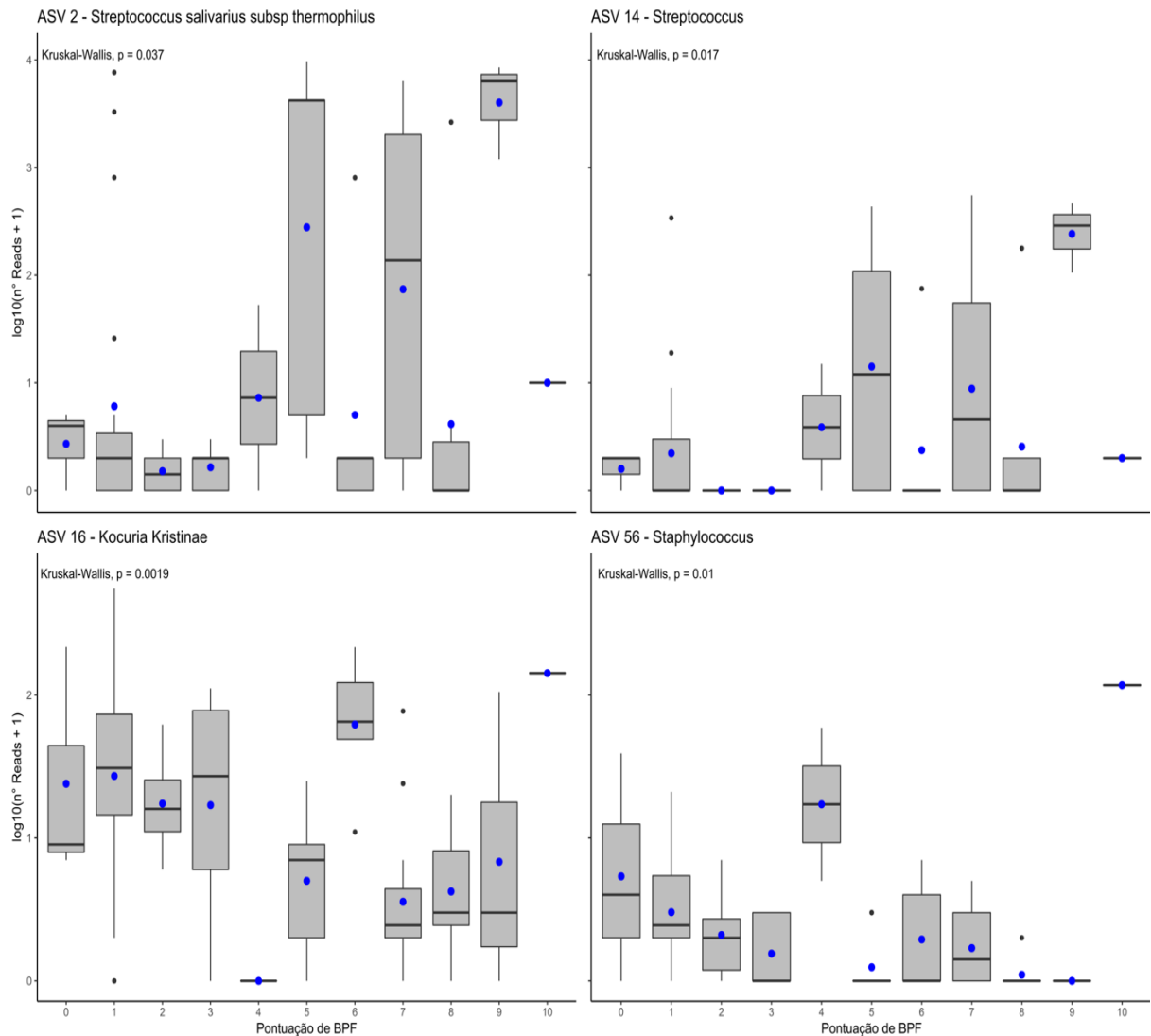


Figura 17: Boxplots mostrando a relação de táxons bacterianos com as pontuações de boas práticas de fabricação em amostras de queijo. As caixas denotam o intervalo interquartil (IIQ) entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha cortando a caixa representa a mediana (2° quartil). Os fios de bigode mostram os limites inferiores e superiores dos dados que estão dentro de 1.5 x IIQ. Os pontos azuis indicam a média e os pontos pretos são discrepantes.

6.8 Influência sazonal sobre a microbiota dos pingos e queijos

Uma análise sazonal ideal contemplaria a coleta de amostras de um mesmo produtor durante vários períodos do ano. Apesar de nossa amostragem não ter sido realizada de tal forma, coletamos amostras de diversos produtores dentro da região da Serra da Canastra e, num aspecto global, esperamos que as principais diferenças causadas pela sazonalidade possam ser visíveis nos pingos e queijos da região.

A fim de compreendermos melhor as variações ocorridas no decorrer da coleta, foram aferidas as temperaturas nas queijarias durante o período de maturação, fornecendo um perfil de mudança de temperatura durante todo o período da coleta. Houve um aumento da temperatura na sala de maturação dos queijos e uma diminuição concomitante do pH dos pingos durante o período de amostragem (Figura 18). Essas alterações ao longo do ano podem resultar em uma alteração da microbiota dos queijos, fazendo com que queijos possuam características microbiológicas e sensoriais diferentes em cada época do ano.

Por meio da observação dos dados pluviométricos de 2010 das cidades de Medeiros e São Roque de Minas (GUIMARÃES; DOS REIS; LANDAU, 2010) concluímos que entre Julho e Setembro de 2017 ocorreu um período com menores índices pluviométricos (período da seca) e maiores índices pluviométricos entre Outubro 2017 e Março de 2018 (período chuvoso), voltando a um período de menores índices a partir de Abril de 2018.

Procurando elucidar essas mudanças temporais, buscamos ASVs presentes nos pingos (Figura 19) e nos queijos (Figura 20 e 22) que representam a mudança ao decorrer dos meses durante o período de coleta. Identificamos que táxons bacterianos de *Streptococcus* tem flutuações nos pingos durante o decorrer do ano (Figura 19). Nos queijos, identificamos táxons bacterianos de *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Figura 20), e táxons fúngicos de *Debaryomyces* e *Trichosporon* (Figura 21).

Os táxons de *Streptococcus* que demarcam essa mudança sazonal no pingo começam em quantidades baixas durante o período da seca (PS) e aumentam no período chuvoso (PC), com dois padrões: as ASVs 4, 6,11 e 18 continuam em grandes quantidades até o final do PC enquanto que as ASVs 2 e 14 apresentam

maiores quantidades em Outubro e Novembro e tendem a diminuir com o término do PC (Figura 19).

Nos queijos (Figura 20), a alteração das ASVs 2 e 4 de *Streptococcus* segue o mesmo padrão do pingo (Figura 19). Para a ASV 1 (*Lactococcus*), ocorreram grandes quantidades durante o início da amostragem e quase todo o PC, com uma queda em seu término e início do novo PS. Da mesma forma, a ASV 7 (*Leuconostoc*) também teve quantidades maiores durante o PC, com uma queda em seu término e início do novo PS. Isso nos indica que a sazonalidade pode ser um fator da Serra da Canastra que modula as quantidades de *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* nos queijos, resultando em características únicas de cada período.

A microbiota fúngica dos queijos é colonizada por grandes proporções da ASV 1f (*Debaryomyces hansenii*) durante todo o ano, entretanto, há outros táxons de *Debaryomyces* e *Trichosporon* com variações significativas (Figura 21). Podemos observar que as ASVs 6f e 11f (*Debaryomyces hansenii*) apresentam quantidades maiores entre Julho de 2017 e Outubro 2017, após isso suas quantidades caem drasticamente e começam a surgir táxons de *Trichosporon* (ASVs 4f e 9f). Esses resultados nos indicam que tanto a microbiota bacteriana quanto a microbiota fúngica dos queijos sofrem um processo de transição entre os períodos da seca e das águas.

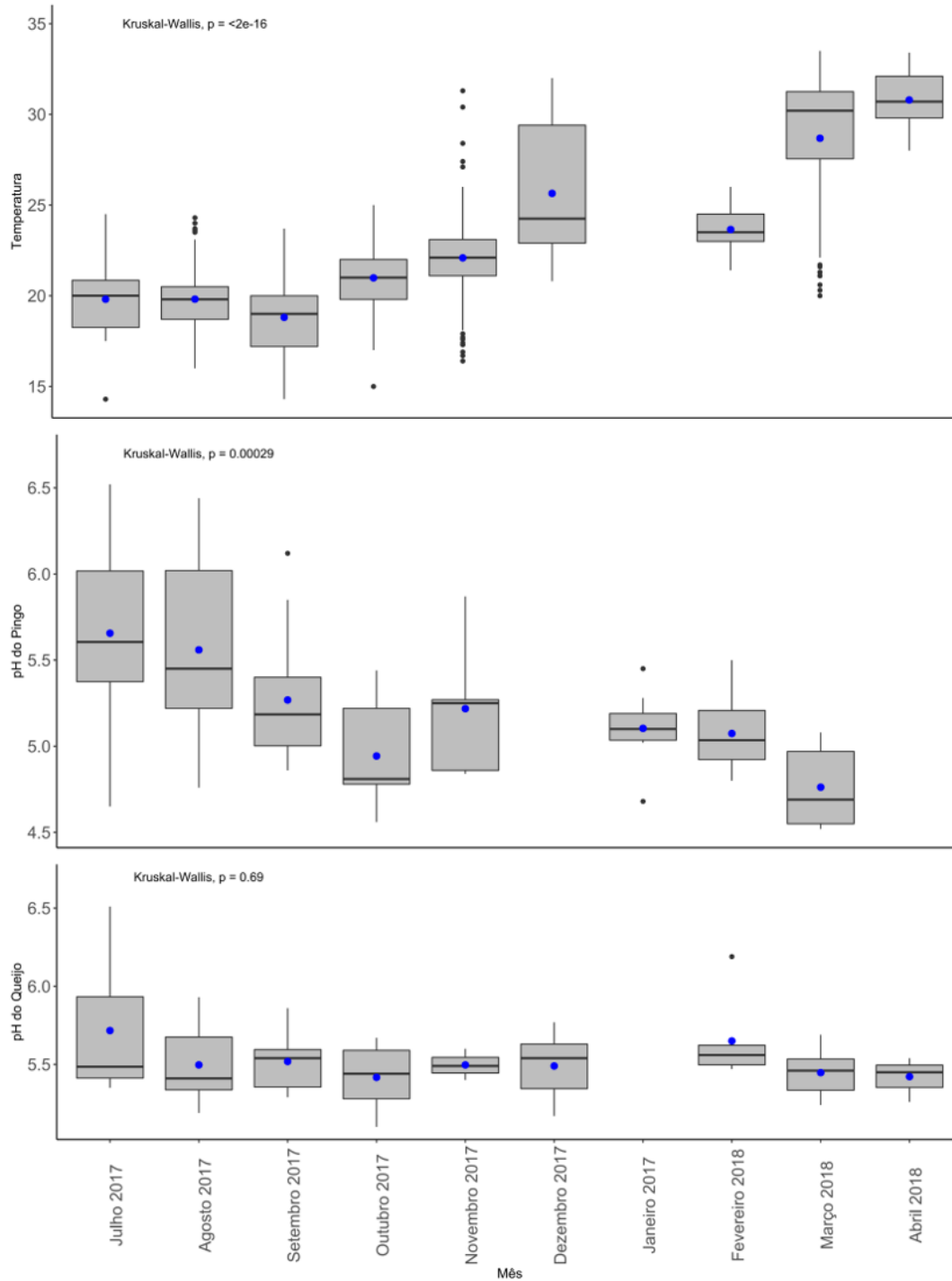


Figura 18: Variação da temperatura nas queijarias e do pH dos pingos e queijos durante o período de coleta. As caixas denotam o intervalo interquartil (IIQ) entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha cortando a caixa representa a mediana (2º quartil). Os fios de bigode mostram os limites inferiores e superiores dos dados que estão dentro de 1.5 x IIQ. Os pontos azuis indicam a média e os pontos pretos são discrepantes.

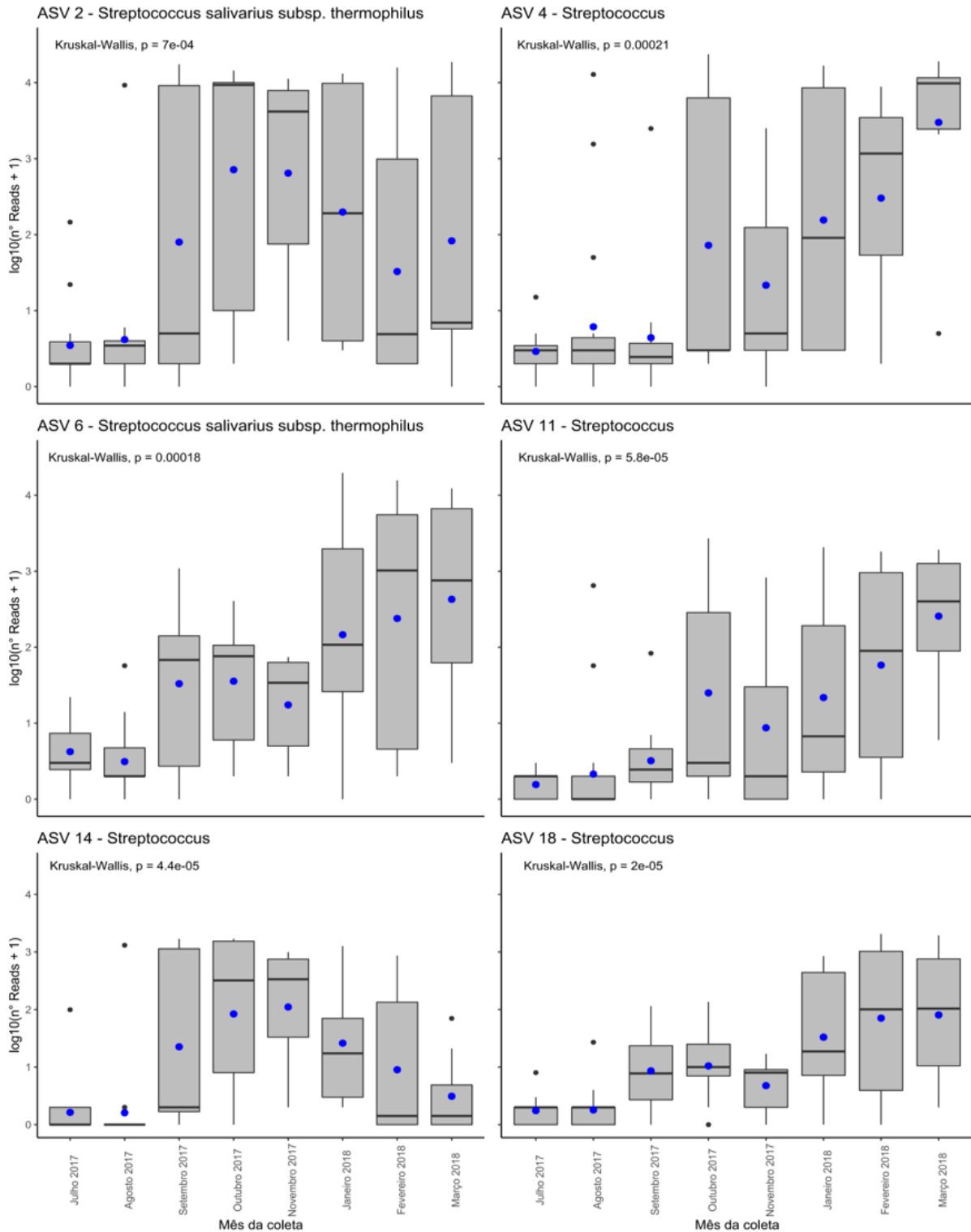


Figura 19: Boxplots mostrando a relação de táxons de Streptococcus com os meses de coleta em amostras de pingo. As caixas denotam o intervalo interquartil (IIQ) entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha cortando a caixa representa a mediana (2° quartil). Os fios de bigode mostram os limites inferiores e superiores dos dados que estão dentro de 1.5 x IIQ. Os pontos azuis indicam a média e os pontos pretos são discrepantes.

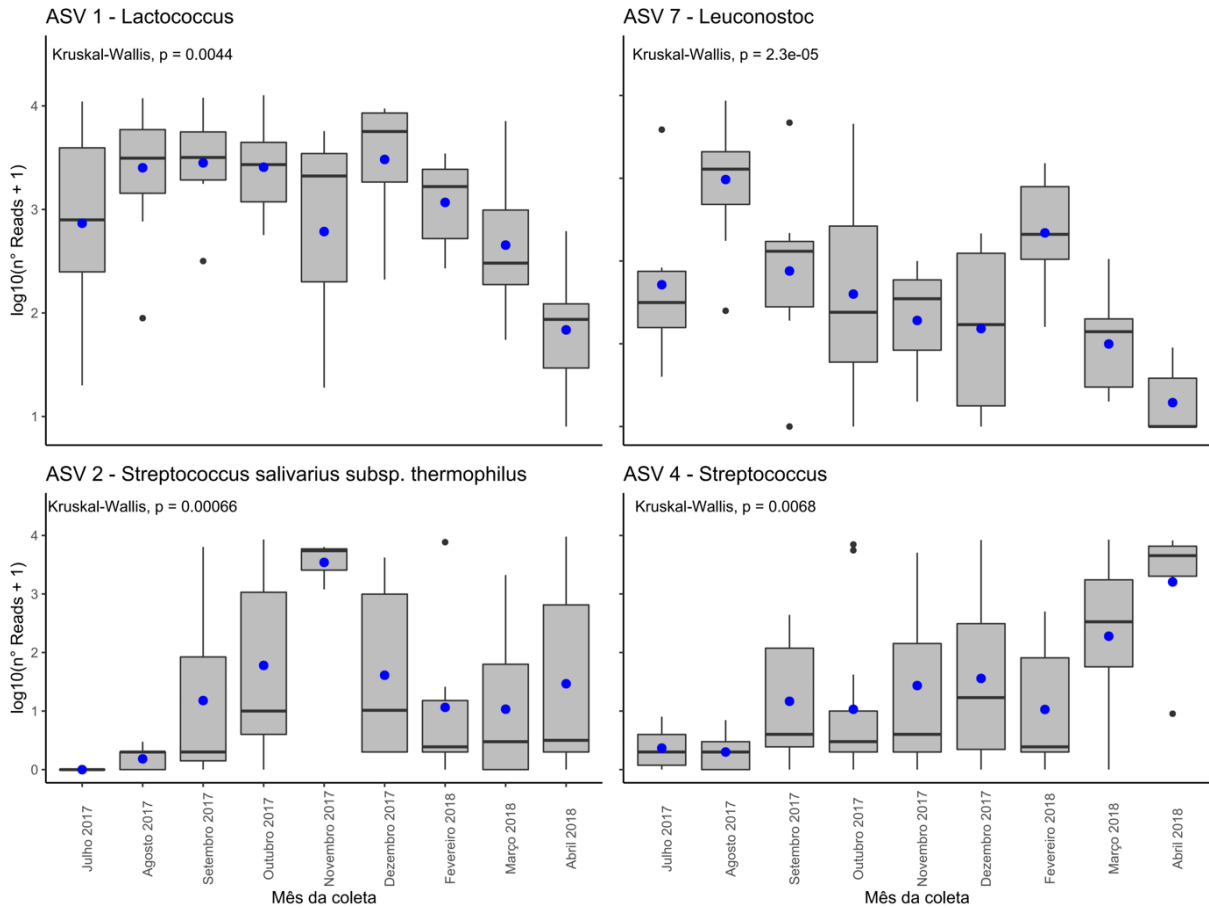


Figura 20: Boxplots mostrando a relação de táxons bacterianos com os meses de coleta em amostras de queijo. As caixas denotam o intervalo interquartil (IIQ) entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha cortando a caixa representa a mediana (2º quartil). Os fios de bigode mostram os limites inferiores e superiores dos dados que estão dentro de 1.5 x IIQ. Os pontos azuis indicam a média e os pontos pretos são discrepantes.

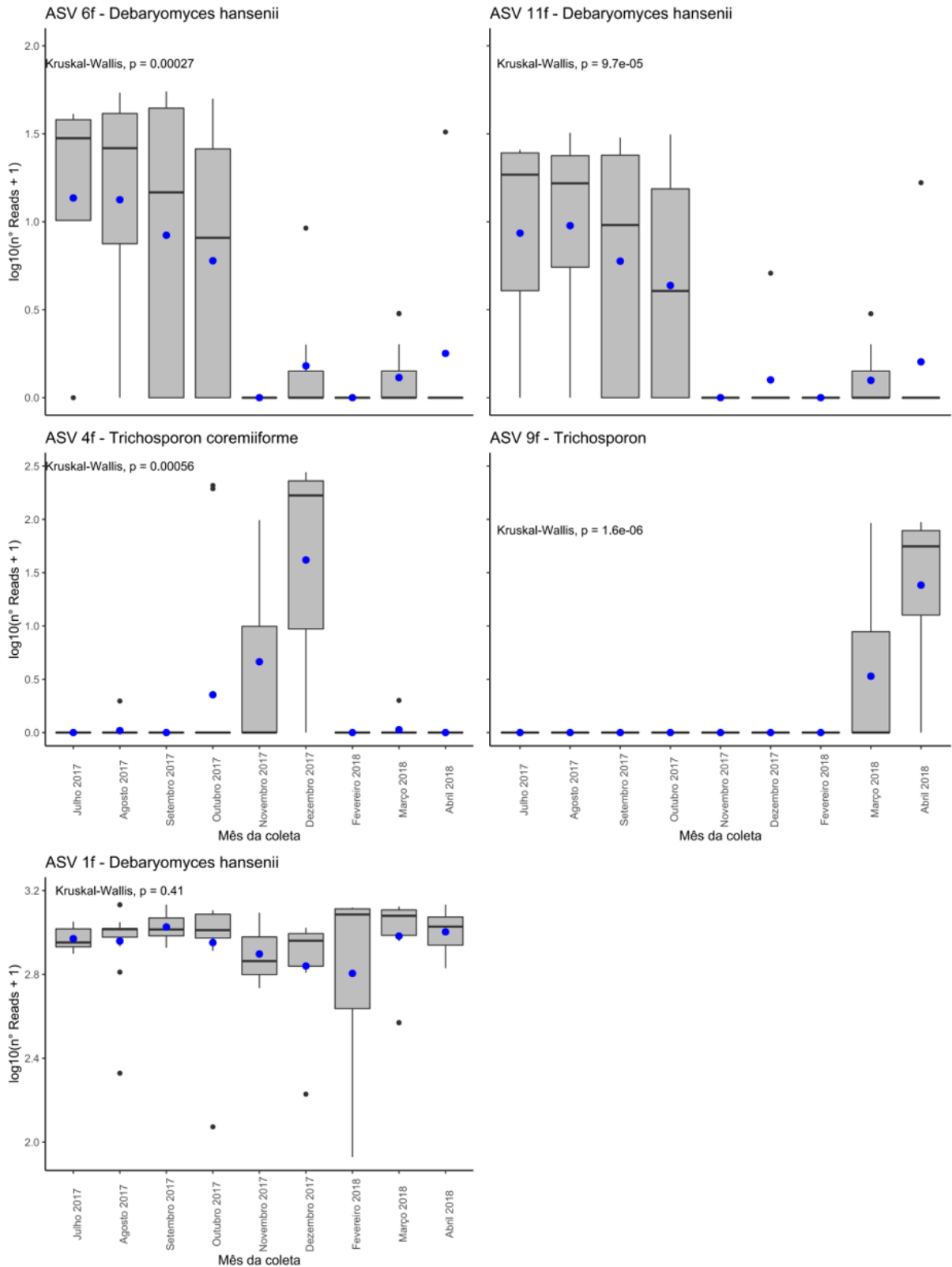


Figura 21: Boxplots mostrando a relação de táxons fúngicos com os meses de coleta em amostras de queijo. As caixas denotam o intervalo interquartil (IIQ) entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha cortando a caixa representa a mediana (2° quartil). Os fios de bigode mostram os limites inferiores e superiores dos dados que estão dentro de 1.5 x IIQ. Os pontos azuis indicam a média e os pontos pretos são discrepantes.

6.9 Os queijos Canastra possuem uma microbiota diversa que difere de outros queijos do Brasil e do Mundo.

A produção de queijos tem uma importância econômica muito grande em vários países do mundo. Sua diversidade no modo de fazer, nos ingredientes utilizados e na microbiota local faz com que seja possível a elaboração de centenas de queijos diferentes, cada um podendo apresentar características únicas que representam sua origem. Isso torna esses queijos parte importante da economia e cultura local das regiões produtoras (AUGUSTYN *et al.*, 2019). No mundo encontramos queijos como provolone (França), Grana Padano (Itália), Herve (Bélgica) e Pico (Portugal) sendo somente uma pequena parcela dos queijos com grande importância econômica (DOOR, 2019). No Brasil, temos somente 3 queijos com indicações de procedência: os queijos do Serro, os queijos da Serra da Canastra e os queijos da Colônia de Witmarsum (INPI, 2016). Contudo, podem ser encontrados muitos outros tipos de queijo em todo o Brasil (KAMIMURA *et al.*, 2019). Somente no estado de Minas Gerais, o principal produtor de queijos artesanais, já são encontrados queijos característicos de 7 regiões: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro (SOARES; RODRIGUES, 2019).

Assim, nosso estudo também foi utilizado para comparar a microbiota dos queijos Canastra com a microbiota de outros queijos do Brasil e de outras partes do mundo. Para tanto, foram selecionados dois conjuntos de dados de grande porte para análise conjunta, totalizando 397 amostras distintas, obtidas de 73 regiões distintas (KAMIMURA *et al.*, 2019; WOLFE *et al.*, 2014).

A comparação de nossas amostras de queijo com as amostras de queijos de outras regiões no mundo (WOLFE *et al.*, 2014) mostrou que a microbiota dos queijos Canastra é diferente da microbiota dos queijos de outras regiões do mundo (Teste adonis, $R^2 = 0.13$, $p < 0.001$) e o pH do queijo é um possível fator responsável por essa diferença (adonis $R^2 = 0.10$ $p < 0.001$) (Figura 22). Essa notável diferença pode ser atribuída a um maior tempo de maturação, ocasionando um aumento do pH devido ao consumo do ácido láctico e alteração da microbiota inicial dos queijos (MCSWEENEY, 2004).

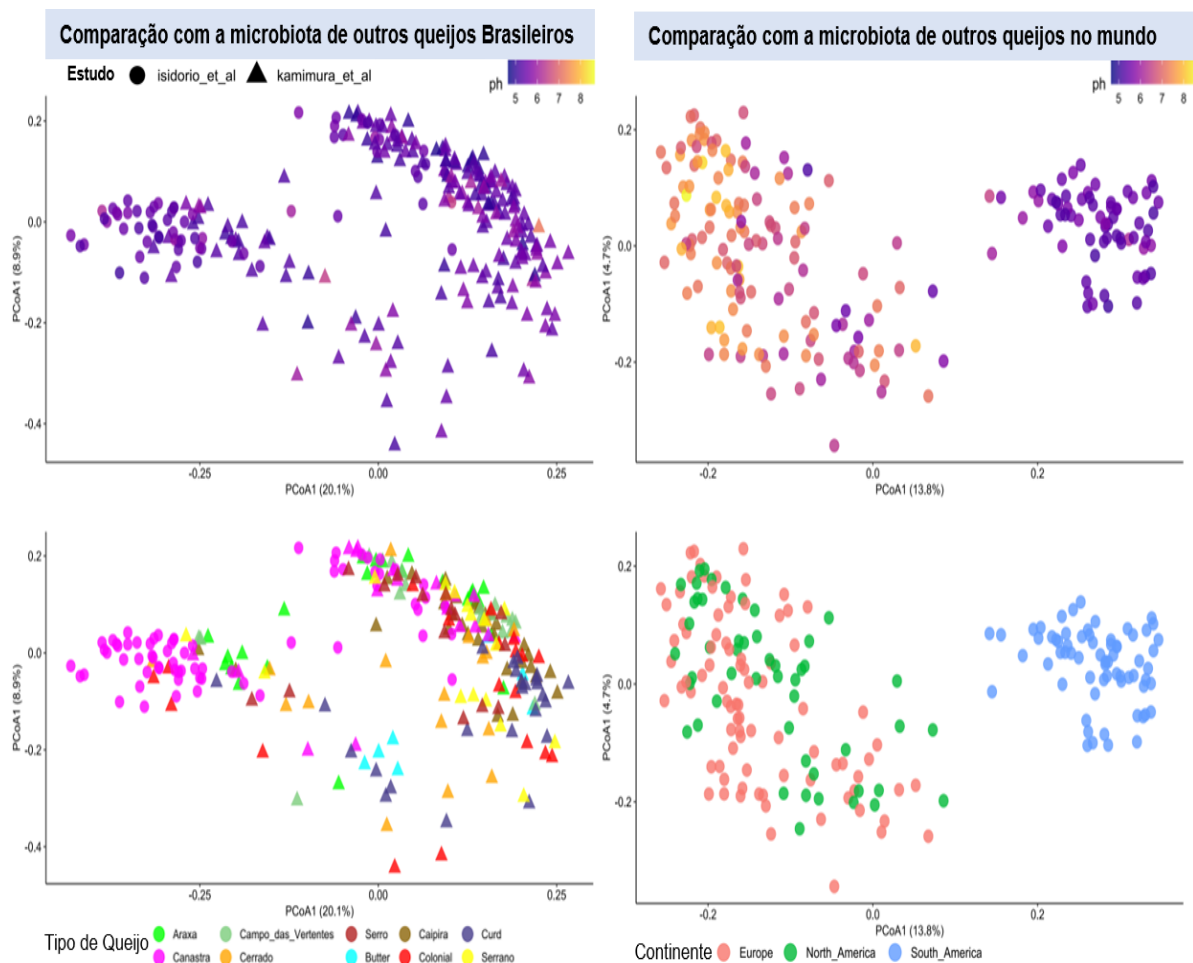


Figura 22: Análise de coordenada principal (PCoA), baseada em distâncias unweighted UNIFRAC (LOZUPONE, C.; KNIGHT, 2005), comparando a microbiota dos queijos analisados com outros do Brasil e do mundo. Os gráficos da esquerda apresentam a comparação dos dados obtidos neste estudo e a microbiota de diversos queijos do Brasil, e à direita uma comparação com queijos europeus e norte americanos. Os gráficos da parte superior estão coloridos de acordo com o pH das amostras, e da parte inferior de acordo com o local de origem.

A variação da microbiota encontrada nos queijos Canastra em nosso estudo mostrou-se menor que a descrita na literatura (KAMIMURA *et al.*, 2019). Entretanto, as médias das distâncias entre as amostras de queijos Canastra dos dois estudos são próximas (Figura 23). As amostras obtidas neste estudo foram coletadas *in loco*, de forma contínua durante 10 meses, e os queijos tinham 22 dias de maturação (média: 22.05 ± 4.34), enquanto que Kamimura *et al* (2019) utilizaram amostras elaboradas de grupos de queijos ditos homogêneos, considerando sua procedência e modo de fabricação, o que talvez possa contribuir para a diferença observada. Além disso, a microbiota dos queijos Canastra em nosso estudo foi mais similar aos queijos produzidos no estado de Minas Gerais que aos queijos produzidos em outros

estados (Figura 24). Ainda os queijos de Araxá foram mais similares com os queijos Canastra de ambos os estudos.

A maior similaridade observada entre os queijos Canastra e os queijos Araxá pode ser explicada pela sua proximidade geográfica (Figura 2) e pelo seu modo de fazer similar (IPHAN, 2014). Devido a esses mesmos fatores, podemos explicar as maiores similaridades entre os queijos Canastra e os outros queijos artesanais do estado de Minas Gerais.

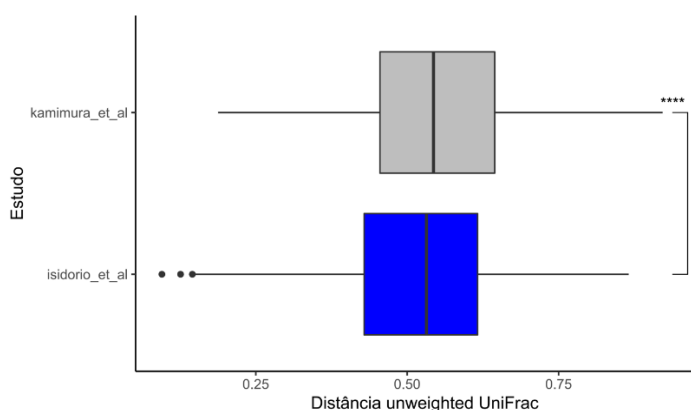


Figura 23: Comparação das distâncias intra-grupo das amostras de queijo Canastra com dados da literatura (KAMIMURA *et al.*, 2019). A média das distâncias no estudo de Kamimura foi 0.55 e em nosso estudo foi 0.52. **** indica um valor $p < 0.0001$.

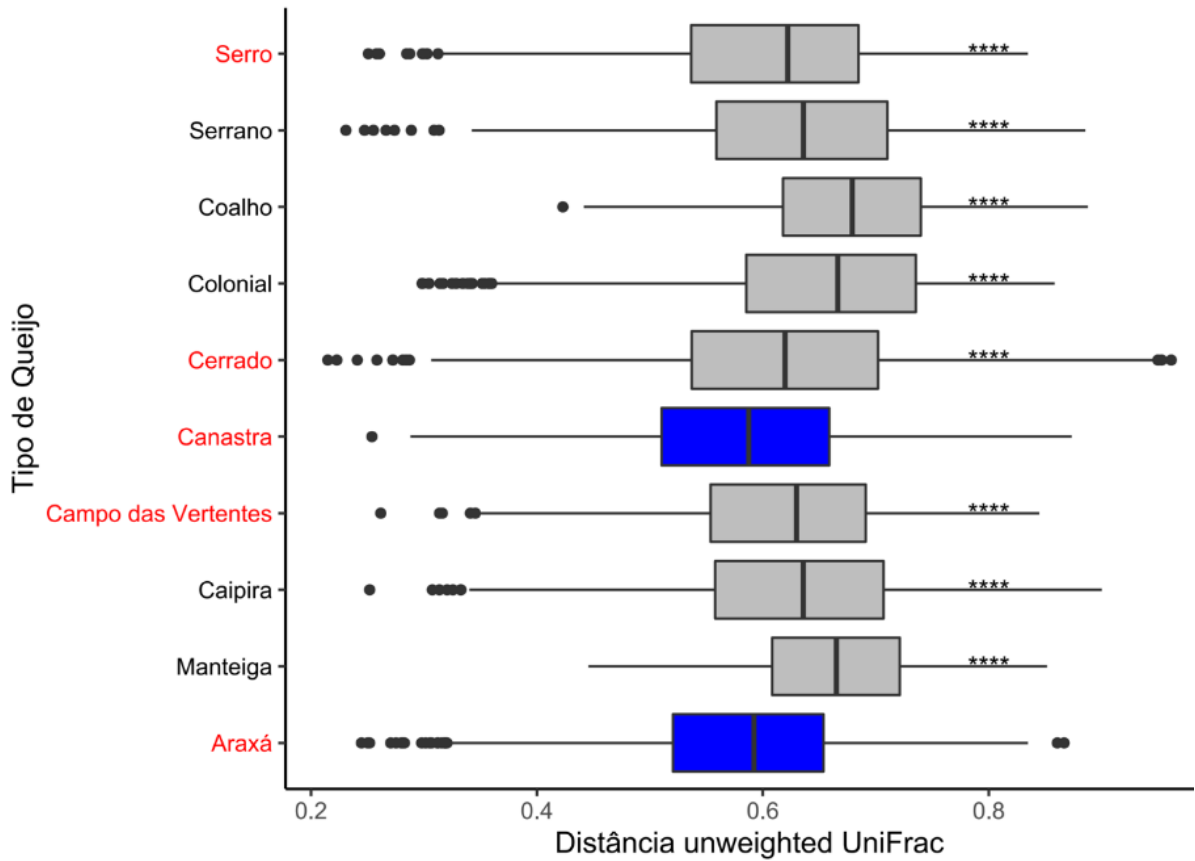


Figura 24: Comparação das distâncias UNIFRAC entre as amostras de queijo Canastras deste estudo e de dados da literatura (KAMIMURA *et al.*, 2019). A cor vermelha nos nomes dos tipos de queijos denotam queijos produzidos no estado de Minas Gerais. Foi aplicado o teste de Wilcoxon entre os queijos Canastra e cada um dos outros tipos de queijo: as caixas azuis indicam os testes que não tiveram diferença significativa e os asteriscos indicam um valor de $p < 0.0001$.

7. Conclusões e Perspectivas Futuras

O queijo Canastra possui grande importância na cultura e economia local, sendo parte do Patrimônio Imaterial do Brasil (IPHAN, 2014) e possuindo o selo de produto com designação de origem desde 2012 (INPI, 2016).

Nosso estudo caracterizou a microbiota dos pingos e queijos da Serra da Canastra, e da relação entre suas microbiotas através da utilização de técnicas avançadas de sequenciamento em larga escala. A partir dos dados obtidos do sequenciamento, dos questionários realizados com os produtores e das análises físico-químicas realizadas nas amostras, identificamos suas relações com as boas práticas de fabricação aplicadas nas queijarias e obtivemos um vislumbre das modificações que podem ocorrer na microbiota dos pingos e queijos no decorrer do ano. Além disso, fizemos uma comparação nossos dados da microbiota bacteriana com dados da microbiota de outros queijos brasileiros e do mundo disponíveis na literatura.

As principais bactérias identificadas em amostras de pingo pertencem aos gêneros *Lactococcus* (45.6%), *Streptococcus* (30.3%), *Staphylococcus* (5.1%), e em amostras de queijo, aos gêneros *Lactococcus* (22.5%), *Streptococcus* (27.2%), *Corynebacterium* (18.8%), *Staphylococcus* (13.6%), *Leuconostoc* (6.3%) e *Weissella* (6%). Os principais gêneros de fungos identificados nos queijos foram *Debaryomyces* (78.6%) e *Trichosporon* (7.8%).

Observamos que 64% das ASVs encontradas nos queijos também foram encontradas nos pingos, indicando a forte relação entre a microbiota dos pingos e dos queijos. Confirmamos essa relação pela comparação das distâncias UniFrac dos pingos e queijos, e também descobrimos que a microbiota bacteriana do pingo parece modular a microbiota fúngica dos queijos.

Através da análise das proporções de microrganismos na microbiota de nossas amostras, observamos uma separação da microbiota causada pela distância geográfica entre elas. A nossa análise correlacionou a distância geográfica com a distância filogenética entre os microbiomas dos pingos ($p = 0.003$, $r = 0.31$) e mostrou uma tendência para a relação espacial com o microbioma dos queijos ($p = 0.083$, $r=0.21$). A prática de troca de pingo entre produtores próximos, quando um deles apresenta algum problema de produção atribuído ao pingo, poderia explicar essa semelhança entre a microbiota de pingos de produtores mais próximos.

As boas práticas de fabricação, a infraestrutura da queijaria, o cadastro no IMA, a cidade de produção, a semana de coleta, o pH, o valor do queijo, a salinidade do pingo, e a atividade de água e umidade dos queijos são variáveis que influenciam a microbiota bacteriana dos pingos e queijos. A microbiota fúngica dos queijos também foi influenciada por essas variáveis, entretanto, ela também mostrou correlação significativa com a altitude da localidade de produção, e não exibiu correlações com a umidade e o pH do queijo. Além disso, o pH do pingo foi uma variável que apresentou relações com a composição da microbiota fúngica dos queijos. Com isso, consideramos o pH do pingo sendo uma variável indicativa de sua microbiota que, como demonstrado, pode ser responsável pela modulação da microbiota fúngica dos queijos.

Com o intuito de evidenciar as relações mais específicas entre táxons presentes no pingo e aqueles presentes no queijo, construímos uma representação por grafos das correlações detectadas. A presença de *Escherichia-Shigella*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactococcus* nos queijos são ocasionadas devido à sua presença também no pingo, indicando que uma contaminação do pingo pode resultar na contaminação do queijo por microrganismos indesejados. Também foi possível observar que gêneros ligados à alta salinidade, tais como *Halolamina* e *Haloparvum*, apresentam correlações positivas com a presença de *Psychrobacter* no queijo. Além disso, a presença de *Psychrobacter* no pingo é negativamente correlacionada com a presença de *Lactobacillus* no queijo e positivamente correlacionada com a presença de *Enterococcus* no queijo.

Para atenuar os efeitos dos microrganismos deteriorantes de queijo, os produtores adicionam uma maior quantidade de sal em seus queijos, resultando num pingo com maior salinidade e alterando tanto sua microbiota quanto a microbiota do queijo. Essa prática poderia explicar o aumento de *Psychrobacter* e *Enterococcus* e diminuição de *Lactobacillus* nas amostras de queijo.

A análise das correlações entre as bactérias e fungos dos queijos nos mostrou que táxons de *Debaryomyces* são responsáveis pela maioria das interações com as bactérias nos queijos, porém também ocorreram correlações com *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e *Torulaspota*.

Em geral, Táxons de *Debaryomyces* foram positivamente correlacionados *Lactococcus* e *Leuconostoc*, negativamente correlacionados com *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Adicionalmente, apresentaram um grande número de correlações positivas e negativas com *Kocuria* e *Streptococcus*. Já os microrganismos do gênero *Kluyveromyces* apresentaram correlações positivas com *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e negativas com *Kocuria*. Os microrganismos do gênero *Trichosporon* apresentaram correlações positivas com *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Kocuria*, e negativas com *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Por fim, os microrganismos do gênero *Torulaspota* apresentaram correlações positivas com *Streptococcus*.

Logo, pudemos observar duas redes principais nos queijos: a primeira com a presença de ASVs de *Debaryomyces* que são positivamente correlacionados com ASVs de *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e negativamente correlacionados com ASVs de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; e uma segunda rede com ASVs de *Trichosporon* que apresentam correlações inversas daquelas citadas para *Debaryomyces*. Essas correlações nos indicaram a existência de pelo menos dois tipos de queijos diferentes, um resultando das interações com *Debaryomyces* e outro das interações com *Trichosporon*.

Por meio das pontuações criadas para as BPF, conseguimos identificar que os pingos e queijos de produtores com baixas pontuações continham quantidades maiores de *Kocuria kristinae* (ASV 16) e menores de *Streptococcus* (ASV 14). Também identificamos quantidades maiores quantidades de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (ASV 2) foram encontradas em produtores com pontuações altas de BPF e *Staphylococcus* (ASV 56) em produtores pontuações com pontuações baixas.

A ASV 16 (*Kocuria kristinae*) demonstrou um melhor potencial que a ASV 56 (*Staphylococcus*) para ser utilizado como um microrganismo marcador de queijos de baixa qualidade, visto que foi encontrado tanto nos pingos quanto nos queijos e obtivemos melhores resultados com ela. O uso destas espécies como marcadores ainda requer uma investigação mais profunda para determinar sua efetiva utilidade como marcador de qualidade e segurança dos queijos produzidos na Serra da Canastra.

Nossa amostragem compreendeu os meses entre Julho de 2017 e Abril 2018, logo, tivemos amostras do período das secas (Julho 2017 - Setembro 2017), do período das águas (Outubro 2017 - Março 2018), com um retorno do período das secas (Abril 2018). Durante esse período identificamos um aumento da temperatura dentro da queijaria e uma diminuição do pH dos pingos. Esses fatores indicam que a sazonalidade tem um forte influência na microbiota dos pingos e queijos.

A análise das ASVs bacterianas durante esse período nos permitiu observar que as amostras de pingo passam por uma transição entre táxons de *Streptococcus*. Esse padrão de transição também foi observado para os queijos, entretanto, táxons de *Lactococcus* e *Leuconostoc* também apresentaram variações, com uma queda nos últimos 3 meses, enquanto que as quantidades de táxons de *Streptococcus* aumentaram no mesmo período.

A partir da análise das ASVs fúngicas dos queijos, foi observado que todos os queijos possuem uma microbiota dominada pela ASV 1f (*Debaryomyces hansenii*). Entretanto, a presença de outras ASVs de *Debaryomyces* e ASVs de *Trichosporon* revelam a variação sazonal na microbiota fúngica dos queijos. Estes dados ainda precisam ser confirmados com amostragens de maior duração temporal, incluindo amostragens repetidas nos mesmos produtores.

A existência de perfis diferentes de queijos devido a sazonalidade possibilita a comercialização de dois tipos de queijos diferentes por um mesmo produtor, um queijo do período das águas e outro do período da seca, cada uma possuindo características únicas. Uma caracterização sensorial dos queijos dos dois períodos com a identificação de suas discrepâncias poderia abrir novos mercados para os queijos Canastra.

Por fim, identificamos que a microbiota dos queijos Canastra possui uma microbiota mais similar aos outros queijos produzidos no estado de Minas Gerais que aos queijos produzidos em outras regiões do Brasil. Com exceção dos queijos produzidos no Cerrado, os quais apresentaram uma microbiota com alta diversidade. Também mostramos que os queijos Canastra amostrados possuem uma microbiota diferente dos queijos de outras regiões do mundo, sendo que seu pH mais ácido pode ser o fator que segrega essa microbiota.

A partir de nossos resultados, conseguimos comprovar que os queijos Canastra são diferentes de outros queijos no Brasil e no Mundo, também

apresentando uma diferença entre eles. Essa diferença observada entre queijos de produtores diferentes demonstra a importância da produção artesanal dos queijos, cujos detalhes determinam a característica final de seus produtos. Além disso, o controle da microbiota através da aplicação de boas práticas de ordenha, boas práticas de produção, e a presença de infraestrutura adequada auxiliam na composição de uma microbiota de melhor qualidade para os queijos, aumentando seu valor de mercado e inibindo o crescimento de possíveis contaminantes por meio de uma rede de interações microbianas.

Um melhor entendimento das interações entre microrganismos possibilitaria a construção de rotas de interações específicas para a obtenção de queijo canastra, diminuindo as chances de crescimento de microrganismos deteriorantes e contaminantes, e aumentando a segurança do produto. Finalmente, o estabelecimento destas relações entre microrganismos não acontece necessariamente somente nos queijos canastra, possibilitando a transferência deste conhecimento para outras áreas.

8. Referências Bibliográficas

ALDRETE-TAPIA, A. *et al.* High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*, v. 44, p. 136–141, 2014.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, v. 26, n. 1, p. 32–46, 2001.

AOAC. *AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces*. . [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/aoac_docs/standardsdevelopment/aoac_validation_guidelines_for_food_microbiology-prepub_version.pdf>. Acesso em: 29 maio 2019.

AQUILANTI, L. *et al.* The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 120, n. 1–2, p. 136–145, 30 nov. 2007. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160507003078>>. Acesso em: 29 maio 2019.

AUGUSTYN, A. *et al.* *Cheese*. Disponível em: <<https://www.britannica.com/topic/cheese>>. Acesso em: 28 maio 2019.

BEMFEITO, R. M. *Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra: caracterização sensorial e eletroquímica*. 2016. 134 f. Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, Brasil, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/handle/1/11021>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4, p. 259–274, 2001. Disponível em: <<http://www-sciencedirect-com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0958694601000565>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

BOKULICH, N.; CAPORASO, G. *nbokulich/q2-coordinates: 2018.11*. . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.5281/zenodo.2124295>>. , dez. 2018

BOLYEN, E. *et al.* QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. 3 dez. 2018. Disponível em: <<https://peerj.com/preprints/27295/>>. Acesso em: 28 maio 2019.

BUTTON, J. E.; DUTTON, R. J. Cheese microbes. *Current Biology*, v. 22, n. 15, p. R587–R589, 2012. Disponível em: <<http://www-sciencedirect-com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0960982212006598>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmeth.3869>>. Acesso em: 28 maio 2019.

CALLON, C.; MILLET, L.; MONTEL, M.-C. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, v. 71, n. 2, p. 231–244, maio

2004. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029904000159>. Acesso em: 6 abr. 2017.

CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 421, 15 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/10/421>>. Acesso em: 28 maio 2019.

CAPORASO, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108 Suppl 1, n. Supplement 1, p. 4516–22, 15 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534432>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, From Duplicate 1 (Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms - Caporaso, J Gregory; Lauber, Christian L; Walters, William A; Berg-Lyons, Donna; Huntley, James; Fierer, Noah; Owens, Sarah M; Betley, Jason; Fraser, Louise; Bauer, Markus; Gormley, Niall; Gilbert, Jack A; Smith, Geoff; Knight, Rob) NULL, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22402401>>. Acesso em: 8 mar. 2017.

CHEN, J. *GUniFrac: Generalized UniFrac Distances*. . [S.l.: s.n.]. , 2018

CLARKE, K.; WARWICK, R. A taxonomic distinctness index and its statistical properties. *Journal of Applied Ecology*, v. 35, n. 4, p. 523–531, 1 ago. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2664.1998.3540523.x>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

CLARKE, K.; WARWICK, R. A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Marine Ecology Progress Series*, v. 216, p. 265–278, 6 jul. 2001. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/meps/v216/p265-278/>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

COMISSÃO EUROPÉIA. *Quality policy: Foodstuff and agricultural products*. Disponível em: <https://ec.europa.eu/agriculture/quality/schemes/foodstuff_pt>. Acesso em: 13 abr. 2017a.

COMISSÃO EUROPÉIA. *Queijos Europeus com designação de origem protegidas*. Disponível em: <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?locale=pt&filter.dossierNumber=&filter.comboName=&filterMin.milestone__mask=&filterMin.milestone=&filterMax.milestone__mask=&filterMax.milestone=&filter.country=&filter.category=PDOPGI_CLASS_13&filter>. Acesso em: 13 abr. 2017b.

CROW, V.; CURRY, B.; HAYES, M. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4–7, p. 275–283, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0958694601000577>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

CSARDI, G.; NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal*, v. Complex Sy, p. 1695, 2006. Disponível em:

<<http://igraph.org>>.

DE FILIPPIS, F. *et al.* A Selected Core Microbiome Drives the Early Stages of Three Popular Italian Cheese Manufactures. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e89680, 24 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586960>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

DE MELO, E. *Projeto de Lei 3859/15*. . Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=2058199>>. , 2015

DELCENSERIE, V. *et al.* Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of dairy science*, NULL, v. 97, n. 10, p. 6046–56, out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25064656>>.

DOOR. *DOOR: Database of agricultural products and foods*. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>>. Acesso em: 28 maio 2019.

DRAY, S.; DUFOUR, A.-B. The **ade4** Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, v. 22, n. 4, p. 1–20, 30 set. 2007. Disponível em: <<http://www.jstatsoft.org/v22/i04/>>. Acesso em: 28 maio 2019.

DUGAT-BONY, E. *et al.* Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, v. 238, p. 265–273, 2016.

EMATER. *Caracterização da Microrregião da Canastra como Produtora do Queijo Minas Artesanal*. . São Roque de Minas, MG: [s.n.], 2004. Disponível em: <[http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo_historico/caracterização do queijo canastra.pdf](http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo_historico/caracterização%20do%20queijo%20canastra.pdf)>. Acesso em: 6 abr. 2017.

EMATER. *Mapas do queijo Minas artesanal*. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59>. Acesso em: 6 abr. 2017.

ERCOLINI, D. *et al.* Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 20, p. 7372–81, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803905>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

ERCOLINI, D. *et al.* “Remake” by High-Throughput Sequencing of the Microbiota Involved in the Production of Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 22, p. 8142–8145, 2012.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; QUIRASCO BARUCH, M. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, From Duplicate 1 (Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota - Escobar-Zepeda, Alejandra; Sanchez-Flores, Alejandro; Quirasco Baruch, Maricarmen) NULL, v. 57, p. 116–127, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0740002016000113>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

FAITH, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, v. 61, n. 1, p. 1–10, 1992.

FUKA, M. M. *et al.* Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, 2013.

GARABAL, J. I. Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 1–3, 2007. Disponível em: <<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/9593>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

GATTI, M. *et al.* Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 2, p. 573–591, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0022030213008126>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

GILBERT, J. A.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC biology*, v. 12, n. 69, 22 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184604>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

GOOGLE EARTH. *Google Earth*. . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/>>. , 2018

GOWER, J. C. Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, v. 40, n. 1, p. 33–51, mar. 1975. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02291478>>.

GOWER, J. C. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. *Biometrika*, v. 53, n. 3/4, p. 325, 1966.

GRICE, E. A. *et al.* Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, v. 324, n. 5931, p. 1190–2, 29 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478181>>. Acesso em: 29 maio 2019.

GUIMARÃES, D. P.; DOS REIS, R. J.; LANDAU, E. C. *Índices Pluviométricos em Minas Gerais - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 30*. . Sete Lagoas, MG: [s.n.], 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/879085/1/Bol30.pdf>>.

HAGUINGAN, J. M. B. *et al.* Philippine journal of veterinary medicine. *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, v. 47, n. 1, 2010. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193166713>>. Acesso em: 29 maio 2019.

HARRELL JR, F. E.; WITH CONTRIBUTIONS FROM CHARLES DUPONT; MANY OTHERS. *Hmisc: Harrell Miscellaneous*. . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=Hmisc>>. , 2019

HIRAKAWA, T. F. *et al.* Endocardite por lactococcus garvieae: primeiro relato de caso da América Latina. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 97, n. 5, p. e108–e110, nov. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2011001400016&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 29 maio 2019.

IMA. *PORTARIA IMA Nº 1687, de 22 de dezembro de 2016*. . [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/3673-portaria-no-1687>.

IMA. *Portaria nº 1305, de 30 de Abril de 2013: Estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal.* . Belo Horizonte - MG, Brasil.: Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1159-portaria-no-1305-de-30-de-abril-de-2013>. Acesso em: 14 abr. 2017. , 2013

IMA. *PORTARIA Nº 523, DE 3 DE JULHO DE 2002.* . Brasil: Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/212-portaria-no-523-de-3-de-julho-de-2002>. , 2002

INPI. *Indicações de Procedência concedidas.* . Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI): [s.n.]. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/arquivos-dicig/copy3_of_LISTACOMASINDICAESDEPROCEDNCIACONCEDIDAS20092016.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2017. , 2016

IPHAN. *Modo Artesanal de Fazer Queijo de Minas.* . Brasília, DF: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2014. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minas_web.pdf>. Acesso em: 6 abr. 2017.

KAHLE, D.; WICKHAM, H. ggmap: Spatial Visualization with ggplot2. *The R Journal*, v. 5, n. 1, p. 144–161, 2013. Disponível em: <<https://journal.r-project.org/archive/2013-1/kahle-wickham.pdf>>.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiology*, v. 80, p. 40–49, 2019.

KASSAMBARA, A. *ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using “ggplot2”.* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=ggcorrplot>>. , 2018a

KASSAMBARA, A. *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots.* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=ggpubr>>. , 2018b

KATOH, K. *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, v. 30, n. 14, p. 3059–66, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12136088><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC135756>>.

KEEFE, G. P. Streptococcus agalactiae mastitis: a review. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, v. 38, n. 7, p. 429–37, jul. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9220132>>. Acesso em: 28 maio 2019.

KNIGHT, R. *et al.* Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature biotechnology*, From Duplicate 1 (Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. - Knight, Rob; Jansson, Janet; Field, Dawn; Fierer, Noah; Desai, Narayan; Fuhrman, Jed A; Hugenholtz, Phil; van der Lelie, Daniel; Meyer, Folker; Stevens, Rick; Bailey, Mark J; Gordon, Jeffrey I; Kowalchuk, George A; Gilbert, Jack A) *NULL*, v. 30, n. 6, p. 513–20, 7 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678395>>. Acesso em: 7 mar. 2017.

KOLDE, R. *pheatmap: Pretty Heatmaps*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=pheatmap>>. , 2019

LÊ, S.; PAGÈS, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2008.

LI, J. *et al.* Bacterial microbiota of Kazakhstan cheese revealed by single molecule real time (SMRT) sequencing and its comparison with Belgian, Kalmykian and Italian artisanal cheeses. *BMC microbiology*, v. 17, n. 1, p. 13, 9 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28068902>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

LICITRA, G.; CARPINO, S. The Microfloras and Sensory Profiles of Selected Protected Designation of Origin Italian Cheeses. *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 1, 24 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.CM-0007-2012>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

LIMA, R. DE S.; DOULA, S. M. A TRADIÇÃO E A LEI - O QUEIJO MINAS ARTESANAL E OS IMPASSES DA LEGISLAÇÃO SANITÁRIA NO IMPEDIMENTO DE SUA COMERCIALIZAÇÃO FORA DO ESTADO DE MG. *Revista Faz Ciência*, v. 14, n. 19, p. 181–195, 2012. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/fazciencia/article/view/8031/8035>>.

LOZUPONE, C. A. *et al.* Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. [S.l: s.n.], 2007

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 3 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1317376/>>.

LUSK, T. S. *et al.* Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC microbiology*, NULL, v. 12, n. 1, p. 254, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/254>>.

MADIGAN, M. T. *et al.* Introduction and Major Themes of Microbiology. *Brock Biology of Microorganisms*. 14. ed. Boston: Pearson Education, 2014. p. 2–22.

MANDAL, S. *et al.* Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial ecology in health and disease*, v. 26, p. 27663, 2015.

MARTINS, M. C. DE F. *et al.* Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Food Research International*, v. 108, p. 295–300, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918302448?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 maio 2019.

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

MCKIGHT, P. E.; NAJAB, J. Kruskal-Wallis Test. *The Corsini Encyclopedia of*

Psychology. [S.l.]: American Cancer Society, 2010. p. 1. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470479216.corpsy0491>>.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, n. 2–3, p. 127–144, maio 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

MEYER, F. *et al.* The metagenomics RAST server -- a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 386, set. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>>.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. *DECRETO 44864, DE 01/08/2008. ALTERA O REGULAMENTO DA LEI Nº 14.185, DE 31 DE JANEIRO DE 2002, QUE DISPÕE SOBRE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL*. . Brasil: Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br>>. , 2008

NÓBREGA, J. E. *et al.* Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal, fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 63, n. 363, p. 26–30, 2008a. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/54>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

NÓBREGA, J. E. *et al.* Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do Queijo Canastra. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 63, n. 364, p. 14–18, 2008b. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/59>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

NÓBREGA, J. E. DA. *Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras*. 2007. 82 f. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

OKSANEN, J. *et al.* *vegan: Community Ecology Package*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=vegan>>. , 2019

PARADIS, E.; SCHLIEP, K. Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, v. 35, n. 3, p. 526–528, 2019.

PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiology*, v. 65, p. 160–169, 2017.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, v. 13, n. C, p. 131–144, 1966.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, v. 5, n. 3, 2010.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, 2013.

QUIGLEY, L. *et al.* High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 16, p. 5717–5723, jun. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685131>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria*, v. 0, p. {ISBN} 3-900051-07-0, 2016. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>.

RAWAT, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 5, n. 4, p. 47–56, 2015. Disponível em: <www.pelagiaresearchlibrary.com>. Acesso em: 29 maio 2019.

RESENDE, M. F. S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, dez. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 abr. 2017.

REY, D.; NEUHÄUSER, M. Wilcoxon-Signed-Rank Test. In: LOVRIC, M. (Org.). *International Encyclopedia of Statistical Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 1658–1659. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2_616>.

RIQUELME, C. *et al.* Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *International Journal of Food Microbiology*, v. 192, p. 86–94, 2015.

ROGNES, T. *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, v. 4, p. e2584, 18 out. 2016. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/2584>>. Acesso em: 28 maio 2019.

SANT'ANNA, F. M. *et al.* Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food Microbiology*, v. 82, p. 349–362, 2019.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 16, p. 6241–6, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454494>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3341068>>.

SHANNON, C. E.; WARREN WEAVER. The mathematical theory of communication. *THE UNIVERSITY OF ILLINOIS PRESS*, v. 8, n. 11, p. 21–33, 1949.

SILVA, J. G. *et al.* Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 2, p. 223–228, fev. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018000200223&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 28 maio 2019.

SIMON SARKADI, L. Biogenic Amines in Fermented Foods and Health Implications. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, p. 625–651, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128023099000273>>.

Acesso em: 28 maio 2019.

SOARES, Lucas; RODRIGUES, Fernanda. Com 25% da produção nacional, MG aposta no queijo como saída para crise e geração de renda. *Minas dos Queijos, G1 Sul de Minas*, 20 maio 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/minas-dos-queijos/noticia/2019/05/20/com-25percent-da-producao-nacional-mg-aposta-no-queijo-como-saida-para-crise-e-geracao-de-renda.ghtml>>. Acesso em: 28 maio 2019.

SPEARMAN, C. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology*, v. 15, n. 1, p. 72–101, 1904. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1412159>>.

SUOJALA, L.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 36, n. 6, p. 521–531, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23679229>>. Acesso em: 28 maio 2019.

WALD, R. *et al.* Nachweis von Weissella spp. in Viertelgemelksproben von zwei Milchkühen mit klinischer Mastitis. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere*, v. 44, n. 5, p. 307–312, 23 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27272700>>. Acesso em: 29 maio 2019.

WHITESIDE, S. A. *et al.* The microbiome of the urinary tract - a role beyond infection. *Nat Rev Urol*, v. 12, n. 2, p. 81–90, fev. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2014.361>>.

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. [S.l.]: Springer-Verlag New York, 2009. Disponível em: <<http://ggplot2.org>>.

WOLFE, B. E. *et al.* Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. *Cell*, v. 158, n. 2, p. 422–433, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0092867414007454>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

WOLFE, B. E.; DUTTON, R. J. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell*, v. 161, n. 1, p. 49–55, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0092867415002007>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

WOO, P. C. Y. C. Y. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, From Duplicate 2 (Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories - Woo, P C Y; Lau, S K P; Teng, J L L; Tse, H; Yuen, K.-Y; Yuen, K Y) NULL, v. 14, n. 10, p. 908–934, out. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14610028>>. Acesso em: 8 mar. 2017.

YERUHAM, I. *et al.* Mastitis in Dairy Cattle Caused by *Corynebacterium* Pseudotuberculosis and the Feasibility Of Transmission by Houseflies I. *Veterinary Quarterly*, v. 18, n. 3, p. 87–89, 1996. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tveq20>>.
Acesso em: 28 maio 2019.

YU, G. *scatterpie: Scatter Pie Plot*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=scatterpie>>. , 2018

ZAHN, G. *Limitations of the Unite Fungal Database*. Disponível em: <<http://geoffreyzahn.com/limitations-of-the-unite-fungal-database/>>.

9. APÊNDICES

APÊNDICE I: Tabela mostrando a quantidade de sequências obtidas no sequenciamento 16S após filtragem por DADA2.

Amostra	input	filtered	denoisedF	denoisedR	merged	nonchim	tipo
P13Q1	110038	101742	101742	101742	96915	67353	queijo
P51Q1	76091	70967	70967	70967	69347	61260	queijo
P03Q2	78168	72496	72496	72496	70055	60575	queijo
P83Q1	68099	64073	64073	64073	63287	58703	queijo
P48Q1	65649	61775	61775	61775	61064	56964	queijo
P06Q1	60328	55534	55534	55534	55227	54800	queijo
P10Q1	60017	55353	55353	55353	54828	53319	queijo
P79Q1	58727	55179	55179	55179	54611	52660	queijo
P38Q2	65098	59224	59224	59224	56945	52206	queijo
P02Q2	60928	55319	55319	55319	53337	48578	queijo
P04Q2	58377	54626	54626	54626	53281	47783	queijo
P25Q1	55982	52305	52305	52305	51611	46982	queijo
P19Q2	56748	52763	52763	52763	51925	46229	queijo
P08Q2	60946	56178	56178	56178	54367	45134	queijo
P21Q1	50431	46664	46664	46664	45513	45042	queijo
P43Q1	59828	55990	55990	55990	54059	44563	queijo
P24Q1	62439	58282	58282	58282	54796	44209	queijo
P46Q1	56020	51111	51111	51111	48898	44056	queijo
P82Q1	58511	53932	53932	53932	52023	43652	queijo
P39Q1	51559	47425	47425	47425	46673	43456	queijo
P14Q1	54108	50032	50032	50032	48681	42030	queijo
P41Q1	55561	51419	51419	51419	49893	41956	queijo
P50Q1	52805	49223	49223	49223	48063	41807	queijo
P77Q1	51678	47253	47253	47253	45933	41428	queijo
P09Q2	57689	54024	54024	54024	51557	41400	queijo
P28Q1	50225	47045	47045	47045	45805	40172	queijo
P37Q1	51979	47811	47811	47811	46110	40088	queijo
P76Q1	50299	46335	46335	46335	45023	39481	queijo
P11Q1	49869	45127	45127	45127	43490	39346	queijo
P01Q1	46556	43029	43029	43029	42070	39166	queijo
P07Q1	62317	57581	57581	57581	54373	38986	queijo
P44Q1	50621	47174	47174	47174	45781	38863	queijo
P20Q1	55558	50614	50614	50614	47359	38690	queijo
P42Q1	42792	39948	39948	39948	39489	37934	queijo
P53Q1	47113	44235	44235	44235	43324	37570	queijo
P78Q1	42931	39944	39944	39944	39461	37472	queijo
P52Q1	47325	43388	43388	43388	42054	37204	queijo

P26Q1	59712	54750	54750	54750	48835	37096	queijo
P38Q1	48729	43870	43870	43870	42104	36504	queijo
P05Q1	53358	49274	49274	49274	46766	36400	queijo
P29Q1	48133	44663	44663	44663	43218	36326	queijo
P40Q1	46246	43173	43173	43173	41372	34510	queijo
P35Q1	39101	36213	36213	36213	35936	34304	queijo
P81Q1	44266	40599	40599	40599	39070	34152	queijo
P75Q1	41782	38820	38820	38820	38403	33768	queijo
P80Q1	36512	34385	34385	34385	34096	32575	queijo
P34Q1	44057	41083	41083	41083	39200	32160	queijo
P36Q1	42305	39055	39055	39055	37523	31555	queijo
P30Q1	38046	34867	34867	34867	33916	30292	queijo
P71Q1	36214	32889	32889	32889	32021	28189	queijo
P31Q1	33592	31395	31395	31395	30643	27521	queijo
P72Q1	35023	31855	31855	31855	30807	27350	queijo
P47Q1	32870	30339	30339	30339	29837	27227	queijo
P32Q1	37332	34817	34817	34817	33249	26637	queijo
P12Q1	33301	29575	29575	29575	28277	24951	queijo
P33Q1	31796	29481	29481	29481	28580	24869	queijo
P62Q1	31113	28787	28787	28787	28189	24499	queijo
P70Q1	28383	26085	26085	26085	25557	23677	queijo
P63Q1	30443	27824	27824	27824	26809	23427	queijo
P17Q1	26919	25162	25162	25162	24691	23299	queijo
P23Q1	34868	31778	31778	31778	29589	23232	queijo
P58Q1	27089	24370	24370	24370	23716	23176	queijo
P16Q1	29781	27644	27644	27644	26578	22753	queijo
P73Q1	26923	24860	24860	24860	24562	22634	queijo
P55Q1	26198	24399	24399	24399	24088	22502	queijo
P74Q1	27584	25541	25541	25541	24317	21890	queijo
P61Q1	24408	22375	22375	22375	21566	18535	queijo
P57Q1	21241	19403	19403	19403	18922	16910	queijo
P64Q1	21357	18970	18970	18970	18067	15875	queijo
P15Q1	18768	17473	17473	17473	16966	15676	queijo
P67Q1	18538	16720	16720	16720	16180	14017	queijo
P56Q1	12854	11870	11870	11870	11582	10066	queijo
P69Q1	12565	11310	11310	11310	10967	9754	queijo
P22Q1	2106	1917	1917	1917	1850	1824	queijo
P66Q1	596	539	539	539	531	521	queijo
P27Q1	172	105	105	105	77	58	queijo
P54Q1	145	106	106	106	81	55	queijo
TOTAL QUEIJOS	3347836	3093461	3093461	3093461	2995966	2621883	
P02P2	108881	101411	101411	101411	99480	94173	pingo
P64P1	112584	106068	106068	106068	103796	90387	pingo
P32P1	111513	104565	104565	104565	101273	89844	pingo

P68P1	89329	83673	83673	83673	81578	68756	pingo
P65P1	94991	88264	88264	88264	84328	67514	pingo
P50P1	69203	65106	65106	65106	64323	62092	pingo
P67P1	85187	79947	79947	79947	77119	62051	pingo
P70P1	72662	68256	68256	68256	67164	61652	pingo
P10P1	66376	61120	61120	61120	60096	59543	pingo
P74P1	68705	64050	64050	64050	62398	58842	pingo
P71P1	68347	64235	64235	64235	63527	58540	pingo
P04P1	63272	59218	59218	59218	58468	56657	pingo
P73P1	66883	62845	62845	62845	61815	55782	pingo
P69P1	78557	74084	74084	74084	71048	55440	pingo
P42P1	62699	58705	58705	58705	57506	54253	pingo
P40P1	61260	57494	57494	57494	56938	54158	pingo
P60P1	63680	60028	60028	60028	59104	53884	pingo
P01P1	62665	58805	58805	58805	57628	53393	pingo
P34P1	69753	65083	65083	65083	62744	53233	pingo
P03P2	59768	55603	55603	55603	54761	53075	pingo
P25P1.2	67277	62508	62508	62508	61073	53041	pingo
P38P2	66397	62438	62438	62438	60899	52642	pingo
P22P1	60207	56259	56259	56259	55326	52298	pingo
P54P1	60085	56629	56629	56629	55468	51965	pingo
P06P1	56448	52660	52660	52660	51986	50858	pingo
P21P1	55987	51921	51921	51921	50971	49812	pingo
P08P1	56248	52043	52043	52043	50989	49621	pingo
P66P1	67335	62946	62946	62946	60521	49621	pingo
P51P1	53478	50334	50334	50334	49988	49546	pingo
P37P1	62170	58351	58351	58351	57332	49433	pingo
P55P1	58254	54978	54978	54978	54201	49408	pingo
P05P1	57567	53539	53539	53539	52344	49171	pingo
P57P1	59876	56181	56181	56181	54796	49167	pingo
P31P1	55111	51477	51477	51477	50768	49025	pingo
P63P1	58038	54463	54463	54463	53395	48878	pingo
P33P1	57204	53967	53967	53967	52887	48721	pingo
P13P1	53676	49979	49979	49979	49293	48463	pingo
P02P1	53096	49744	49744	49744	49163	48160	pingo
P20P1	54783	50179	50179	50179	48870	47651	pingo
P48P1	58813	55020	55020	55020	53734	47319	pingo
P15P1	57124	54050	54050	54050	52978	47235	pingo
P27P1	58599	55109	55109	55109	53778	46795	pingo
P30P1	63952	60052	60052	60052	58289	46523	pingo
P39P1	50201	47027	47027	47027	46671	46515	pingo
P45P1	61718	57959	57959	57959	56143	46254	pingo
P09P2	57137	53212	53212	53212	51368	45473	pingo
P17P1	49093	45815	45815	45815	45189	44995	pingo

P53P1	49958	46863	46863	46863	46193	44280	pingo
P07P1	48309	45173	45173	45173	44708	43968	pingo
P38P1	55481	52112	52112	52112	51101	43825	pingo
P52P1	53734	50779	50779	50779	49738	43752	pingo
P14P1	55199	51155	51155	51155	48205	43685	pingo
P12P1	47234	44211	44211	44211	43852	43641	pingo
P62P1	53215	49929	49929	49929	49006	43315	pingo
P46P1	57568	54187	54187	54187	52396	43284	pingo
P41P1	53941	50462	50462	50462	49079	43121	pingo
P47P1	56936	53336	53336	53336	51495	43101	pingo
P56P1	62391	58681	58681	58681	55596	43021	pingo
P16P1	58892	54899	54899	54899	51693	43012	pingo
P77P1	46532	43598	43598	43598	43319	42786	pingo
P28P1	49038	45963	45963	45963	45135	42335	pingo
P43P1	57031	53706	53706	53706	51704	41456	pingo
P83P1	45501	42713	42713	42713	42357	41052	pingo
P19P2	46377	43651	43651	43651	43070	40368	pingo
P11P1	45075	42166	42166	42166	41590	40367	pingo
P78P1	43402	40760	40760	40760	40472	39181	pingo
P44P1	50974	47547	47547	47547	46087	38975	pingo
P72P1	47781	44733	44733	44733	43861	38626	pingo
P08P2	44008	40818	40818	40818	40058	38239	pingo
P82P1	44588	41628	41628	41628	41125	38187	pingo
P19P1	44751	41954	41954	41954	41515	37768	pingo
P09P1	39699	38051	38051	38051	37770	37303	pingo
P35P1	42715	39633	39633	39633	39241	36536	pingo
P61P1	48661	46021	46021	46021	44549	35743	pingo
P59P1	40448	38194	38194	38194	37730	34849	pingo
P80P1	38431	35944	35944	35944	35384	33394	pingo
P36P1	48290	44757	44757	44757	42028	33382	pingo
P79P1	34993	32748	32748	32748	32496	31800	pingo
P04P2	36820	34469	34469	34469	33717	31321	pingo
P58P1	39552	37179	37179	37179	35819	29931	pingo
P03P1	33331	30717	30717	30717	30106	29859	pingo
P76P1	35647	32803	32803	32803	32166	29756	pingo
P18P1	33188	31108	31108	31108	30634	29104	pingo
P29P1	36743	33980	33980	33980	33079	28973	pingo
P81P1	31709	29679	29679	29679	28999	26920	pingo
P24P1	26791	24804	24804	24804	24156	23963	pingo
P23P1	16561	15416	15416	15416	14473	14381	pingo
P75P1	9558	8800	8800	8800	8695	8644	pingo
TOTAL PINGOS	4917242	4602727	4602727	4602727	4497911	4079063	
CN6	45819	43154	43154	43154	42106	37140	bl
CN7	39534	36466	36466	36466	35311	30376	bl

CNP1	315	240	240	240	192	145	bl
CNP3	180	140	140	140	122	115	bl
CN5	246	153	153	153	109	90	bl
PCR.neg5	166	127	127	127	109	89	bl
CN2	240	128	128	128	93	80	bl
CNP5	138	113	113	113	93	80	bl
CN4	222	128	128	128	97	68	bl
CN1	203	115	115	115	83	67	bl
CNP2	109	82	82	82	70	62	bl
PCR.neg6	106	79	79	79	69	62	bl
BR1.11	114	80	80	80	66	58	bl
NONE	130	96	96	96	82	56	bl
CN3	116	84	84	84	68	50	bl
BL2P1	81	60	60	60	52	46	bl
PCR.neg4	87	72	72	72	59	46	bl
PCR.neg7	68	56	56	56	50	46	bl
PCR.neg2	66	51	51	51	47	42	bl
CNP4	71	51	51	51	45	41	bl
CNP10	47	35	35	35	28	24	bl
PCR.neg1	65	45	45	45	33	22	bl
CN11	43	37	37	37	29	21	bl
CNQ8	61	33	33	33	24	19	bl
CNQ9	51	27	27	27	22	18	bl
PCR.neg3	18	9	9	9	6	4	bl
TOTAL Branco	88296	81661	81661	81661	79065	68867	
TOTAL GERAL	8353374	7777849	7777849	7777849	7572942	6769813	

*bl = Branco

APÊNDICE II: Tabela mostrando a quantidade de sequências obtidas no sequenciamento ITS após filtragem por DADA2.

sample-id	input	filtered	denoised	non-chimeric	tipo
P01Q1	19	6	6	6	queijo
P02Q2	6266	2195	2195	2194	queijo
P03Q2	8546	3575	3575	3481	queijo
P04Q2	9299	3974	3974	3861	queijo
P05Q1	5917	5224	5224	4939	queijo
P06Q1	5387	4264	4264	4014	queijo
P07Q1	9087	4810	4810	4674	queijo
P08Q2	5115	4167	4167	3962	queijo
P09Q2	15114	13301	13301	12594	queijo
P10Q1	4122	3130	3130	2899	queijo
P11Q1	10503	3954	3954	3882	queijo
P12Q1	9827	4326	4326	4023	queijo
P13Q1	18432	6716	6716	6644	queijo
P14Q1	7120	6137	6137	5798	queijo
P15Q1	4909	2377	2377	2295	queijo
P16Q1	2898	2452	2452	2303	queijo
P17Q1	7787	7162	7162	6733	queijo
P19Q2	6500	5698	5698	5395	queijo
P20Q1	6786	6022	6022	5704	queijo
P21Q1	4467	3051	3051	2898	queijo
P22Q1	7847	6720	6720	6395	queijo
P23Q1	4598	3287	3287	2977	queijo
P24Q1	3223	2315	2315	2212	queijo
P25Q1	5036	4128	4128	3874	queijo
P26Q1	20559	7363	7363	7317	queijo
P27Q1	2139	1703	1703	1605	queijo
P28Q1	3960	3539	3539	3328	queijo
P29Q1	5287	1825	1825	1708	queijo
P30Q1	5233	1446	1446	1406	queijo
P31Q1	6641	1463	1463	1463	queijo
P32Q1	6875	2737	2737	2685	queijo
P33Q1	10783	5556	5556	5316	queijo
P34Q1	7394	6288	6288	5847	queijo
P35Q1	8940	7462	7462	6974	queijo
P36Q1	12638	7543	7543	7296	queijo
P37Q1	14854	5197	5197	5146	queijo
P38Q1	14821	4703	4703	4535	queijo
P39Q1	14982	5296	5296	5271	queijo
P40Q1	3869	3010	3010	2442	queijo
P41Q1	7609	3414	3414	3350	queijo
P42Q1	11186	2916	2916	2907	queijo

P43Q1	15348	5306	5306	5276	queijo
P44Q1	5335	2112	2112	2077	queijo
P46Q1	12278	3789	3789	3657	queijo
P47Q1	13954	7433	7433	6157	queijo
P48Q1	20917	7861	7861	7808	queijo
P50Q1	9548	3216	3216	3124	queijo
P51Q1	11757	2621	2621	2619	queijo
P52Q1	12758	4630	4630	4503	queijo
P53Q1	16027	5303	5303	5257	queijo
P54Q1	13096	4360	4360	4351	queijo
P55Q1	20314	8488	8488	7636	queijo
P56Q1	20428	15919	15919	13378	queijo
P57Q1	22754	9145	9145	8862	queijo
P58Q1	9360	3172	3172	3164	queijo
P61Q1	4312	3018	3018	2639	queijo
P62Q1	19840	11004	11004	8749	queijo
P63Q1	16345	5406	5406	5307	queijo
P64Q1	10583	2857	2857	2834	queijo
P66Q1	8293	2718	2718	2707	queijo
P67Q1	9741	2354	2354	2316	queijo
P69Q1	8595	5527	5527	3868	queijo
P70Q1	7380	2494	2494	2489	queijo
P71Q1	9473	3241	3241	3045	queijo
P72Q1	9345	3024	3024	3007	queijo
P73Q1	3835	2227	2227	1368	queijo
P74Q1	16151	5729	5729	5550	queijo
P75Q1	29489	7108	7108	7074	queijo
P76Q1	10916	3635	3635	3624	queijo
P77Q1	11189	3280	3280	3274	queijo
P78Q1	12713	4487	4487	4462	queijo
P79Q1	24162	5957	5957	5949	queijo
P80Q1	17116	6572	6572	6317	queijo
P81Q1	10643	8468	8468	8057	queijo
P82Q1	15952	7447	7447	5918	queijo
P83Q1	22209	7191	7191	7151	queijo
TOTAL QUEIJOS	828126	374509	374509	352872	
CN1	16	1	1	1	bl
CN11	3	0	0	0	bl
CN2	159	86	86	86	bl
CN3	13	3	3	3	bl
CN4	4	1	1	1	bl
CN5	19	7	7	7	bl
CN6	37	8	8	8	bl

CN7	16	7	7	7 bl
CNQ8	46	16	16	16 bl
CNQ9	31	9	9	9 bl
PCR.neg1	15	5	5	5 bl
PCR.neg2	13	3	3	3 bl
PCR.neg3	17	4	4	4 bl
TOTAL BRANCOS	389	150	150	150
TOTAL GERAL	828515	374659	374659	353022

*bl = Branco.

APÊNDICE III: Modelo de Questionário utilizado para obtenção de dados com os produtores.

Rebanho		
Tipo	(X)	Observação
Nelore		
Mestiço		
Holandes		
Jersey		
Gir		
Guzerá		
Outra		

Bancada		
Madeira		
Inox		
Ardósia		
Granito		

Ambiente de Alimentação		
Local Aberto		
Parcialmente Fechado		

Alimentação do Rebanho		
Silagem		
Ração		
Milho		
Farelo		
Outro		

Prateleira de Maturação		
Higienização		
Quinzenalmente		
Semanalmente		
3 X Por Semana		
2 X Por Semana		
Produto Usado		
Vinagre		
Cloro		
Somente Água		
Outro		

Queijaria		
Azulejada		
Forrada		
Laje		
Cerâmica		
Cimento Queimado		
Piso Batido		
Produto Para Higienização		
Cloro		
Detergente		
Somente Água		
Outro		

Clorador Na Queijaria		
Possui		
Não Possui		

Ordenha		
Manual		
Balde Ao Pé		
Sistema Canalizado		

Ambiente Da Ordenha		
Local Aberto		
Parcialmente Fechado		
Cimentado		
Terra		
Forma De Higienização		
Nenhuma		
Raspagem		
Varreção		
Lavagem		

Latão		
Plástico		
Inox		

Pá		
Madeira		
Inox		
Plástico		

Tela Mosqueteira		
-------------------------	--	--

Presente		
Ausente		

Usa Dessorador No Momento Da Prensa?		
Sim		
Não		

Pré E Pós Diping		
Nenhum		
Somente Pré		
Somente Pós		
Ambos		
Produto Usado		
Água		
Iodo		
Álcool		
Outro		

Vestimenta (Boas Práticas)		
Touca		
Bota		
Mascara		
Jaleco		
Nenhum		

Banho Antes Da Produção E Manuseio?		
Sim		
Não		

Água		
Mina		
Rio		
Poço Artesiano		
Queda Livre		
Bomba		

APÊNDICE IV: Tabela com o resumo dos resultados dos questionários realizados com os produtores.

Variável	Respostas
Avental (BPF)	82
Nao	52
Sim	30
BanhoAntesProducao (BPF)	82
Nao	68
Sim	14
Bota (BPF)	82
Nao	43
Sim	39
F_H_prateleiras (BPF)	82
2xSemana	28
3xSemana	17
Diario	2
Quinzenal	6
Semanal	29
H_SalaOrdenha (BPF)	82
Lavagem	40
Nenhuma	6
Raspagem	35
Varrecao	1
H_TetosOrdenha (BPF)	82
Nenhuma	37
posDipping	1
preDipping	29
preposdipping	15
Mascara (BPF)	82
Nao	77
Sim	5
Produto_H_prateleira (BPF)	82
Agua	78
Cloro	2
Sabao	1
Vinagre	1
Produto_H_queijaria (BPF)	82
Agua	19
Cloro	4
Detergente	39
NA	1
Sabao	7
SabaoeCloro	12

Produto_H_tetosQueijaria (BPF)	82
Agua	15
Cloro	1
Iodo	21
NA	8
Nenhum	28
Sabao	9
SistemaOrdenha (BPF)	82
Bpe	38
canalizado	31
Manual	13
Touca (BPF)	82
Nao	53
Sim	29
AlimentacaoDoRebanho (IL)	82
Pastagem	17
Racao	9
Silagem	8
SilagemRacao	48
AmbienteDeAlimentacao (IL)	82
Aberto	32
SemiAberto	50
Clorador (IL)	82
Nao	57
Sim	25
DessoradorDePano (IL)	82
Nao	4
Sim	78
MaterialDaBancada (IL)	82
Ardosia	73
Granito	3
Inox	4
Madeira	1
NA	1
Materialdapa (IL)	82
Inox	16
NA	46
Plastico	20
MaterialdoLatao (IL)	82
Inox	4
Plastico	78
origemAgua (IL)	82
Cisterna	2
Encanada	1
Mina	57
PocoArtesanal	2

QuedaLivre	11
Rio	9
PisoOrdenha (IL)	82
Calcado	5
Cimentado	46
NA	1
Terra	30
PisoQueijaria (IL)	82
Ceramico	42
CimentoGrosso	9
CimentoQueimado	31
RevestimentoQueijaria (IL)	82
Azulejada	43
Rebocada	39
SalaOrdenha (IL)	82
Aberto	2
SemiAberto	80
TelaJanelaQueijaria (IL)	82
Nao	29
Sim	53
Teto (IL)	82
Forrado	33
Laje	14
TelhaExposta	35
ComposicaoDoRebanho	82
Caracu	1
Girolando	6
Holandes	27
JerseyHolandes	2
Mestico	46

APÊNDICE V: Dados obtidos através dos questionários realizados com os produtores.

Amostra	H_SalaOrdenha	H_TetosOrdenha	Produto_H_tetosQueijaria
P01	Lavagem	preposdipping	Sabao
P02	Lavagem	preposdipping	Iodo
P03	Lavagem	preDipping	Iodo
P04	Raspagem	preDipping	Agua
P05	Lavagem	Nenhuma	Nenhum
P06	Nenhuma	preposdipping	Iodo
P07	Lavagem	Nenhuma	Nenhum
P08	Nenhuma	Nenhuma	Nenhum
P09	Lavagem	Nenhuma	Nenhum
P10	Nenhuma	Nenhuma	Nenhum
P11	Lavagem	preDipping	Agua
P12	Lavagem	preDipping	Sabao
P13	Raspagem	preDipping	Sabao
P14	Lavagem	preposdipping	Sabao
P15	Lavagem	preposdipping	Sabao
P16	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P17	Lavagem	preposdipping	Iodo
P18	Lavagem	preposdipping	Iodo
P19	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P20	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P21	Varrecao	preDipping	Iodo
P22	Nenhuma	Nenhuma	Nenhum
P23	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P24	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P25	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P26	Raspagem	preDipping	Agua
P27	Lavagem	preDipping	Agua
P28	Lavagem	preDipping	Agua
P29	Lavagem	posDipping	Agua
P30	Lavagem	preposdipping	Iodo
P31	Lavagem	preposdipping	Agua
P32	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P33	Lavagem	preDipping	Iodo
P34	Lavagem	preposdipping	Cloro
P35	Nenhuma	Nenhuma	Nenhum
P36	Nenhuma	Nenhuma	Nenhum
P37	Lavagem	preposdipping	Iodo
P38	Lavagem	preDipping	Agua
P39	Lavagem	preDipping	Iodo
P40	Lavagem	preDipping	Iodo
P41	Lavagem	preDipping	Iodo

Amostra	H_SalaOrdenha	H_TetosOrdenha	Produto_H_tetosQueijaria
P42	Lavagem	preDipping	Iodo
P43	Lavagem	Nenhuma	Sabao
P44	Lavagem	preDipping	Sabao
P45	Raspagem	preDipping	Agua
P46	Lavagem	preposdipping	Sabao
P47	Lavagem	preposdipping	Sabao
P48	Lavagem	preDipping	Iodo
P50	Lavagem	preDipping	Agua
P51	Lavagem	preDipping	Iodo
P52	Lavagem	preDipping	Agua
P53	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P54	Raspagem	preDipping	Agua
P55	Lavagem	preposdipping	Agua
P56	Raspagem	preDipping	Iodo
P57	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P58	Lavagem	preposdipping	Iodo
P59	Raspagem	Nenhuma	NA
P60	Raspagem	Nenhuma	NA
P61	Lavagem	preDipping	Iodo
P62	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P63	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P64	Raspagem	preDipping	Agua
P65	Lavagem	preDipping	Iodo
P66	Raspagem	Nenhuma	NA
P67	Lavagem	Nenhuma	NA
P68	Raspagem	Nenhuma	NA
P69	Raspagem	Nenhuma	NA
P70	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P71	Lavagem	preDipping	Iodo
P72	Raspagem	Nenhuma	NA
P73	Raspagem	Nenhuma	NA
P74	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P75	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P76	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P77	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P78	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P79	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P80	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P81	Raspagem	preDipping	Iodo
P82	Raspagem	Nenhuma	Nenhum
P83	Lavagem	preDipping	Agua
Melhor	Lavagem	preposdipping	Sabao
Pior	Nenhuma	Nenhuma	Nenhum

Amostra	SistemaOrdenha	SalaOrdenha	PisoOrdenha	Touca
P01	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P02	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P03	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P04	canalizado	SemiAberto	Terra	Nao
P05	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Nao
P06	Bpe	Aberto	Terra	Nao
P07	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P08	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P09	Manual	SemiAberto	Cimentado	Nao
P10	Bpe	SemiAberto	Calcado	Nao
P11	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P12	canalizado	SemiAberto	Calcado	Sim
P13	Bpe	SemiAberto	Calcado	Sim
P14	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P15	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P16	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P17	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P18	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P19	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P20	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P21	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P22	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P23	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P24	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P25	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P26	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P27	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Nao
P28	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P29	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P30	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P31	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P32	Manual	SemiAberto	Calcado	Nao
P33	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P34	canalizado	Aberto	Cimentado	Sim
P35	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P36	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P37	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P38	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P39	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P40	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Nao
P41	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P42	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P43	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P44	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P45	Bpe	SemiAberto	Calcado	Sim

Amostra	SistemaOrdenha	SalaOrdenha	PisoOrdenha	Touca
P46	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P47	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P48	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P50	Manual	SemiAberto	Cimentado	Sim
P51	Manual	SemiAberto	Cimentado	Sim
P52	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P53	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P54	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P55	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Nao
P56	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P57	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Nao
P58	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P59	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P60	Bpe	SemiAberto	NA	Nao
P61	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Sim
P62	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P63	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P64	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P65	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P66	canalizado	SemiAberto	Terra	Nao
P67	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
P68	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P69	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P70	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P71	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
P72	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P73	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P74	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P75	Bpe	SemiAberto	Cimentado	Nao
P76	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P77	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P78	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P79	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P80	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P81	Bpe	SemiAberto	Terra	Nao
P82	Manual	SemiAberto	Terra	Nao
P83	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Nao
Melhor	canalizado	SemiAberto	Cimentado	Sim
Pior	Manual	Aberto	Terra	Nao

Amostra	Bota	Avental	Mascara	BanhoAntesProducao
P01	Sim	Sim	Nao	Sim
P02	Sim	Sim	Nao	Sim
P03	Sim	Nao	Nao	Nao
P04	Nao	Nao	Nao	Nao
P05	Nao	Nao	Nao	Nao
P06	Nao	Nao	Nao	Nao
P07	Nao	Nao	Nao	Nao
P08	Nao	Nao	Nao	Nao
P09	Nao	Nao	Nao	Nao
P10	Nao	Nao	Nao	Nao
P11	Sim	Sim	Sim	Nao
P12	Sim	Sim	Nao	Nao
P13	Sim	Sim	Nao	Nao
P14	Sim	Sim	Nao	Nao
P15	Sim	Sim	Nao	Nao
P16	Nao	Nao	Nao	Nao
P17	Sim	Sim	Nao	Sim
P18	Sim	Sim	Nao	Nao
P19	Nao	Nao	Nao	Nao
P20	Nao	Nao	Nao	Nao
P21	Nao	Nao	Nao	Nao
P22	Nao	Nao	Nao	Nao
P23	Nao	Nao	Nao	Nao
P24	Nao	Nao	Nao	Nao
P25	Nao	Nao	Nao	Nao
P26	Nao	Nao	Nao	Nao
P27	Nao	Nao	Nao	Nao
P28	Sim	Nao	Nao	Nao
P29	Sim	Sim	Nao	Sim
P30	Sim	Sim	Nao	Nao
P31	Sim	Sim	Nao	Sim
P32	Nao	Nao	Nao	Nao
P33	Sim	Nao	Nao	Nao
P34	Sim	Nao	Sim	Nao
P35	Nao	Nao	Nao	Nao
P36	Nao	Nao	Nao	Nao
P37	Sim	Sim	Nao	Nao
P38	Sim	Sim	Nao	Sim
P39	Sim	Sim	Nao	Nao
P40	Sim	Nao	Nao	Nao
P41	Sim	Sim	Nao	Nao
P42	Sim	Sim	Nao	Sim
P43	Sim	Sim	Nao	Sim
P44	Sim	Sim	Sim	Sim
P45	Sim	Sim	Nao	Nao

Amostra	Bota	Avental	Mascara	BanhoAntesProducao
P46	Sim	Sim	Sim	Sim
P47	Sim	Sim	Sim	Nao
P48	Sim	Sim	Nao	Nao
P50	Sim	Sim	Nao	Nao
P51	Sim	Sim	Nao	Sim
P52	Sim	Sim	Nao	Sim
P53	Nao	Nao	Nao	Nao
P54	Sim	Nao	Nao	Nao
P55	Sim	Nao	Nao	Nao
P56	Nao	Nao	Nao	Nao
P57	Nao	Nao	Nao	Nao
P58	Sim	Nao	Nao	Nao
P59	Nao	Nao	Nao	Nao
P60	Nao	Nao	Nao	Nao
P61	Sim	Sim	Nao	Nao
P62	Nao	Nao	Nao	Nao
P63	Nao	Nao	Nao	Nao
P64	Nao	Nao	Nao	Nao
P65	Sim	Sim	Nao	Nao
P66	Nao	Nao	Nao	Nao
P67	Sim	Sim	Nao	Sim
P68	Nao	Nao	Nao	Nao
P69	Nao	Nao	Nao	Nao
P70	Nao	Nao	Nao	Nao
P71	Sim	Sim	Nao	Sim
P72	Nao	Nao	Nao	Nao
P73	Nao	Nao	Nao	Nao
P74	Nao	Nao	Nao	Nao
P75	Nao	Nao	Nao	Nao
P76	Nao	Nao	Nao	Nao
P77	Nao	Nao	Nao	Nao
P78	Nao	Nao	Nao	Nao
P79	Nao	Nao	Nao	Nao
P80	Nao	Nao	Nao	Nao
P81	Nao	Nao	Nao	Nao
P82	Nao	Nao	Nao	Nao
P83	Sim	Nao	Nao	Nao
Melhor	Sim	Sim	Sim	Sim
Pior	Nao	Nao	Nao	Nao

Amostra	F_H_prateleiras	Produto_H_prateleira	Produto_H_queijaria
P01	Semanal	Agua	Sabao
P02	Semanal	Agua	Sabao
P03	2xSemana	Agua	Sabao
P04	2xSemana	Agua	Sabao
P05	3xSemana	Agua	Sabao
P06	Diario	Agua	Sabao
P07	Quinzenal	Agua	Cloro
P08	Semanal	Agua	Cloro
P09	2xSemana	Agua	SabaoeCloro
P10	2xSemana	Agua	Agua
P11	2xSemana	Agua	Detergente
P12	2xSemana	Agua	Detergente
P13	3xSemana	Agua	Detergente
P14	2xSemana	Agua	Detergente
P15	Semanal	Agua	Detergente
P16	Semanal	Agua	Agua
P17	3xSemana	Agua	Detergente
P18	Diario	Agua	Agua
P19	Quinzenal	Agua	Agua
P20	Semanal	Agua	Agua
P21	3xSemana	Agua	Agua
P22	Semanal	Agua	Agua
P23	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P24	3xSemana	Agua	Detergente
P25	Semanal	Agua	Detergente
P26	Semanal	Agua	Detergente
P27	2xSemana	Agua	Detergente
P28	2xSemana	Agua	Detergente
P29	Semanal	Agua	Detergente
P30	Semanal	Cloro	Detergente
P31	Semanal	Agua	SabaoeCloro
P32	Quinzenal	Agua	Agua
P33	Semanal	Agua	Detergente
P34	Semanal	Sabao	NA
P35	Quinzenal	Agua	Detergente
P36	Quinzenal	Agua	Agua
P37	Semanal	Agua	Detergente
P38	2xSemana	Agua	Detergente
P39	2xSemana	Agua	Detergente
P40	2xSemana	Agua	Detergente
P41	Quinzenal	Agua	Detergente
P42	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P43	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P44	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P45	2xSemana	Agua	Detergente

Amostra	F_H_prateleiras	Produto_H_prateleira	Produto_H_queijaria
P46	Semanal	Agua	Agua
P47	3xSemana	Agua	Detergente
P48	2xSemana	Agua	Detergente
P50	2xSemana	Agua	Detergente
P51	Semanal	Agua	Detergente
P52	Semanal	Agua	SabaoeCloro
P53	Semanal	Agua	Detergente
P54	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P55	Semanal	Vinagre	Detergente
P56	2xSemana	Agua	Cloro
P57	3xSemana	Agua	Detergente
P58	3xSemana	Agua	Detergente
P59	Semanal	Agua	Sabao
P60	Semanal	Agua	Detergente
P61	2xSemana	Cloro	SabaoeCloro
P62	2xSemana	Agua	Agua
P63	3xSemana	Agua	Agua
P64	2xSemana	Agua	Detergente
P65	2xSemana	Agua	SabaoeCloro
P66	Semanal	Agua	Detergente
P67	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P68	2xSemana	Agua	Detergente
P69	2xSemana	Agua	Detergente
P70	Semanal	Agua	Cloro
P71	3xSemana	Agua	SabaoeCloro
P72	2xSemana	Agua	Detergente
P73	2xSemana	Agua	Detergente
P74	2xSemana	Agua	Detergente
P75	Semanal	Agua	Detergente
P76	2xSemana	Agua	Agua
P77	3xSemana	Agua	Agua
P78	Semanal	Agua	Agua
P79	Semanal	Agua	Agua
P80	Semanal	Agua	Agua
P81	2xSemana	Agua	Detergente
P82	Semanal	Agua	Agua
P83	2xSemana	Agua	Agua
Melhor	Diario	Agua	SabaoeCloro
Pior	Quinzenal	Agua	Agua

Amostra	Teto	PisoQueijaria	RevestimentoQueijaria
P01	Laje	Ceramico	Azulejada
P02	Forrado	Ceramico	Azulejada
P03	Forrado	CimentoGrosso	Rebocada
P04	Forrado	Ceramico	Azulejada
P05	Forrado	Ceramico	Azulejada
P06	TelhaExposta	CimentoGrosso	Rebocada
P07	Forrado	Ceramico	Azulejada
P08	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P09	Forrado	Ceramico	Azulejada
P10	TelhaExposta	Ceramico	Azulejada
P11	Laje	Ceramico	Azulejada
P12	Forrado	Ceramico	Azulejada
P13	Forrado	Ceramico	Azulejada
P14	Laje	Ceramico	Azulejada
P15	Forrado	Ceramico	Azulejada
P16	Forrado	CimentoQueimado	Rebocada
P17	Forrado	Ceramico	Azulejada
P18	Forrado	CimentoQueimado	Rebocada
P19	TelhaExposta	CimentoGrosso	Rebocada
P20	TelhaExposta	CimentoGrosso	Rebocada
P21	Forrado	CimentoQueimado	Azulejada
P22	Forrado	CimentoQueimado	Rebocada
P23	Forrado	Ceramico	Azulejada
P24	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P25	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P26	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P27	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P28	Forrado	Ceramico	Azulejada
P29	Forrado	Ceramico	Azulejada
P30	Laje	Ceramico	Azulejada
P31	Forrado	Ceramico	Azulejada
P32	Laje	Ceramico	Rebocada
P33	Forrado	Ceramico	Azulejada
P34	Forrado	Ceramico	Azulejada
P35	TelhaExposta	CimentoGrosso	Rebocada
P36	TelhaExposta	CimentoGrosso	Rebocada
P37	Laje	Ceramico	Azulejada
P38	Forrado	Ceramico	Azulejada
P39	Forrado	Ceramico	Azulejada
P40	Forrado	CimentoQueimado	Azulejada
P41	Laje	Ceramico	Azulejada
P42	Forrado	Ceramico	Azulejada
P43	Forrado	Ceramico	Azulejada
P44	Forrado	Ceramico	Azulejada
P45	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada

Amostra	Teto	PisoQueijaria	RevestimentoQueijaria
P46	Laje	Ceramico	Azulejada
P47	Laje	Ceramico	Azulejada
P48	Laje	Ceramico	Azulejada
P50	Laje	Ceramico	Azulejada
P51	Laje	Ceramico	Azulejada
P52	Laje	Ceramico	Azulejada
P53	Forrado	CimentoQueimado	Rebocada
P54	TelhaExposta	CimentoQueimado	Azulejada
P55	TelhaExposta	Ceramico	Azulejada
P56	Forrado	CimentoQueimado	Rebocada
P57	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P58	Forrado	Ceramico	Azulejada
P59	TelhaExposta	CimentoGrosso	Rebocada
P60	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P61	Laje	Ceramico	Azulejada
P62	Forrado	CimentoGrosso	Rebocada
P63	TelhaExposta	CimentoGrosso	Azulejada
P64	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P65	Forrado	Ceramico	Azulejada
P66	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P67	Forrado	Ceramico	Azulejada
P68	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P69	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P70	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P71	Forrado	Ceramico	Rebocada
P72	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P73	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P74	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P75	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P76	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P77	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P78	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P79	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P80	TelhaExposta	Ceramico	Azulejada
P81	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
P82	TelhaExposta	Ceramico	Rebocada
P83	TelhaExposta	CimentoQueimado	Rebocada
Melhor	Laje	Ceramico	Azulejada
Pior	Forrado	CimentoGrosso	Rebocada

Amostra	TelaJanelaQueijaria	origemAgua	Clorador	MaterialdoLatao
P01	Sim	QuedaLivre	Sim	Plastico
P02	Sim	Mina	Nao	Plastico
P03	Nao	Mina	Nao	Plastico
P04	Sim	Mina	Sim	Plastico
P05	Sim	Mina	Sim	Plastico
P06	Nao	Mina	Nao	Plastico
P07	Nao	Mina	Nao	Plastico
P08	Nao	Mina	Nao	Plastico
P09	Sim	Mina	Nao	Plastico
P10	Nao	Mina	Nao	Plastico
P11	Sim	Mina	Nao	Inox
P12	Sim	Mina	Nao	Plastico
P13	Sim	Mina	Nao	Plastico
P14	Sim	Mina	Sim	Plastico
P15	Sim	Mina	Sim	Plastico
P16	Nao	Mina	Nao	Plastico
P17	Sim	Rio	Sim	Plastico
P18	Sim	Mina	Sim	Plastico
P19	Nao	QuedaLivre	Nao	Plastico
P20	Nao	Mina	Nao	Plastico
P21	Sim	Mina	Nao	Plastico
P22	Sim	QuedaLivre	Nao	Plastico
P23	Sim	Mina	Nao	Plastico
P24	Nao	Rio	Nao	Plastico
P25	Sim	Mina	Nao	Plastico
P26	Sim	Mina	Nao	Plastico
P27	Sim	Mina	Nao	Plastico
P28	Sim	Mina	Nao	Plastico
P29	Sim	Mina	Sim	Plastico
P30	Sim	QuedaLivre	Sim	Inox
P31	Sim	QuedaLivre	Nao	Plastico
P32	Sim	Mina	Nao	Plastico
P33	Sim	QuedaLivre	Nao	Plastico
P34	Sim	Mina	Sim	Plastico
P35	Nao	QuedaLivre	Nao	Plastico
P36	Nao	QuedaLivre	Nao	Plastico
P37	Sim	PocoArtesanal	Sim	Inox
P38	Sim	Mina	Sim	Plastico
P39	Sim	QuedaLivre	Sim	Plastico
P40	Sim	Mina	Nao	Plastico
P41	Sim	Mina	Nao	Plastico
P42	Sim	Mina	Sim	Plastico
P43	Sim	Mina	Nao	Plastico
P44	Sim	Mina	Sim	Plastico
P45	Sim	Mina	Nao	Plastico

Amostra	TelaJanelaQueijaria	origemAgua	Clorador	MaterialdoLatao
P46	Sim	Mina	Sim	Plastico
P47	Sim	PocoArtesanal	Sim	Inox
P48	Sim	Mina	Sim	Plastico
P50	Sim	Mina	Sim	Plastico
P51	Sim	Mina	Sim	Plastico
P52	Sim	Mina	Sim	Plastico
P53	Nao	Cisterna	Nao	Plastico
P54	Nao	Cisterna	Nao	Plastico
P55	Sim	Mina	Nao	Plastico
P56	Nao	Mina	Nao	Plastico
P57	Nao	Mina	Nao	Plastico
P58	Sim	Mina	Sim	Plastico
P59	Nao	Rio	Nao	Plastico
P60	Nao	Rio	Nao	Plastico
P61	Sim	Mina	Sim	Plastico
P62	Sim	QuedaLivre	Nao	Plastico
P63	Nao	Mina	Nao	Plastico
P64	Sim	Mina	Nao	Plastico
P65	Sim	Encanada	Sim	Plastico
P66	Nao	Rio	Nao	Plastico
P67	Sim	Mina	Sim	Plastico
P68	Nao	Rio	Nao	Plastico
P69	Sim	Rio	Nao	Plastico
P70	Nao	Mina	Nao	Plastico
P71	Sim	Rio	Nao	Plastico
P72	Nao	Mina	Nao	Plastico
P73	Nao	Mina	Nao	Plastico
P74	Nao	Mina	Nao	Plastico
P75	Nao	Mina	Nao	Plastico
P76	Nao	Mina	Nao	Plastico
P77	Nao	Rio	Nao	Plastico
P78	Sim	Mina	Nao	Plastico
P79	Sim	Mina	Nao	Plastico
P80	Nao	Mina	Nao	Plastico
P81	Sim	Mina	Nao	Plastico
P82	Sim	Mina	Nao	Plastico
P83	Nao	QuedaLivre	Nao	Plastico
Melhor	Sim	PocoArtesanal	Sim	Inox
Pior	Nao	Rio	Nao	Plastico

Amostra	Material da pá	Dessorador De Pano	Material Da Bancada	Composicao Do Rebanho
P01	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P02	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P03	Plastico	Sim	Granito	JerseyHolandes
P04	NA	Sim	Granito	Mestico
P05	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P06	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P07	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P08	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P09	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P10	NA	Sim	Ardosia	Caracu
P11	Inox	Sim	Inox	Mestico
P12	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P13	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P14	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P15	Plastico	Sim	Ardosia	Holandes
P16	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P17	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P18	Inox	Sim	Ardosia	Holandes
P19	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P20	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P21	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P22	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P23	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P24	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P25	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P26	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P27	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P28	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P29	Plastico	Sim	Inox	Mestico
P30	NA	Sim	Granito	Holandes
P31	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P32	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P33	Plastico	Sim	Ardosia	Holandes
P34	Plastico	Sim	Ardosia	Holandes
P35	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P36	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P37	Inox	Sim	Inox	Mestico
P38	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P39	Inox	Sim	Ardosia	Girolando
P40	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P41	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P42	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P43	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P44	NA	Sim	Ardosia	Holandes

Amostra	Material da pá	Dessorador De Pano	Material Da Bancada	Composicao Do Rebanho
P45	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P46	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P47	Inox	Sim	Inox	Girolando
P48	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P50	Inox	Sim	Ardosia	Mestico
P51	Plastico	Sim	Ardosia	Mestico
P52	Plastico	Sim	Ardosia	Girolando
P53	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P54	NA	Sim	Ardosia	Girolando
P55	NA	Sim	Ardosia	Girolando
P56	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P57	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P58	Inox	Sim	Ardosia	Holandes
P59	NA	Nao	Madeira	Holandes
P60	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P61	Plastico	Sim	Ardosia	JerseyHolandes
P62	NA	Sim	Ardosia	Girolando
P63	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P64	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P65	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P66	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P67	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P68	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P69	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P70	NA	Sim	NA	Mestico
P71	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P72	NA	Nao	Ardosia	Holandes
P73	NA	Nao	Ardosia	Holandes
P74	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P75	NA	Sim	Ardosia	Holandes
P76	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P77	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P78	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P79	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P80	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P81	NA	Nao	Ardosia	Holandes
P82	NA	Sim	Ardosia	Mestico
P83	Plastico	Sim	Ardosia	Holandes
Melhor	Inox	Sim	Inox	NA
Pior	Plastico	Nao	Madeira	NA

Amostra	AlimentacaoDoRebanho	AmbienteDeAlimentacao
P01	SilagemRacao	SemiAberto
P02	SilagemRacao	SemiAberto
P03	SilagemRacao	SemiAberto
P04	SilagemRacao	Aberto
P05	Racao	Aberto
P06	SilagemRacao	SemiAberto
P07	Racao	Aberto
P08	SilagemRacao	SemiAberto
P09	SilagemRacao	Aberto
P10	Racao	SemiAberto
P11	Racao	Aberto
P12	SilagemRacao	Aberto
P13	SilagemRacao	Aberto
P14	SilagemRacao	Aberto
P15	SilagemRacao	Aberto
P16	Silagem	Aberto
P17	SilagemRacao	SemiAberto
P18	SilagemRacao	Aberto
P19	SilagemRacao	SemiAberto
P20	SilagemRacao	SemiAberto
P21	SilagemRacao	SemiAberto
P22	SilagemRacao	SemiAberto
P23	SilagemRacao	SemiAberto
P24	Racao	Aberto
P25	SilagemRacao	SemiAberto
P26	SilagemRacao	SemiAberto
P27	SilagemRacao	SemiAberto
P28	SilagemRacao	SemiAberto
P29	SilagemRacao	Aberto
P30	SilagemRacao	SemiAberto
P31	Silagem	Aberto
P32	Racao	Aberto
P33	SilagemRacao	Aberto
P34	SilagemRacao	SemiAberto
P35	SilagemRacao	SemiAberto
P36	SilagemRacao	SemiAberto
P37	SilagemRacao	SemiAberto
P38	SilagemRacao	SemiAberto
P39	SilagemRacao	SemiAberto
P40	Pastagem	SemiAberto
P41	SilagemRacao	Aberto
P42	SilagemRacao	Aberto
P43	SilagemRacao	Aberto
P44	SilagemRacao	Aberto
P45	Silagem	SemiAberto

Amostra	AlimentacaoDoRebanho	AmbienteDeAlimentacao
P46	SilagemRacao	SemiAberto
P47	Racao	SemiAberto
P48	SilagemRacao	SemiAberto
P50	Pastagem	SemiAberto
P51	Silagem	SemiAberto
P52	Silagem	Aberto
P53	Silagem	SemiAberto
P54	Silagem	SemiAberto
P55	Silagem	Aberto
P56	SilagemRacao	Aberto
P57	Racao	Aberto
P58	SilagemRacao	SemiAberto
P59	SilagemRacao	Aberto
P60	SilagemRacao	Aberto
P61	Pastagem	SemiAberto
P62	Pastagem	SemiAberto
P63	Pastagem	SemiAberto
P64	Pastagem	SemiAberto
P65	SilagemRacao	SemiAberto
P66	SilagemRacao	Aberto
P67	SilagemRacao	Aberto
P68	SilagemRacao	Aberto
P69	SilagemRacao	Aberto
P70	Pastagem	SemiAberto
P71	Racao	SemiAberto
P72	SilagemRacao	Aberto
P73	SilagemRacao	Aberto
P74	Pastagem	SemiAberto
P75	Pastagem	SemiAberto
P76	Pastagem	SemiAberto
P77	Pastagem	SemiAberto
P78	Pastagem	SemiAberto
P79	Pastagem	SemiAberto
P80	Pastagem	SemiAberto
P81	Pastagem	SemiAberto
P82	Pastagem	SemiAberto
P83	Pastagem	SemiAberto
Melhor	NA	SemiAberto
Pior	NA	Aberto

APÊNDICE VI: Dados referentes as amostras de pingos obtidas.

SampleID	cidade	Pareado	Pareado com	Riqueza	chao1
P01P1	Medeiros	TRUE	P01Q1	55	78.1
P02P2	Medeiros	TRUE	P02Q2	48	113
P02P1	Medeiros	FALSE		51	66.83333333
P03P1	Medeiros	FALSE		126	163.4347826
P03P2	Medeiros	TRUE	P03Q2	52	110.5
P04P1	Medeiros	FALSE		73	124.6666667
P04P2	Medeiros	TRUE	P04Q2	104	155.4761905
P05P1	Medeiros	TRUE	P05Q1	247	386.5333333
P06P1	Medeiros	TRUE	P06Q1	90	158.3333333
P07P1	Medeiros	TRUE	P07Q1	114	209.4
P08P1	Medeiros	FALSE		205	334.1111111
P08P2	Medeiros	TRUE	P08Q2	125	366.5
P09P2	Medeiros	TRUE	P09Q2	74	148.5454545
P09P1	Medeiros	FALSE		154	297.6363636
P10P1	Medeiros	TRUE	P10Q1	212	250.0769231
P11P1	Medeiros	TRUE	P11Q1	101	211.0769231
P12P1	Medeiros	TRUE	P12Q1	44	74
P13P1	Medeiros	TRUE	P13Q1	100	165
P14P1	Medeiros	TRUE	P14Q1	118	215.65
P15P1	Medeiros	TRUE	P15Q1	78	180.5
P16P1	Medeiros	TRUE	P16Q1	114	259.0909091
P17P1	Medeiros	TRUE	P17Q1	181	261
P18P1	Medeiros	FALSE		64	93
P19P2	Medeiros	TRUE	P19Q2	81	171.0833333
P19P1	Medeiros	FALSE		95	273.875
P20P1	Medeiros	TRUE	P20Q1	221	273.5277778
P21P1	Medeiros	TRUE	P21Q1	138	223.55
P22P1	Medeiros	TRUE	P22Q1	111	217
P23P1	Medeiros	TRUE	P23Q1		
P24P1	Medeiros	TRUE	P24Q1	141	196
P25P1.2	Medeiros	TRUE	P25Q1	123	243.5454545
P27P1	Medeiros	TRUE	P27Q1	61	107.5
P28P1	Medeiros	TRUE	P28Q1	63	102.5454545
P29P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P29Q1	89	133
P30P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P30Q1	79	259.1666667
P31P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P31Q1	55	95.625
P32P1	Medeiros	TRUE	P32Q1	86	141.7142857
P33P1	Medeiros	TRUE	P33Q1	53	170
P34P1	Medeiros	TRUE	P34Q1	64	118.375
P35P1	Medeiros	TRUE	P35Q1	91	197.25
P36P1	Medeiros	TRUE	P36Q1	205	351
P37P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P37Q1	64	82.4

SampleID	cidade	Pareado	Pareado_com	Riqueza	chao1
P38P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P38Q1	53	111.125
P39P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P39Q1	44	65
P40P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P40Q1	71	112.3333333
P41P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P41Q1	82	185.5
P42P1	Medeiros	TRUE	P42Q1	53	72.46153846
P43P1	Medeiros	TRUE	P43Q1	141	341.2
P44P1	Medeiros	TRUE	P44Q1	98	342.4285714
P45P1	SaoRoqueDeMinas	FALSE		76	135.5
P46P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P46Q1	81	201.1111111
P47P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P47Q1	59	154.1428571
P48P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P48Q1	52	112
P50P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P50Q1	60	83
P51P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P51Q1	30	35.625
P52P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P52Q1	83	193
P53P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P53Q1	76	112.25
P54P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P54Q1	46	146
P55P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P55Q1	58	94.14285714
P56P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P56Q1	85	208.5
P57P1	Medeiros	TRUE	P57Q1	86	147.5
P58P1	Medeiros	TRUE	P58Q1	65	76.05263158
P59P1	Medeiros	FALSE		96	300.4285714
P60P1	Medeiros	FALSE		68	102.5
P61P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P61Q1	112	262.2727273
P62P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P62Q1	125	280.5454545
P63P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P63Q1	108	204.25
P64P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P64Q1	95	161.2307692
P65P1	Medeiros	FALSE		103	153.6470588
P66P1	Medeiros	TRUE	P66Q1	68	105.5
P67P1	Medeiros	TRUE	P67Q1	78	136
P68P1	Medeiros	FALSE		83	223.6
P69P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P69Q1	69	156
P70P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P70Q1	41	68.14285714
P71P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P71Q1	56	110.375
P72P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P72Q1	122	266
P73P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P73Q1	54	61.8
P74P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P74Q1	51	66.54545455
P75P1	Medeiros	TRUE	P75Q1		
P76P1	Medeiros	TRUE	P76Q1	73	88
P77P1	Medeiros	TRUE	P77Q1	115	252.75
P78P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P78Q1	68	126.5833333
P79P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P79Q1	57	89.5
P80P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P80Q1	109	321.5
P81P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P81Q1	72	130
P82P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P82Q1	102	306.4285714
P83P1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P83Q1	50	80

SampleID	evenness	shannon	faith_pd	Salinidade	pH	Altitude	Cadastro IMA
P01P1	0.19802	1.14482	3.34711			869	1
P02P2	0.12463	0.69606	2.97751	3.252752	4.86	1056	1
P02P1	0.06554	0.37175	4.00155			1056	1
P03P1	0.36506	2.54716	7.84365			1050	1
P03P2	0.10986	0.62625	2.80171	5.131686	5.09	1050	1
P04P1	0.11404	0.70586	4.41893			1064	0
P04P2	0.15571	1.04333	4.90254	6.245045	5.24	1064	0
P05P1	0.46867	3.72515	11.11735	0.879308		889	0
P06P1	0.31897	2.07072	6.20682	0.911142		803	0
P07P1	0.19726	1.34785	7.01438	0.412218		876	0
P08P1	0.41057	3.15299	10.67606			871	0
P08P2	0.18151	1.26435	6.90246	7.344573	5.22	871	0
P09P2	0.25270	1.56910	5.18672	6.926545	5.22	844	0
P09P1	0.24626	1.78954	7.94635			844	0
P10P1	0.50962	3.93829	10.52658	0.409272		841	0
P11P1	0.14631	0.97413	5.86728	0.424244		843	1
P12P1	0.03357	0.18327	3.32296	7.004638	5.54	700	1
P13P1	0.21191	1.40788	5.95545	1.598995	6.52	912	1
P14P1	0.22768	1.56706	7.36884	9.137114	5.67	998	1
P15P1	0.29158	1.83267	4.80798	3.710654	5.45	867	1
P16P1	0.29452	2.01245	5.63240	4.231092	5.15	852	0
P17P1	0.26651	1.99879	8.66977	8.886777	6.37	832	1
P18P1	0.09006	0.54038	3.27840	2.413776	4.65		0
P19P2	0.11018	0.69854	3.30999	8.111548	5.61	983	0
P19P1	0.30579	2.00898	5.75658		5.9	983	0
P20P1	0.54315	4.22999	9.82124	20.48743	6.31	994	0
P21P1	0.31985	2.27369	7.61862	14.68629	6.1	984	0
P22P1	0.24835	1.68737	5.61812	9.171788	5.99	967	0
P23P1				24.19654	6.05	967	0
P24P1	0.42171	3.01084	8.74554	11.16422	6.44	948	0
P25P1.2	0.39392	2.73479	6.79096		5.76	907	0
P27P1	0.24074	1.42779	3.89282	17.29761	4.76	878	0
P28P1	0.07912	0.47292	3.69184	5.084692	5.29	883	1
P29P1	0.32919	2.13172	4.87702	5.035554	4.86	892	1
P30P1	0.40861	2.57581	3.89883	6.468272	5.45	857	1
P31P1	0.05084	0.29393	3.55289	5.063407	5.17	837	1
P32P1	0.15927	1.02352	5.39096	4.078823	4.95	1020	0
P33P1	0.29718	1.70222	3.12722	4.540187	4.94	933	1
P34P1	0.30588	1.83526	2.68025	2.166985	5.2	901	1
P35P1	0.20111	1.30876	5.68908	5.225766	6.12	911	0
P36P1	0.56199	4.31580	9.35461	0.51036	5.85	818	0
P37P1	0.26318	1.57908	3.28348	4.078357	5.38	863	1
P38P1	0.29861	1.71039	3.51474	5.711694	5.46	766	1
P39P1	0.01848	0.10088	2.85290	3.252792	5.07	801	1
P40P1	0.23323	1.43431	4.78721	7.173867	5.02	852	1

SampleID	evenness	shannon	faith_pd	Salinidade	pH	Altitude	Cadastro IMA
P41P1	0.22017	1.39976	3.31999	3.263625	5.2	862	0
P42P1	0.08413	0.48190	3.04930	1.202042	4.81	981	1
P43P1	0.46163	3.29584	6.79681		5.33	890	0
P44P1	0.33949	2.24564	6.07017		5.44	993	1
P45P1	0.34028	2.12606	3.85787	2.10834	4.56	803	1
P46P1	0.34709	2.20049	4.45662	3.451855	4.78	838	1
P47P1	0.33176	1.95160	4.35367	6.277352	5.22	885	1
P48P1	0.39829	2.27040	3.13599	5.675899	4.73	781	1
P50P1	0.06580	0.38866	2.76898	10.32666	4.8	800	1
P51P1	0.03543	0.17386	2.13976	11.01766	4.82		0
P52P1	0.39450	2.51492	4.90349	10.24704	5.25	850	0
P53P1	0.08288	0.51781	3.63093	2.665708	4.86	841	0
P54P1	0.10167	0.56157	3.67325	2.638183	4.84	840	0
P55P1	0.30300	1.77499	3.62439	5.365882	5.87	866	1
P56P1	0.41907	2.68600	5.44294	5.344993	5.27	865	0
P57P1	0.23457	1.50739	4.59776	5.47944	5.04	949	0
P58P1	0.32474	1.95573	3.45183	3.344891	5.02	952	1
P59P1	0.37670	2.48054	5.32321	10.19118	5.06	960	0
P60P1	0.30795	1.87465	2.99241	3.163741	4.68	787	0
P61P1	0.37423	2.54752	4.56722	4.895785	5.45	926	1
P62P1	0.31915	2.22316	6.26528	6.386954	5.16	867	0
P63P1	0.19221	1.29837	6.49195	6.732394	5.28	963	0
P64P1	0.32819	2.15617	5.40632	3.602785	5.14	866	0
P65P1	0.32854	2.19680	6.14198	1.795639	5.13	946	1
P66P1	0.31916	1.94286	2.93928	4.112297	4.92	1092	0
P67P1	0.54261	3.41055	3.76563	4.110044	4.8	1001	1
P68P1	0.46947	2.99290	4.37802	3.818909	5.25	913	0
P69P1	0.46708	2.85317	4.17047	2.490012	5.17	1043	1
P70P1	0.15073	0.80754	3.55353	2.475941	4.93	994	0
P71P1	0.31384	1.82259	4.36497	7.530192	5.5	983	0
P72P1	0.30004	2.07947	5.46523	6.107975	4.94	1125	0
P73P1	0.35037	2.01636	3.85332	12.10073	5.22	1119	0
P74P1	0.13154	0.74614	3.02304	0.37379	4.88	1143	0
P75P1				8.596207	5.04	1044	0
P76P1	0.20710	1.28194	3.96477	6.437196	5.08	1009	0
P77P1	0.24882	1.70331	6.24363	12.59174	4.97	978	0
P78P1	0.31218	1.90039	3.88417	4.091911	4.53	1064	0
P79P1	0.37534	2.18934	4.30014	11.84334	4.64	1067	0
P80P1	0.36290	2.45616	5.43062	6.371513	4.55	1059	0
P81P1	0.31777	1.96063	3.64029	0.431331	4.52	1143	0
P82P1	0.28967	1.93277	5.72332	11.83733	4.84	1101	0
P83P1	0.23121	1.30494	3.38682	6.486605	4.69	1213	0

SampleID	Valor do queijo	BPF_score	Infrastructure score	Data de coleta
P01P1	40	78	70	04/07/2017
P02P2	35	79	60	08/08/2017
P02P1	35	79	60	04/07/2017
P03P1	30	60	41	08/08/2017
P03P2	30	60	41	08/08/2017
P04P1	25	32	63	08/08/2017
P04P2	25	32	63	08/08/2017
P05P1	12	23	67	04/07/2017
P06P1	12	35	21	04/07/2017
P07P1	12	16	53	04/07/2017
P08P1	12	11	34	08/08/2017
P08P2	12	11	34	08/08/2017
P09P2	12	23	60	08/08/2017
P09P1	12	23	60	08/08/2017
P10P1	12	7	45	04/07/2017
P11P1	50	76	83	04/07/2017
P12P1	25	72	58	12/07/2017
P13P1	25	60	58	12/07/2017
P14P1	60	70	71	12/07/2017
P15P1	20	65	67	25/07/2017
P16P1	12	8	33	25/07/2017
P17P1	30	81	62	25/07/2017
P18P1	12	72	53	25/07/2017
P19P2	12	3	25	22/08/2017
P19P1	12	3	25	25/07/2017
P20P1	12	8	25	01/08/2017
P21P1	12	33	53	01/08/2017
P22P1	12	6	39	01/08/2017
P23P1	12	18	53	01/08/2017
P24P1	12	19	29	01/08/2017
P25P1.2	25	12	34	22/08/2017
P27P1	20	36	40	22/08/2017
P28P1	30	50	60	22/08/2017
P29P1	60	73	76	04/09/2017
P30P1	50	72	83	04/08/2017
P31P1	80	77	59	04/09/2017
P32P1	20	1	55	12/09/2017
P33P1	25	51	59	12/09/2017
P34P1	25	96	62	12/09/2017
P35P1	12	7	25	12/09/2017
P36P1	12	2	25	12/09/2017
P37P1	60	67	100	25/09/2017
P38P1	60	71	67	25/09/2017
P39P1	40	69	66	25/09/2017
P40P1	35	46	53	25/09/2017

SampleID	Valor do queijo	BPF_score	Infrastructure score	Data de coleta
P41P1	30	59	64	25/09/2017
P42P1	15	82	67	03/10/2017
P43P1	15	69	60	03/10/2017
P44P1	20	94	67	03/10/2017
P45P1	40	54	38	16/10/2017
P46P1	50	86	71	16/10/2017
P47P1	60	85	100	16/10/2017
P48P1	40	69	71	16/10/2017
P50P1	40	61	71	31/10/2017
P51P1	30	69	71	31/10/2017
P52P1	30	79	71	08/11/2017
P53P1	15	10	29	08/11/2017
P54P1	20	40	30	08/11/2017
P55P1	30	49	54	08/11/2017
P56P1	20	23	33	08/11/2017
P57P1	15	14	34	24/01/2018
P58P1	30	64	67	24/01/2018
P59P1	12	13	4	24/01/2018
P60P1	12	15	21	24/01/2018
P61P1	40	73	71	30/01/2018
P62P1	20	6	37	30/01/2018
P63P1	20	7	32	30/01/2018
P64P1	20	25	34	30/01/2018
P65P1	12	64	71	14/02/2018
P66P1	10	19	23	14/02/2018
P67P1	40	68	67	14/02/2018
P68P1	12	20	29	14/02/2018
P69P1	30	20	36	26/02/2018
P70P1	12	5	22	26/02/2018
P71P1	12	73	48	26/02/2018
P72P1	12	15	20	26/02/2018
P73P1	12	13	20	26/02/2018
P74P1	12	13	27	26/02/2018
P75P1	12	12	34	05/03/2018
P76P1	12	8	27	05/03/2018
P77P1	12	9	23	05/03/2018
P78P1	12	8	34	14/03/2018
P79P1	12	8	34	14/03/2018
P80P1	12	8	41	14/03/2018
P81P1	12	29	26	14/03/2018
P82P1	12	6	41	14/03/2018
P83P1	12	45	33	14/03/2018

APÊNDICE VII: Dados referentes as amostras de queijos obtidas.

SampleID	Cidade	Pareado	Pareado com	Riqueza	chao1
P01Q1	Medeiros	TRUE	P01P1	67	114.3
P02Q2	Medeiros	TRUE	P02P2	108	283.0
P03Q2	Medeiros	TRUE	P03P2	72	93.0
P04Q2	Medeiros	TRUE	P04P2	73	124.7
P05Q1	Medeiros	TRUE	P05P1	91	149.7
P06Q1	Medeiros	TRUE	P06P1	62	144.7
P07Q1	Medeiros	TRUE	P07P1	83	116.3
P08Q2	Medeiros	TRUE	P08P2	84	150.1
P09Q2	Medeiros	TRUE	P09P2	68	95.6
P10Q1	Medeiros	TRUE	P10P1	101	221.5
P11Q1	Medeiros	TRUE	P11P1	78	136.0
P12Q1	Medeiros	TRUE	P12P1	101	178.2
P13Q1	Medeiros	TRUE	P13P1	114	147.0
P14Q1	Medeiros	TRUE	P14P1	61	84.0
P15Q1	Medeiros	TRUE	P15P1	84	111.6
P16Q1	Medeiros	TRUE	P16P1	133	961.3
P17Q1	Medeiros	TRUE	P17P1	65	109.0
P19Q2	Medeiros	TRUE	P19P2	63	110.3
P20Q1	Medeiros	TRUE	P20P1	94	160.0
P21Q1	Medeiros	TRUE	P21P1	93	140.6
P22Q1	Medeiros	TRUE	P22P1		
P23Q1	Medeiros	TRUE	P23P1	142	355.5
P24Q1	Medeiros	TRUE	P24P1	82	113.2
P25Q1	Medeiros	TRUE	P25P1.2	40	63.8
P26Q1	Medeiros	FALSE		138	186.8
P27Q1	Medeiros	TRUE	P27P1		
P28Q1	Medeiros	TRUE	P28P1	56	77.4
P29Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P29P1	108	138.0
P30Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P30P1	60	91.7
P31Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P31P1	100	175.3
P32Q1	Medeiros	TRUE	P32P1	100	147.8
P33Q1	Medeiros	TRUE	P33P1	63	94.5
P34Q1	Medeiros	TRUE	P34P1	74	110.3
P35Q1	Medeiros	TRUE	P35P1	53	72.0
P36Q1	Medeiros	TRUE	P36P1	136	242.9
P37Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P37P1	104	182.3
P38Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P38P1	96	117.9
P39Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P39P1	69	124.1
P40Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P40P1	99	130.2
P41Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P41P1	111	185.5
P42Q1	Medeiros	TRUE	P42P1	56	91.0
P43Q1	Medeiros	TRUE	P43P1	114	200.8
P44Q1	Medeiros	TRUE	P44P1	128	173.0

SampleID	Cidade	Pareado	Pareado com	Riqueza	chao1
P46Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P46P1	126	212.3
P47Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P47P1	68	104.3
P48Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P48P1	69	116.3
P50Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P50P1	77	139.3
P51Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P51P1	81	176.1
P52Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P52P1	90	127.8
P53Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P53P1	75	94.3
P54Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P54P1	76	134.1
P55Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P55P1	73	184.4
P56Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P56P1		
P57Q1	Medeiros	TRUE	P57P1	111	163.1
P58Q1	Medeiros	TRUE	P58P1	76	181.9
P61Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P61P1	112	170.8
P62Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P62P1	129	234.1
P63Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P63P1	136	251.6
P64Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P64P1	134	183.1
P66Q1	Medeiros	TRUE	P66P1		
P67Q1	Medeiros	TRUE	P67P1	94	160.0
P69Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P69P1		
P70Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P70P1	66	149.3
P71Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P71P1	101	142.1
P72Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P72P1	89	274.3
P73Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P73P1	90	181.1
P74Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P74P1	123	260.8
P75Q1	Medeiros	TRUE	P75P1	49	112.3
P76Q1	Medeiros	TRUE	P76P1	100	146.5
P77Q1	Medeiros	TRUE	P77P1	116	182.2
P78Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P78P1	65	105.6
P79Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P79P1	51	78.2
P80Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P80P1	74	110.9
P81Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P81P1	113	168.5
P82Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P82P1	77	147.9
P83Q1	SaoRoqueDeMinas	TRUE	P83P1	52	64.0

SampleID	evenness	shannon	faith_pd	pH	aw	Altitude	CadastroIMA
P01Q1	0.1912	1.1598	2.8944	5.35	0.933	869	1
P02Q2	0.3089	2.0866	3.9102	5.92	0.936	1056	1
P03Q2	0.3925	2.4217	3.4213	5.72	0.918	1050	1
P04Q2	0.1785	1.1048	2.9767	5.45	0.906	1064	0
P05Q1	0.4012	2.6109	3.8496	5.49	0.924	889	0
P06Q1	0.1615	0.9615	3.3384	6.08	0.82	803	0
P07Q1	0.4497	2.8671	3.7910	5.39	0.92	876	0
P08Q2	0.3522	2.2511	3.8968	5.5	0.818	871	0
P09Q2	0.3811	2.3201	3.4616	5.26	0.856	844	0

SampleID	evenness	shannon	faith_pd	pH	aw	Altitude	CadastralIMA
P10Q1	0.2378	1.5836	5.7763	6.51	0.914	841	0
P11Q1	0.2666	1.6754	2.6470	5.48	0.978	843	1
P12Q1	0.3497	2.3286	3.4661	5.34	0.96	700	1
P13Q1	0.5263	3.5961	5.2216	5.35	0.953	912	1
P14Q1	0.3615	2.1439	2.9827	5.93	0.932	998	1
P15Q1	0.3921	2.5062	4.0246	5.2	0.896	867	1
P16Q1	0.5026	3.5458	5.8511	5.37	0.876	852	0
P17Q1	0.1448	0.8719	4.0215	5.37	0.939	832	1
P19Q2	0.2335	1.3954	2.8580	5.34	0.853	983	0
P20Q1	0.5271	3.4550	3.4481	5.85	0.883	994	0
P21Q1	0.4100	2.6812	6.5508	5.51	0.91	984	0
P22Q1				5.19	0.81	967	0
P23Q1	0.3539	2.5301	6.9639	5.66	0.907	967	0
P24Q1	0.3298	2.0969	3.8921	5.33	0.902	948	0
P25Q1	0.2277	1.2117	2.1353	5.58	0.919	907	0
P26Q1	0.5301	3.7681	5.4714	5.51	0.912	889	0
P27Q1				5.36	0.904	878	0
P28Q1	0.3154	1.8316	2.4428	5.29	0.919	883	1
P29Q1	0.4211	2.8445	3.8278	5.57	0.937	892	1
P30Q1	0.3883	2.2938	1.9273	5.64	0.962	857	1
P31Q1	0.1798	1.1945	4.1562	5.86	0.941	837	1
P32Q1	0.2939	1.9530	3.6240	5.59	0.875	1020	0
P33Q1	0.3574	2.1364	2.0113	5.1	0.918	933	1
P34Q1	0.4002	2.4851	3.9535	5.28	0.915	901	1
P35Q1	0.1219	0.6983	2.6735	5.15	0.841	911	0
P36Q1	0.4985	3.5329	6.2290	5.44	0.819	818	0
P37Q1	0.4216	2.8247	3.7885	5.5	0.949	863	1
P38Q1	0.4784	3.1504	3.1898	5.58	0.969	766	1
P39Q1	0.3767	2.3013	2.4369	5.67	0.939	801	1
P40Q1	0.4711	3.1229	3.9162	5.61	0.932	852	1
P41Q1	0.4538	3.0830	3.8533	5.61	0.925	862	0
P42Q1	0.1272	0.7387	2.9616	5.27	0.924	981	1
P43Q1	0.4018	2.7457	3.9771	5.3	0.879	890	0
P44Q1	0.3515	2.4604	4.1869	5.32	0.894	993	1
P46Q1	0.4060	2.8331	3.8993	5.6	0.963	838	1
P47Q1	0.3161	1.9242	4.2920	5.49	0.935	885	1
P48Q1	0.3724	2.2749	3.3018	5.4	0.919	781	1
P50Q1	0.3164	1.9830	3.1078	5.54	0.912	800	1
P51Q1	0.3163	2.0053	3.0077	5.25	0.908		0
P52Q1	0.3664	2.3787	2.8609	5.77	0.945	850	0
P53Q1	0.2591	1.6137	3.6125	5.17	0.898	841	0
P54Q1	0.3328	2.0796	2.9902	5.65	0.949	840	0
P55Q1	0.2863	1.7719	4.5460	5.44	0.928	866	1
P56Q1				5.61	0.915	865	0
P57Q1	0.3497	2.3757	4.9979	5.55	0.947	949	0

SampleID	evenness	shannon	faith_pd	pH	aw	Altitude	CadastralIMA
P58Q1	0.1921	1.2000	3.0882	6.19	0.956	952	1
P61Q1	0.4244	2.8887	5.1865	5.64	0.958	926	1
P62Q1	0.3546	2.4863	4.3306	5.48	0.948	867	0
P63Q1	0.3872	2.7445	5.0692	5.47	0.943	963	0
P64Q1	0.3885	2.7454	5.4227	5.57	0.946	866	0
P66Q1				5.67	0.92	1092	0
P67Q1	0.5127	3.3603	3.1613	5.5	0.955	1001	1
P69Q1				5.47	0.957	1043	1
P70Q1	0.2746	1.6598	2.9869	5.3	0.948	994	0
P71Q1	0.3667	2.4417	4.4365	5.24	0.933	983	0
P72Q1	0.4009	2.5959	4.1968	5.35	0.901	1125	0
P73Q1	0.3207	2.0818	4.5659	5.46	0.917	1119	0
P74Q1	0.3642	2.5284	5.5052	5.34	0.914	1143	0
P75Q1	0.3012	1.6913	2.3158	5.33	0.919	1044	0
P76Q1	0.3267	2.1703	4.2029	5.57	0.945	1009	0
P77Q1	0.3259	2.2348	3.8880	5.69	0.929	978	0
P78Q1	0.3984	2.3993	2.9873	5.42	0.938	1064	0
P79Q1	0.4559	2.5861	2.4566	5.26	0.943	1067	0
P80Q1	0.3276	2.0344	3.8263	5.33	0.917	1059	0
P81Q1	0.3527	2.4053	4.7295	5.48	0.942	1143	0
P82Q1	0.4426	2.7737	3.3244	5.54	0.955	1101	0
P83Q1	0.2997	1.7083	2.5528	5.5	0.939	1213	0

SampleID	Valor_queijo	BPF_score	Infrastructure_score	coleta_queijo_data
P01Q1	40	78	70	25/07/2017
P02Q2	35	79	60	29/08/2017
P03Q2	30	60	41	29/08/2017
P04Q2	25	32	63	29/08/2017
P05Q1	12	23	67	25/07/2017
P06Q1	12	35	21	25/07/2017
P07Q1	12	16	53	25/07/2017
P08Q2	12	11	34	29/08/2017
P09Q2	12	23	60	29/08/2017
P10Q1	12	7	45	25/07/2017
P11Q1	50	76	83	25/07/2017
P12Q1	25	72	58	02/08/2017
P13Q1	25	60	58	02/08/2017
P14Q1	60	70	71	02/08/2017
P15Q1	20	65	67	15/08/2017
P16Q1	12	8	33	15/08/2017
P17Q1	30	81	62	15/08/2017
P19Q2	12	3	25	12/09/2017
P20Q1	12	8	25	22/08/2017
P21Q1	12	33	53	22/08/2017

SampleID	Valor_queijo	BPF_score	Infrastructure_score	coleta_queijo_data
P22Q1	12	6	39	22/08/2017
P23Q1	12	18	53	22/08/2017
P24Q1	12	19	29	22/08/2017
P25Q1	25	12	34	12/09/2017
P26Q1	20	27	34	12/09/2017
P27Q1	20	36	40	12/09/2017
P28Q1	30	50	60	12/09/2017
P29Q1	60	73	76	25/09/2017
P30Q1	50	72	83	25/09/2017
P31Q1	80	77	59	25/09/2017
P32Q1	20	1	55	03/10/2017
P33Q1	25	51	59	03/10/2017
P34Q1	25	96	62	03/10/2017
P35Q1	12	7	25	03/10/2017
P36Q1	12	2	25	03/10/2017
P37Q1	60	67	100	16/10/2017
P38Q1	60	71	67	16/10/2017
P39Q1	40	69	66	16/10/2017
P40Q1	35	46	53	16/10/2017
P41Q1	30	59	64	16/10/2017
P42Q1	15	82	67	24/10/2017
P43Q1	15	69	60	24/10/2017
P44Q1	20	94	67	24/10/2017
P46Q1	50	86	71	08/11/2017
P47Q1	60	85	100	08/11/2017
P48Q1	40	69	71	08/11/2017
P50Q1	40	61	71	04/12/2017
P51Q1	30	69	71	04/12/2017
P52Q1	30	79	71	04/12/2017
P53Q1	15	10	29	04/12/2017
P54Q1	20	40	30	04/12/2017
P55Q1	30	49	54	04/12/2017
P56Q1	20	23	33	04/12/2017
P57Q1	15	14	34	14/02/2018
P58Q1	30	64	67	14/02/2018
P61Q1	40	73	71	21/02/2018
P62Q1	20	6	37	21/02/2018
P63Q1	20	7	32	21/02/2018
P64Q1	20	25	34	21/02/2018
P66Q1	10	19	23	05/03/2018
P67Q1	40	68	67	05/03/2018
P69Q1	30	20	36	19/03/2018
P70Q1	12	5	22	19/03/2018
P71Q1	12	73	48	19/03/2018
P72Q1	12	15	20	19/03/2018

SampleID	Valor_queijo	BPF_score	Infrastructure_score	coleta_queijo_data
P73Q1	12	13	20	19/03/2018
P74Q1	12	13	27	19/03/2018
P75Q1	12	12	34	27/03/2018
P76Q1	12	8	27	27/03/2018
P77Q1	12	9	23	27/03/2018
P78Q1	12	8	34	02/04/2018
P79Q1	12	8	34	02/04/2018
P80Q1	12	8	41	02/04/2018
P81Q1	12	29	26	02/04/2018
P82Q1	12	6	41	02/04/2018
P83Q1	12	45	33	02/04/2018