

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS - *CAMPUS* BAMBUÍ  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Evelly de Souza Oliveira

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MICROBIOMA DE LEITE BOVINO  
DE AMOSTRAS INDIVIDUAIS E DE TANQUE DE EXPANSÃO  
REFRIGERADO EM REBANHOS PRODUTORES DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL CANASTRA**

BambuÍ  
2025

EVELLY DE SOUZA OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MICROBIOMA DE LEITE BOVINO  
DE AMOSTRAS INDIVIDUAIS E DE TANQUE DE EXPANSÃO  
REFRIGERADO EM REBANHOS PRODUTORES DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL CANASTRA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus Bambuí* como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Raphael Steinberg da Silva

Coorientador: Gustavo Augusto Lacorte

Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - Campus Bambuí

O48a Oliveira, Evely de Souza.  
Análise comparativa do microbioma de leite bovino de amostras individuais e de tanque de expansão refrigerado em rebanhos produtores do queijo Minas Artesanal Canastra. / Evely de Souza Oliveira. – Bambuí, 2025.  
90 f.: il.; color.

Orientador: Raphael Steinberg da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, MG, Curso Licenciatura em Ciências Biológicas, 2025.

1. Microbioma. 2. Leite. 3. Tanque de Expansão Refrigerado. I. Silva, Raphael Steinberg da. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, MG. III. Título.

CDD 576.163

Elaborada por Douglas Bernardes de Castro- CRB-6/2802



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA**  
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS**

**Campus Bambuí**

**Diretoria de Ensino**

**Departamento de Ciências e Linguagens**

Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Medeiros - Km 05 - Caixa Postal 05 - CEP 38900-000 - Bambuí - MG  
37 3431 4900 - www.ifmg.edu.br

**EVELLY DE SOUZA OLIVEIRA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MICROBIOMA DE LEITE BOVINO DE AMOSTRAS  
INDIVIDUAIS E DE TANQUE DE EXPANSÃO REFRIGERADO EM REBANHOS PRODUTORES  
DO QUEIJO MINAS ARTESANAL CANASTRA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus Bambuí* como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Raphael Steinberg da Silva.

Coorientador: Gustavo Augusto Lacorte

Aprovada em 03/02/2025 pela banca examinadora:

Prof<sup>o</sup>. Dr. Raphael Steinberg da Silva - IFMG (Orientador)

Prof<sup>o</sup>. Dr. Gustavo Augusto Lacorte – IFMG (Coorientador)

Prof<sup>o</sup>. Dr. Anderson Dutra de Melo - IFMG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ludimilla Portela Z.L. Suzuki - IFMG

Bambuí, 26 de janeiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Steinberg da Silva**, Professor, em 03/02/2025, às 16:45, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ludimilla Portela Zambaldi Lima Suzuki**, Professora, em 03/02/2025, às 16:49, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Dutra de Melo, Professor**, em 03/02/2025, às 16:49, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

---



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Augusto Lacorte, Professor**, em 03/02/2025, às 16:50, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

---



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.ifmg.edu.br/consultadocs> informando o código verificador **2175727** e o código CRC **26A12193**.

---

23209.002988/2021-43

2175727v1

Dedico este trabalho a Deus, que sempre esteve comigo, me amparando e fortalecendo nos momentos mais difíceis. A minha amada mãe, minha principal incentivadora, que sempre mostrou que o melhor caminho é o dos estudos. Também, a todos os meus familiares e amigos.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças ao apoio incondicional de amigos e familiares, que me fortaleceram ao longo dessa jornada. A todos vocês, ofereço meus sinceros agradecimentos. Sem o suporte e o carinho que me proporcionaram, teria sido difícil manter vivos os grandes sonhos que ainda desejo realizar.

Deus, em Sua infinita bondade, tem sido o meu maior alicerce. Ele se faz presente em todos os momentos, e Seu cuidado me faz sentir a filha mais amada. Por isso, a Ele dedico o meu agradecimento principal: ao Criador e Mantenedor de todo o conhecimento, que jamais me abandonou. Obrigada, Senhor, pelo Teu amor e misericórdia constantes.

Aos meus colegas de laboratório, deixo um agradecimento especial. Vocês foram fundamentais nos meus primeiros passos na pesquisa científica, auxiliando diretamente neste trabalho e sendo suporte em diversos outros projetos promovidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do IFMG – *Campus* Bambuí. Em especial, menciono Nathan, Talita, Carina, Francielle, Anderson, Júlia e Jeicilene, que tiveram um papel importante nessa trajetória.

Agradeço também à técnica de laboratório, Livia, que foi não apenas um suporte nos experimentos práticos, mas também uma conselheira sempre disposta a ajudar.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao professor Raphael Steinberg, que me ensinou tudo o que sei sobre pesquisa científica. Sua presença constante e disposição para esclarecer dúvidas foram essenciais para minha caminhada acadêmica.

Ao professor Gustavo Lacorte, agradeço por compartilhar seu conhecimento nas análises de bioinformática e por todo o auxílio no processo metodológico deste trabalho.

De forma especial, agradeço à minha amada mãe, Noeme, que nunca desistiu de mim e sempre acreditou em meu potencial, mesmo quando eu mesma duvidava. Tudo o que conquistei até aqui devo a você. Se consegui concluir o ensino superior, foi graças ao seu amor incondicional e incentivo constante. Obrigada por ser essa mãe extraordinária, que torce e ora diariamente pelo meu crescimento.

Agradeço também às minhas irmãs, Emelly e Hellen, que, cada uma à sua maneira, sempre demonstraram o quanto se importam comigo e me incentivaram ao longo desse processo.

Ao meu namorado, Vinícios, deixo meu agradecimento mais afetuoso. Você foi essencial na reta final deste TCC, um grande incentivador e acolhedor, sempre se empenhando para me ajudar a seguir firme e concluir esta etapa. Além disso, contribuiu com algumas das incríveis imagens deste trabalho.

Expresso também minha gratidão ao professor Anderson, um coordenador exemplar e uma pessoa extremamente humana, que demonstrou empatia e me ajudou muito durante minha trajetória acadêmica. Tenho um carinho especial por você.

Além daqueles já mencionados, não poderia deixar de agradecer aos amigos que fizeram parte dessa jornada de vida e estudos. Gabriel, Larissa, Thalita, Amanda, Mariana, Mayara, Heloíse e tantos outros que, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui. Saibam que, mesmo que seus nomes não estejam todos listados, cada gesto de apoio foi essencial, e sou imensamente grata a cada um de vocês.

Deixo também meus sinceros agradecimentos a todos os professores do curso, que foram fundamentais na minha formação acadêmica. Cada um de vocês contribuiu para o meu crescimento, transmitindo conhecimento, incentivando o pensamento crítico e oferecendo suporte durante momentos de dúvida. A dedicação de vocês à educação fez toda a diferença na minha trajetória, e serei eternamente grata por cada ensinamento.

Por fim, agradeço a todos os professores que estiveram presentes ao longo da minha graduação, à CAPES e à Reitoria do IFMG pelo apoio financeiro que foi essencial para minha permanência no curso.

“Quando abro a porta de uma nova descoberta, já encontro Deus lá dentro.”

Albert Einstein

## RESUMO

O leite bovino é uma matriz biológica rica e complexa, cuja microbiota exerce influência direta na qualidade dos produtos finais de sua cadeia produtiva e na saúde da glândula mamária. No contexto da produção do Queijo Minas Artesanal Canastra, a microbiota do leite é particularmente relevante, pois contribui tanto para as características sensoriais do queijo quanto para a manutenção da qualidade microbiológica da matéria-prima. O entendimento dessa microbiota é essencial para otimizar processos produtivos, garantir a segurança alimentar e desenvolver estratégias de controle de enfermidades, como a mastite, que afeta diretamente a qualidade do leite. Neste estudo, investigou-se o microbioma do leite bovino em rebanhos produtores do Queijo Minas Artesanal Canastra. Foram analisadas 94 amostras individuais de leite e 6 amostras de tanque de expansão refrigerado, totalizando 100 amostras provenientes de 6 fazendas da região. A identificação bacteriana foi realizada utilizando-se a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA. Os filos predominantes foram Actinobactéria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroides, com destaque para as classes Actinobactéria, Gammaproteobacteria, Clostridia e Alphaproteobacteria. Entre as bactérias do ácido láctico (BAL), observaram-se maiores frequências dos gêneros *Streptococcus* (77%), *Enterococcus* (9%), *Lactococcus* (5%), *Aerococcus* (3%) e *Lactobacillus* (2%). Corynebacteriaceae e Sphingomonaceae foram as famílias mais frequentes nos *heatmaps* das fazendas, enquanto, nos tanques de expansão refrigerado, as maiores frequências foram Corynebacteriaceae, Sphingomonaceae, Micrococcaceae e Moraxellaceae. A Análise das Coordenadas Principais (PCoA) revelou uma notável similaridade entre as amostras, independentemente da fazenda de origem ou do armazenamento no tanque. A ausência de agrupamentos distintos nos gráficos de PCoA sugere que fatores como proximidade geográfica e condições de manejo similares favorecem uma microbiota homogênea, sem alterações significativas ao longo do processo. Os resultados contribuem para uma melhor compreensão das comunidades microbianas no leite bovino e suas interações, bem como auxiliam no desenvolvimento de práticas voltadas à melhoria da saúde animal e da qualidade do leite. Além disso, os achados fornecem subsídios para estratégias baseadas no microbioma que promovam a sustentabilidade e a valorização da cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal Canastra.

**Palavras-chave:** Microbioma. Leite. Tanque de Expansão Refrigerado.

## ABSTRACT

Bovine milk is a rich and complex biological matrix, whose microbiota directly influences the quality of the final products in its production chain and the health of the mammary gland. In the context of Queijo Minas Artesanal Canastra production, the milk microbiota is particularly relevant, as it contributes both to the cheese's sensory characteristics and to maintaining the microbiological quality of the raw material. Understanding this microbiota is essential for optimizing production processes, ensuring food safety, and developing strategies to control diseases such as mastitis, which directly affects milk quality. This study investigated the bovine milk microbiome in herds producing Queijo Minas Artesanal Canastra. A total of 94 individual milk samples and 6 bulks tank milk samples were analyzed, amounting to 100 samples from six farms in the region. Bacterial identification was performed using 16S rRNA gene sequencing. The predominant phyla were Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes, with a particular emphasis on the classes Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Clostridia, and Alphaproteobacteria. Among lactic acid bacteria (LAB), the most frequently observed genera were *Streptococcus* (77%), *Enterococcus* (9%), *Lactococcus* (5%), *Aerococcus* (3%), and *Lactobacillus* (2%). Corynebacteriaceae and Sphingomonadaceae were the most frequent families in farm heatmaps, while in refrigerated bulk tanks, Corynebacteriaceae, Sphingomonadaceae, Micrococcaceae, and Moraxellaceae showed the highest frequencies. Principal Coordinates Analysis (PCoA) revealed a notable similarity among the samples, regardless of their farm of origin or storage in bulk tanks. The absence of distinct clusters in the PCoA plots suggests that factors such as geographical proximity and similar management conditions favor a homogeneous microbiota, without significant changes throughout the process. These findings contribute to a better understanding of microbial communities in bovine milk and their interactions, supporting the development of practices aimed at improving animal health and milk quality. Additionally, the results provide insights for microbiome-based strategies that promote sustainability and enhance the value of the Queijo Minas Artesanal Canastra production chain.

**Keywords:** Microbiome. Milk. Refrigerated Bulk Tank.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Etapas de fabricação do Queijo Minas Artesanal (QMA) .....	8
<b>Figura 2</b> – Região da Serra da Canastra e Municípios componentes .....	11
<b>Figura 3</b> – Esquema estrutural da glândula mamária bovina .....	14
<b>Figura 4</b> – Mecanismos de formação da microbiota do leite .....	16
<b>Figura 5</b> – Via enteromamária .....	17
<b>Figura 6</b> – Método dependente de cultivo.....	19
<b>Figura 7</b> – Regiões conservadas e variáveis do gene rRNA 16S .....	21
<b>Figura 8</b> – Gráfico de Filos e Classes .....	31
<b>Figura 9</b> – Distribuição de Gêneros de BAL entre Animais Doentes, Saudáveis e Tanques de Expansão Refrigerado, por Fazenda.....	38
<b>Figura 10</b> – Análise PCoA Geral: Dispersão das amostras de leite por estado de saúde do animal, sendo divididas entre animais saudáveis (HE), animais doentes (SM) e o tanque de expansão refrigerado (TK) .....	43
<b>Figura 11</b> – Análise PCoA Geral: Dispersão das amostras de leite estruturada por fazenda.....	44
<b>Figura 12</b> – Análise PCoA por Fazenda: Estruturação das amostras de leite por animais saudáveis (HE), animais doentes (SM) e o tanque de expansão refrigerado (TK).....	47
<b>Figura 13</b> – <i>Heatmap</i> de Família 1 (F1).....	50
<b>Figura 14</b> – <i>Heatmap</i> de Famílias da Fazenda 2 (F2) .....	51
<b>Figura 15</b> – <i>Heatmap</i> de Famílias da Fazenda 3 (F3) .....	52
<b>Figura 16</b> – <i>Heatmap</i> de Famílias da Fazenda 4.....	53
<b>Figura 17</b> – <i>Heatmap</i> de Famílias da Fazenda 5 .....	54
<b>Figura 18</b> – <i>Heatmap</i> de Famílias da Fazenda 6.....	55
<b>Figura 19</b> – <i>Heatmap</i> de Famílias dos Tanques de Expansão.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APROCAN - Associação dos Produtores de Queijo Canastra

CBT – Contagem Bacteriana Total

CCS – Contagem de Células Somáticas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

GM - Glândula Mamária

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPHAN – Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCoA - Análise das Coordenadas Principais

PIB – Produto Interno Bruto

QA – Queijo Artesanal

QMA – Queijo Minas Artesanal

QMAC – Queijo Minas Artesanal Canastra

RNA - Ácido Ribonucleico

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossomal

pb – Pares de bases

PERMANOVA - *Permutational Multivariate Analysis of Variance*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	5
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	5
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	6
<b>3.1. Pecuária leiteira e sua importância para a economia e sociedade</b> .....	6
<b>3.2. Queijo Minas Artesanal Canastra</b> .....	7
<b>3.3. Glândula mamária bovina</b> .....	12
<b>3.4. Microbiota do leite</b> .....	14
<b>3.5. Microbioma</b> .....	18
<b>3.6. Tanque de Expansão Refrigerado</b> .....	21
<b>4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODO</b> .....	26
<b>4.1. Fazendas, seleção de animais e coleta biológica</b> .....	26
<b>4.2. Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) do leite</b> .....	27
<b>4.3. Extração de DNA bacteriano total</b> .....	27
<b>4.4. Amplificação por PCR e sequenciamento de alto rendimento</b> .....	28
<b>4.5. Análises de Bioinformática</b> .....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>5.1. Perfil taxonômico</b> .....	30
<b>5.2. Bactérias do ácido lático (BAL)</b> .....	36
<b>5.3. Perfil de similaridade entre amostras e fazendas</b> .....	42
<b>5.4. Perfil taxonômico a nível familiar</b> .....	48
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é um setor de alta importância para a economia do país. Dividido entre agricultura, pecuária, silvicultura, pesca e aquicultura, é responsável por geração de milhares de empregos e produtos essenciais. No ano de 2017, 20,1% da força de trabalho brasileira estavam vinculados a esse setor, empregando 18,2 milhões de pessoas (Castro *et al.*, 2020). Além disso, no ano de 2021, o setor alcançou recordes com registros de 27% do PIB nacional (CEPEA, 2022). Dessa forma, o estudo do funcionamento e produtos gerados no agronegócio do país possui apelo considerável, tendo em vista o impacto desse departamento em âmbito econômico, trabalhista e nutricional.

Na parte nutricional, destacamos o leite, um fluido biológico que, com o passar do tempo, se tornou um dos principais alimentos na vida do ser humano. A variedade de receitas feitas a partir do produto lácteo é enorme. Visando ao aumento do consumo mundial e ao crescimento populacional, o mercado pecuário passou a investir em novas técnicas de produção, armazenagem e transporte, melhorando a qualidade do produto e diminuindo o tempo da fazenda até o mercado e do mercado para a mesa do consumidor. A consequência deste processo de tecnologia na cadeia produtiva do leite foi a elevação da produtividade brasileira para níveis mundiais e entrada do país na disputa com outros países para a exportação, causada pela redução de barreiras de comercialização e aumento do prazo da utilização do produto nacional (Oliveira, 2012; Bassotto, 2020).

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no ranking mundial, ocupando o 3º lugar no ano de 2020. Possui produção de 33,84 bilhões de litros, com média de 5% da produção mundial, ficando atrás somente dos Estados Unidos e Índia (Carvalho, 2020). A região com maior produção de leite no Brasil, entre os anos de 2016 e 2018, foi a Região Sul, com mais de 11,58 bilhões de litros, representando cerca de 34,24% do total nacional; em seguida, está a Região Sudeste, com mais de 11,46 bilhões de litros. Na mesma tendência, a maior produtividade continua sendo liderada pela Região Sul, com o valor de produção de 3437 litro/vaca/ano, em 2018, seguida pela Região Sudeste, com 2403 litro/vaca/ano (Carvalho, 2020).

No que tange ao poder econômico do agronegócio, é importante salientar que o PIB total do setor é dependente direto da agricultura empresarial e agricultura familiar. Essa última desempenhou papel fundamental no ano de 2017, envolvendo 10,1 milhões de pessoas

e representando cerca de 74% dos estabelecimentos rurais no Brasil, tendo como principal atividade a produção animal (Bustamante, 2021). Em muitas propriedades, a produção agrícola é assegurada pela produção familiar, ou seja, tem a participação direta da família na organização e execução rural, demonstrando que nem sempre é preciso uma estrutura de larga escala nem mesmo o emprego de mão de obra especializada e que pequenos produtores não são sinônimo de pequena produção (Benedetti, 2008). Uma atividade de destaque executada pelos agricultores familiares é a produção de queijos, na tentativa de agregar valor ao leite. Neste contexto, Minas Gerais possui regiões produtoras de queijos artesanais valorizados em nível nacional e internacional.

Dentre os vários queijos regionais produzidos em Minas Gerais, temos como destaque o Queijo Minas Artesanal Canastra, produzido na região da Serra da Canastra. Sua origem está associada à região da Serra da Estrela, em Portugal; no entanto, o queijo português é feito do leite das ovelhas com emprego, principalmente, de mão de obra feminina, e o Queijo Artesanal Canastra, de Minas, é feito com uso de leite bovino (Meneses, 2006; Netto, 2011). Sua produção contribui de forma direta com a identidade sociocultural da região, sendo produto da agricultura familiar e renda principal de muitas famílias locais.

O queijo Minas Artesanal Canastra é produzido a partir de leite cru de vaca, seguindo métodos tradicionais transmitidos por gerações na região da Serra da Canastra, em Minas Gerais. O processo começa com a ordenha, seguida da adição do pingo, um fermento natural obtido da produção anterior, que confere sabor e identidade ao queijo. Após a coagulação, a massa é cortada, mexida e dessorada antes de ser moldada em formas, prensada manualmente e salgada a seco ou em salmoura. Em seguida, os queijos são deixados para maturação em prateleiras, onde adquirem textura e sabor característicos devido à ação de microrganismos naturais do ambiente e do leite. A padronização desse processo é fundamental para garantir a qualidade, a segurança alimentar e a autenticidade do queijo, preservando sua tradição e assegurando que cada peça mantenha as características sensoriais que fazem do Canastra um dos queijos mais apreciados do Brasil (EMBRAPA, 2018).

O Parque Nacional da Serra da Canastra está situado na região sudeste do estado de Minas Gerais e apresenta altitudes variando de 637 a 1485 m. É berço da nascente do rio São Francisco, possui clima tropical, com vegetação típica do cerrado, com temperaturas médias em 22,2 °C e chuvas abundantes entre os meses de outubro e março. Essas condições climáticas são favoráveis para a produção do Queijo Minas Artesanal Canastra, propiciando o

desenvolvimento de bactérias típicas da região para uma fabricação de excelente qualidade e características organolépticas diferenciadas de outras localidades do Estado e do país (DATASEBRAE, 2016-2022). O estudo dessas bactérias é imprescindível tanto no âmbito científico quanto para a produção de alimentos, visando proporcionar segurança alimentar, qualidade do produto, valorização, inovação e diversificação.

As bactérias presentes no queijo têm origem no leite e desempenham um papel essencial na fermentação, maturação e desenvolvimento das características sensoriais do produto. Elas promovem a acidificação ao converter lactose em ácido lático, facilitando a coagulação das proteínas e a formação da estrutura do queijo. Além disso, durante a maturação, atuam na degradação de proteínas e lipídios, gerando compostos que influenciam diretamente o sabor, aroma e textura. Essas bactérias também contribuem para a segurança microbiológica do queijo ao produzir substâncias que inibem microrganismos indesejáveis. A composição e a atividade dessas bactérias são influenciadas por fatores como a qualidade do leite, o processo de fabricação e as condições de maturação, sendo determinantes para a identidade e a qualidade do queijo (Coelho *et al.*, 2022).

Nas fazendas queijeiras, o excedente de leite ordenhado que não é usado na produção de queijos é despejado diretamente em tanques de expansão, que possuem normativas técnicas rigorosas de controle de temperatura e higienização, com o objetivo de preservar a qualidade do produto inicial. Esses tanques mantêm o leite a uma temperatura adequada para evitar a proliferação de microrganismos patogênicos e retardar o crescimento bacteriano indesejado, assegurando que o leite esteja em condições ideais para seu beneficiamento. O leite armazenado nesses tanques é proveniente da maioria dos animais da fazenda, o que significa que sua microbiota reflete a combinação da diversidade bacteriana natural de cada vaca. Essa riqueza microbiana inclui tanto bactérias benéficas quanto possíveis patógenos, que devem ser monitorados e controlados.

O presente trabalho teve o objetivo de comparar a microbiota da glândula mamária bovina dos rebanhos produtores do Queijo Minas Artesanal Canastra, com intuito de analisar possíveis discrepâncias entre os microrganismos presentes no leite de animais individuais e no tanque de expansão refrigerado das fazendas. Dessa forma, os dados deste estudo podem contribuir significativamente no manejo dos animais e na fabricação e qualidade da cadeia produtiva do Queijo Minas Artesanal Canastra. Resultados aqui gerados podem ter considerável valor biotecnológico, podendo contribuir com abordagens bioterapêuticas a partir

da prospecção de bactérias potencialmente probióticas deste ecossistema, possibilitando maior qualidade microbiológica do leite durante o tratamento dos animais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Comparar a microbiota individual da glândula mamária bovina e de tanque de expansão refrigerado em rebanhos produtores de Queijo Minas Artesanal Canastra.

### **2.2. Objetivos Específicos**

A) Extrair DNA metagenômico a partir de amostras de leite cru de animais individuais e de tanque de expansão refrigerado de 6 fazendas da região da Serra da Canastra;

B) Examinar a composição microbiana da glândula mamária bovina pela análise da microbiota, baseada no sequenciamento de nova geração das porções V3-V4 do gene 16S rRNA, em amostras metagenômicas de DNA extraído a partir de leite cru;

C) Caracterizar a abundância de gêneros de bactérias do ácido lático (BAL);

D) Caracterizar a abundância de Filos e Classes bacterianas;

E) Identificar Famílias que representam abundância significativamente diferente entre as amostras individuais e de tanque de expansão refrigerado, por meio da análise de *Heatmaps*;

F) Identificar se existem diferenças significativas no microbioma de amostras de leite de animais individuais e amostras de leite do tanque de expansão refrigerado.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. Pecuária leiteira e sua importância para a economia e sociedade**

A pecuária desempenha papel significativo no mundo, tanto em termos econômicos quanto sociais. É um dos principais setores da economia mundial, ocupando a maior parte de área terrestre, dentre os 37% de terras agrícolas no Planeta (Parente *et al.*, 2019). Além de ser o setor responsável por empregar, diretamente, cerca de 1,3 bilhão de pessoas em todo o mundo, é também imprescindível na nutrição das nações (FAO, 2021).

No Brasil, a pecuária leiteira colocou o país em 3º lugar no *ranking* mundial, com produção de 33,84 bilhões de litros de leite, nos períodos de 2016 a 2018 (Carvalho, 2020). O país possui um dos maiores rebanhos mundiais, com 224,6 milhões de cabeças, que resultaram em produtos pecuários com valor de R\$ 91,4 bilhões, sendo 74,5% desse valor concentrados na pecuária leiteira (IBGE, 2022).

Dentre as cinco regiões brasileiras, o Sul lidera a produção nacional, porém, Minas Gerais é o estado de origem de maior produção estadual de leite, com 9,6 bilhões de litros, que correspondem a 27,2% da produção total (IBGE, 2022). O Estado destaca-se na produção leiteira, principalmente por possuir um rebanho bovino com 22,9 milhões de cabeças, tendo como as regiões com maior produção leiteira a mesorregião Sul/Sudeste, Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro (IBGE, 2022).

Como dito anteriormente, a pecuária destaca-se também por sua importância nutricional. O leite é um dos produtos derivados desse setor e possui papel valioso na nutrição humana por ser composto de carboidratos, lipídeos, proteínas, entre outros compostos orgânicos e inorgânicos que contribuem com essa função. Com isso, a pecuária leiteira está diretamente ligada com a segurança alimentar e nutricional do país (Zang *et al.*, 2021).

Além da importância econômica e nutricional, a pecuária leiteira também tem uma forte relevância social no Brasil. A agricultura familiar retrata papel fundamental na agropecuária brasileira, a qual, no ano de 2017, ocupava cerca de 77% dos estabelecimentos do setor, gerando cerca de 10,1 milhões de empregos (IBGE, 2019). Os empreendimentos familiares são responsáveis por trazer diversidade de cultura em todos os cinco biomas brasileiros, sendo reconhecidos internacionalmente pela produção alimentar, geração de

empregos, segurança alimentar e proteção da agrobiodiversidade e ecossistemas (EMBRAPA, 2019).

### **3.2. Queijo Minas Artesanal Canastra**

De acordo com a Lei n.º 13.860/2019, é considerado Queijo Artesanal (QA) todo aquele que for elaborado com métodos tradicionais, representando e valorizando algum território ou cultura, e produzido mediante protocolo específico e boas práticas de fabricação (BRASIL, 2019). No geral, os queijos artesanais não só oferecem experiências gastronômicas, mas também desempenham papel fundamental na preservação cultural, na economia local e sustentabilidade agrícola.

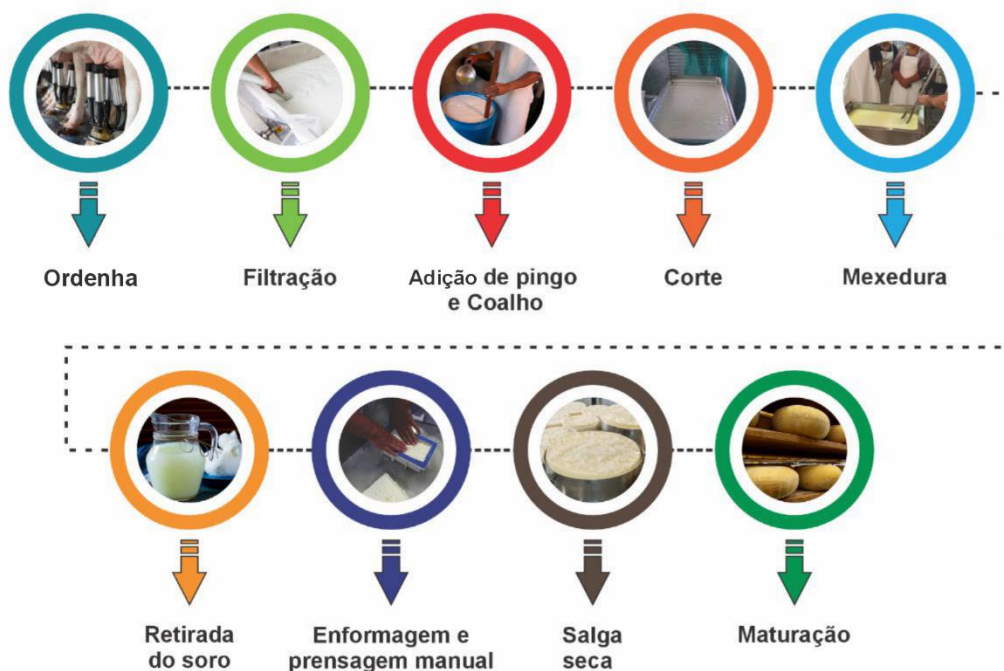
Em Minas Gerais, a produção de queijos é uma atividade de grande importância, principalmente cultural e econômica. Durante os anos de 1816 a 1831, as produções de queijos eram oriundas apenas dos estados de São Paulo e Minas Gerais, e esse último é conhecido até os tempos atuais como a “terra do queijo” (Meneses, 2006). Atualmente, é o Estado que mais tem criado normas e políticas públicas para regulamentação do comércio do Queijo Minas Artesanal (QMA) e possui uma produção estimada de 21,8 mil toneladas desse produto (EMATER, 2022; EMBRAPA, 2019).

Segundo o Decreto n.º 9.918, de 18 de julho de 2019, a matéria-prima de origem animal para a produção artesanal deve ser processada na própria propriedade, a partir de técnicas predominantemente manuais, em que o produto deve ser individualizado e genuíno, sendo mantidas as características tradicionais, culturais ou regionais (BRASIL, 2019). Dessa forma, o processo de fabricação do QMA possui protocolo apropriado e desempenhado de acordo com a tradição histórica e cultural da região de produção (Costa, 2022).

A Portaria IMA 1969, de março de 2020, estabelece a caracterização do QMA, na qual o Art. 2º considera como QMA aquele elaborado a partir do leite cru, hígido, integral, de produção própria e com utilização de soro fermentado (pingo), cujo produto final apresente consistência firme, com cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhadura mecânica. A referida legislação também determina que o leite deve ser usado até 90 minutos logo após a ordenha, sem tratamento térmico, e com emprego de culturas lácteas naturais e maturação conforme período estipulado para cada microrregião (Minas Gerais, 2020). No Art. 3º, a Portaria estabelece as etapas do processo de fabricação do QMA, sendo elas: filtração, adição de fermento natural (pingo) e coalho,

coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, enformagem, prensagem, salga seca e maturação (Minas Gerais, 2020), como mostrado ilustrativamente na Figura 1.

**Figura 1** – Etapas de fabricação do Queijo Minas Artesanal (QMA)



**Fonte:** Emater, 2022; Adaptado.

**Legenda:** A figura mostra as etapas de fabricação do Queijo Minas Artesanal, por ordem de execução, iniciando no processo de ordenha e seguido pelos demais, filtração, adição de pingo e coalho, corte, mexedura, retirada do soro, enformagem, prensagem manual e salga seca, finalizando na maturação.

De forma mais detalhada, o processo de ordenha é uma etapa crucial na produção do QMA, pois a qualidade do leite utilizado impacta diretamente nas características do queijo. O leite deve ser proveniente de um rebanho sadio, sem apresentação clínica de doenças, e é necessário atenção quanto à saúde e equipamentos de proteção dos ordenhadores, com finalidade de garantir a saúde do rebanho e higiene durante todo o processo. O método pode ser realizado de forma manual ou mecânica, desde que as boas práticas de ordenha sejam utilizadas para evitar contaminação. O processo de filtração do leite cru deve ser realizado até 90 minutos após a ordenha, para que não haja tratamento térmico e o leite utilizado esteja a aproximadamente 37°C. Nessa etapa, o leite passa por um funil com um tecido plástico de

malha fina, para remover qualquer impureza visível, e é direcionado para um tanque de armazenamento na área de produção (EMBRAPA, 2018).

Em seguida, ocorre a adição do pingo e coalho, etapa fundamental na produção do QMA. O “pingo” é um fermento endógeno de extrema importância na produção do QMA, pois desempenha papel crucial na fermentação e maturação do queijo. É originado do soro remanescente da produção queijeira do dia anterior e utilizado no dia seguinte para produção de um novo lote. O pingo contém alta concentração de cloreto de sódio e bactérias lácteas endógenas, e sua adição ao leite contribui para a formação de uma microbiota diversificada que caracteriza a região onde o queijo foi fabricado, sendo responsável pela cor, sabor, aroma e textura do queijo. Normalmente, o pingo é adicionado juntamente com o coalho, um coagulante enzimático que é adicionado em quantidade suficiente para coalhar o leite em um tempo de 45 a 60 minutos. A combinação desses dois elementos é essencial para a formação da coalhada e, conseqüentemente, do queijo. A prática de utilização do pingo é uma tradição que contribui para a singularidade do QMA (EMBRAPA, 2018; Oliveira, 2020).

Após o processo de coagulação, a massa deve ser mantida em repouso até atingir ponto de corte, que, geralmente, ocorre no período de 40 a 90 minutos, variação dependente de fatores como dosagem do pingo, composição do leite e estação do ano. O ponto do corte é determinado pela experiência do queijeiro, a partir de observação de partição da massa, mas o ideal é que essa se parta sem quebrar, formando uma fenda. O corte permite a dessoragem da massa; dessa forma, deve ser feito de maneira precisa, pois a antecipação pode causar desperdícios, e o atraso pode resultar em uma textura final indesejada (EMBRAPA, 2018).

Após o corte da massa, a mexedura é realizada de diferentes maneiras, a depender do produtor, e tem como objetivo auxiliar na separação do soro da massa. No caso do QMA da Serra da Canastra, esse processo ocorre em um período curto, que varia de 1 a 5 minutos, em que a massa é agitada com uma pá, utilizando-se movimentos lentos (EMBRAPA, 2018).

Durante a retirada do soro, também conhecida como dessoragem, a massa formada desce para o fundo do recipiente e o soro fica na parte superior, formando um sobrenadante. Para a retirada desse soro, são utilizados recipientes de plástico ou aço inoxidável, devidamente higienizados. Essa etapa é crucial para a obtenção da textura desejada do queijo, e o soro retirado costuma ser utilizado na alimentação animal. Posteriormente, vem a etapa de enformagem, na qual a massa do queijo parcialmente drenada é coletada e distribuída em

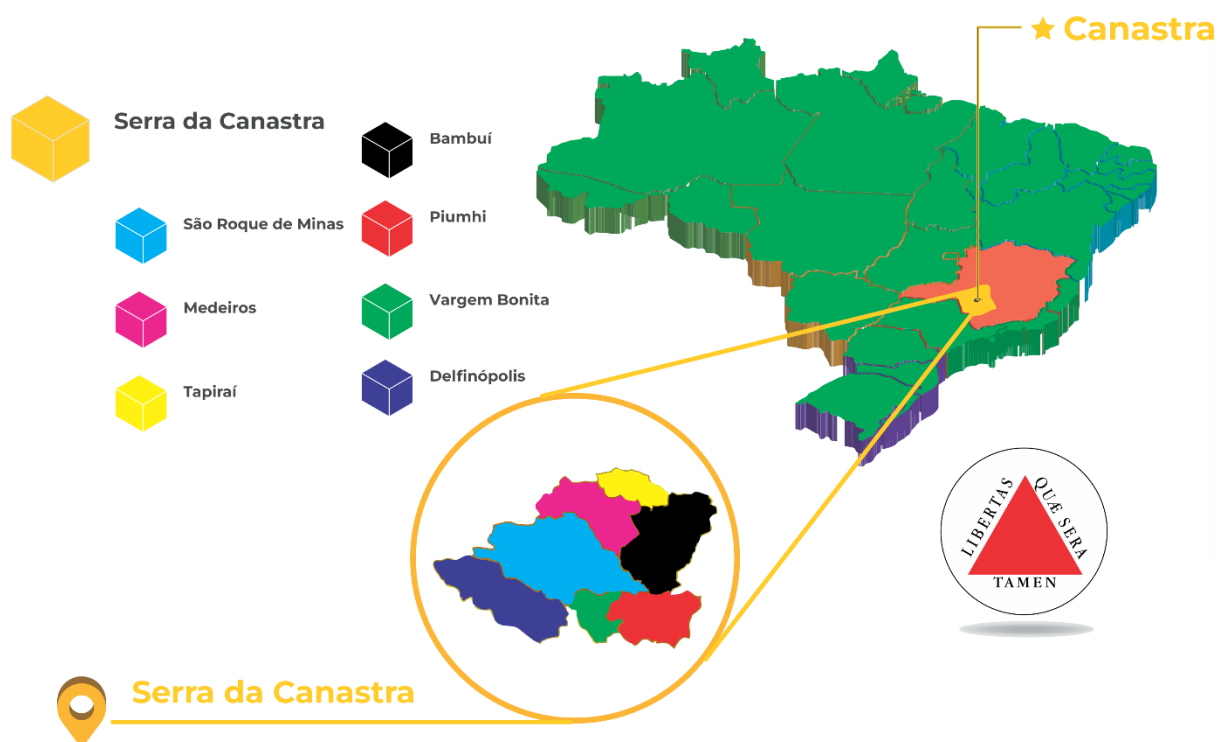
formas. No caso do QMA da Serra da Canastra, a enformagem é feita sobre um tecido sintético apropriado que é colocado na forma antes da adição da massa. Após esse processo, ocorre a prensagem manual, em que a massa nas formas é prensada com as mãos para se retirar o excesso de soro e compactá-la (EMBRAPA, 2018).

A salga a seco é o penúltimo processo na produção do QMA. Após a prensagem, os queijos recebem uma salga superficial a seco, com sal grosso ou triturado, na proporção de 40 a 120 g/kg de massa. Essa salga é realizada enquanto os queijos ainda estão nas formas, geralmente, em bancada de ardósia, que é o material mais utilizado para essa finalidade. Esse processo ocorre em duas etapas: após a primeira aplicação do sal, o queijo é deixado por um período de 6 a 12 horas descansando, no caso do QMA da Serra da Canastra. Em seguida, é virado, e o processo de salga, repetido. No segundo dia do processamento, o queijo é transferido para outra bancada, onde ocorre a retirada do excesso de sal (EMBRAPA, 2018).

A última etapa de produção do QMA é a maturação. A partir do segundo dia de fabricação, os queijos são transferidos para prateleiras de madeira, onde iniciam o processo de maturação. Durante essa fase, eles passam a ser virados regularmente, para que ocorra uma maturação uniforme, a qual deve ser realizada em temperatura ambiente ou em ambiente controlado, respeitando-se as tradições de fabricação e legislação vigente. O período mínimo de maturação para o QMA é de 22 dias e, durante esse processo, os queijos podem ser lavados com água corrente a cada 2 ou 3 dias, a depender das condições ambientais de temperatura e umidade. Essa etapa é fundamental para o desenvolvimento das características sensoriais do queijo (APROCAN, 2017; EMBRAPA, 2020).

O Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC) é um produto oriundo da parte social da pecuária leiteira de Minas Gerais. Sendo produzido através da agricultura familiar, o QMAC é responsável por trazer renda a mais de 800 famílias, dispostas na região da Serra da Canastra (Oliveira, 2020), composta pelos municípios de São Roque de Minas, Medeiros, Vargem Bonita, Tapiraí, Delfinópolis, Bambuí e Piumhi, como mostrado na Figura 2.

**Figura 2** – Região da Serra da Canastra e Municípios componentes



**Fonte:** Autor, 2024.

**Legenda:** A Figura mostra o mapa do Brasil, com destaque no estado de Minas Gerais e *zoom* nos municípios pertencentes à região da Serra da Canastra, divididos por localização e cor. Em azul-claro, temos São Roque de Minas; em rosa, Medeiros; em amarelo, Tapiraí; em preto, Bambuí; em vermelho, Piumhi; em verde, Vargem Bonita; e em azul, Delfinópolis.

A Serra da Canastra é conhecida por sua diversidade biológica, clima diversificado, paisagens e cursos d'água. Localizada no oeste e sul de Minas Gerais, a 343 km da capital, Belo Horizonte, é uma região integralmente estabelecida dentro do bioma cerrado, possuindo como unidade de conservação o Parque Nacional da Serra da Canastra (BRASIL, 2019). Além de riqueza em fauna e flora, a Serra da Canastra destaca-se por conter a nascente do rio São Francisco, um importante polo do ecoturismo e da produção do Queijo Minas Artesanal Canastra, um dos mais renomados do país (Oliveira, 2019; Bemfeito, 2016).

A produção de QMAC é uma prática que remonta a gerações, sendo transmitida de pais para filhos. O saber fazer queijo Canastra é considerado um patrimônio cultural imaterial, essencial para a identidade da região e registrado pelo Instituto do Patrimônio Histórico Artístico Nacional (IPHAN), garantindo sua proteção e valorização. Esse reconhecimento legal é um passo importante para a salvaguarda do conhecimento e das práticas associadas à

produção do queijo, permitindo que os produtores tenham acesso a políticas de apoio e incentivo (Marinho, 2017).

Os queijos artesanais da Serra da Canastra são produzidos principalmente por pequenos produtores rurais que fazem parte da agricultura familiar. Esses queijeiros seguem métodos e técnicas tradicionais que são regulamentadas pela Associação dos Produtores de Queijos Canastra (Aprocan), responsável por estabelecer normas que garantam qualidade e autenticidade do queijo (Chaves *et al.*, 2018). Essa produção artesanal é uma atividade que não apenas preserva tradições culturais, mas também proporciona alternativa econômica para os agricultores familiares. Muitos produtores de pequenas propriedades dependem da venda dos queijos para o sustento familiar e manutenção das atividades da fazenda. Sendo assim, a produção queijeira é sua principal fonte de renda (EMBRAPA, 2018).

### **3.3. Glândula mamária bovina**

A classe Mammalia se diferencia das demais por apresentar pelo menos três características únicas em seus representantes: a presença de três ossos no ouvido (bigorna, martelo e estribo), pelos e glândula mamária (GM). Nessa classe, há três linhagens: os prototérios (equidna e ornitorrinco), os metatérios (marsupiais) e os eutérios (placentários) (Lima *et al.*, 2015). Os prototérios apresentam desenvolvimento do feto dentro do ovo, ou seja, mantiveram a oviposição em sua evolução. Já os metatérios são animais que vivem parte de seu desenvolvimento dentro do marsúpio materno, onde há acesso à teta que será seu novo canal de nutrição. A terceira e última linhagem, os eutérios, inclui a maioria dos mamíferos; são animais placentários, que apresentam todo o seu desenvolvimento fetal dentro do útero materno (Moraes, 2016).

Os bovinos são animais da classe Mammalia, apresentando todas as características já citadas e se enquadrando dentro da linhagem dos eutérios. Sua particularidade é que são animais selecionados economicamente para a produção leiteira, diante de seu aceite social, poder reprodutivo e produtivo. Os principais aspectos que levaram esses animais a serem escolhidos como líderes na produção de carne e leite foram: zootécnicos, comportamentais e de rentabilidade. Dentro dos aspectos zootécnicos, a capacidade de produção, diversidade de raças e adaptação são características fundamentais para eles ocuparem o topo do pódio. A existência de diversas raças especializadas permite selecionar animais tanto para a produção de leite quanto para a produção de carne, pois, ainda que sejam animais com capacidade inata

de produzir grandes volumes, existe essa necessidade de classificação. Além disso, muitas raças bovinas possuem grande capacidade de adaptação, o que facilita sua criação em várias regiões do mundo (Van, 1994; Phillips, 2018). Todavia, quando destacamos a produção leiteira, o órgão em destaque, responsável por gerar a produção econômica do leite, é a glândula mamária (GM).

A GM bovina tem seu desenvolvimento inicial durante a fase fetal e se estende, posteriormente, para as fases de pré e pós-puberdade, gestação, lactação e período seco. A formação das estruturas básicas e ramificações de ductos ocorre durante as fases fetal, pré e pós-puberdade, respectivamente, mas a GM ainda sofre várias transformações nas demais etapas de desenvolvimento, o qual é controlado por hormônios endócrinos e fatores de crescimento que desempenham mudanças na morfologia e dinâmica do órgão em cada fase (Lima, 2015).

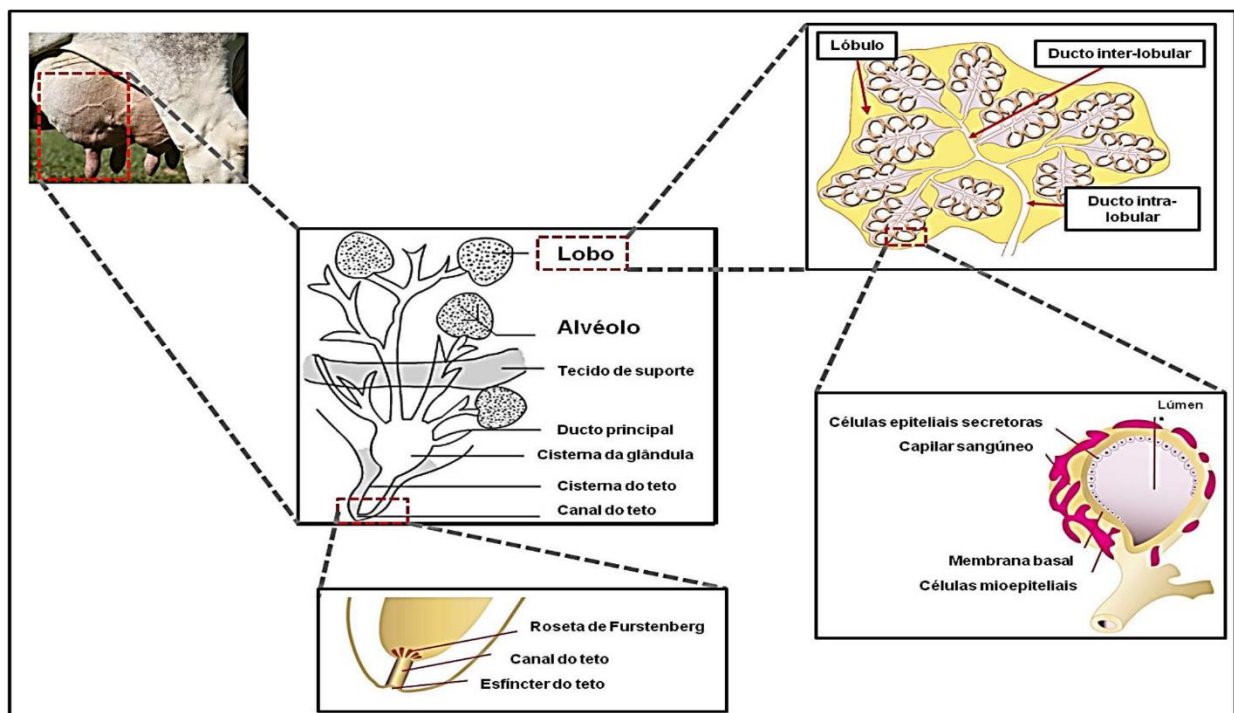
A GM é uma glândula exócrina modificada e especializada para produção de leite. Esse órgão origina-se no início do segundo mês de gestação do embrião, a partir do espessamento linear bilateral do ectoderma ventrolateral, estando localizado na região inguinal do corpo do animal. Histologicamente, por ser um tecido epitelial glandular, suas células secretoras são conhecidas como parênquima, e o tecido conjuntivo responsável por sustentar essas células é denominado estroma. O parênquima da GM é composto, principalmente, por alvéolos, os quais são bolsas formadas por uma camada de células epiteliais secretoras e, quando agrupados (lóbulos) e reunidos por unidades maiores (lobos), são rodeados por tecido conjuntivo (estroma), responsável pela nutrição e sustentação. Os alvéolos apresentam cobertura de células mioepiteliais, que possuem capacidade de se contrair e exercer força mecânica, promovendo ejeção do leite. O material secretado por essas estruturas é drenado para ductos que se ramificam e transportam o leite até as cisternas mamárias (Moraes, 2016; Steinberg, 2016, Jaswal *et al.*, 2022).

A GM é um órgão dinâmico, em constante transformação. Ela se desenvolve principalmente após o nascimento e passa por mudanças regulares ao longo de toda a vida produtiva do animal. Seu período de mais rápido crescimento, em bovinos, precede a puberdade; porém, seu maior desenvolvimento ocorre durante o período de gestação até a concepção, fase em que a glândula se torna funcional, pronta para produzir leite. O tecido secretor e de sustentação da glândula é regulado por hormônios de origem hipofisária, ovariana e por fatores produzidos pelo tecido adiposo e parenquimal. Durante o período de lactação, há

maior quantidade de tecido secretor (parênquima) e menor de estroma; o inverso ocorre fora desse período (Moraes, 2016; Steinberg, 2016; Machado, 2021).

A vaca possui quatro glândulas mamárias individuais, intimamente associadas e justapostas, cujo conjunto resulta no úbere. Essa estrutura está localizada na região inguinal, apresentando quatro quartos mamários, que possuem unidades glandulares independentes e são drenados cada um por uma teta, como é possível analisar na Figura 3. São estruturalmente separadas e não ocorre fluxo de leite entre elas. Internamente, as glândulas apresentam os alvéolos, ductos e cisterna de lobos e de quartos, onde a passagem do leite ocorre, respectivamente, por cada um até chegar no teto e ir para o meio externo (Moraes, 2016; Araujo, 2012; Steinberg, 2016; Machado, 2021).

**Figura 3** – Esquema estrutural da glândula mamária bovina



Fonte: Steinberg, 2016.

**Legenda:** O úbere é formado por quatro quartos que possuem glândulas mamárias individuais em cada um. A glândula mamária é formada por lobos, que são unidades maiores que se dividem em unidades menores, chamadas lóbulos. Esses são formados por alvéolos e ductos, responsáveis pela produção e transporte do leite para a cisterna da glândula e cisterna do teto. Os alvéolos apresentam cobertura de células mioepiteliais, que possuem capacidade de se contrair e exercer força mecânica, promovendo ejeção do leite.

### 3.4. Microbiota do leite

O leite é um fluido produzido pelas glândulas mamárias dos mamíferos e possui uma composição fundamental para a nutrição, hidratação e imunidade dos filhotes.

Nutricionalmente, é constituído por uma combinação equilibrada de gorduras, proteínas, vitaminas e carboidratos, que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento saudável dos recém-nascidos. Além disso, o leite contém elevado percentual de água, sendo a principal e, muitas vezes, única fonte de hidratação dos filhotes, dispensando a necessidade de ingestão de água adicional. No aspecto imunológico, é composto por imunoglobulinas e rico em microrganismos benéficos que colonizam o sistema digestivo, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento da resistência imunológica do filhote, protegendo-o contra infecções e fortalecendo seu sistema de defesa (Bobinski *et al.*, 2020; Toscano *et al.*, 2017; Lyons *et al.*, 2020; Chastant *et al.*, 2019).

A origem da microbiota do leite ainda é incerta, mas há algumas hipóteses que explicam o desenvolvimento desses microrganismos nesse ambiente. De maneira geral, os microrganismos presentes no leite são adquiridos por contaminação externa (exógena), tecidos internos (endógeno) e fluidos corporais, como representado na Figura 4. No que se refere às vias exógenas, estudos em humanos mostram que microrganismos da pele materna e da cavidade oral do bebê podem compor a microbiota do leite, devido ao fluxo de leite que retorna aos ductos mamários durante a amamentação (conhecida como via retrógrada). Esse mecanismo pode justificar a presença de bactérias cutâneas e orais na microbiota do leite, como *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* Nos bovinos, a transmissão de microrganismos por meio do contato direto entre o filhote e a mãe é limitada, uma vez que, muitas vezes, os bezerros são separados de suas mães logo após o nascimento, o que impede a interação direta e, conseqüentemente, a troca microbiana via retrógrada. No entanto, a origem exógena da microbiota presente no leite bovino pode ser originada de diversos ambientes, como os equipamentos de ordenha, que, se não forem corretamente higienizados, podem acumular resíduos e favorecer o crescimento de microrganismos. Além disso, o ambiente de descanso ou ordenha dos animais, onde há presença de poeira, solo, biofilme e outros materiais orgânicos, pode também atuar como fonte de contaminação, transferindo microrganismos para o úbere ou diretamente para o leite. Outro fator é a qualidade da água utilizada na lavagem dos equipamentos e utensílios de ordenha, que pode ser um vetor de contaminação caso não receba o tratamento adequado (Guo *et al.*, 2024; Latorre *et al.*, 2019; Sakwinska *et al.*, 2019; Metzger *et al.*, 2018; Royo *et al.*, 2021).

**Figura 4** – Mecanismos de formação da microbiota do leite



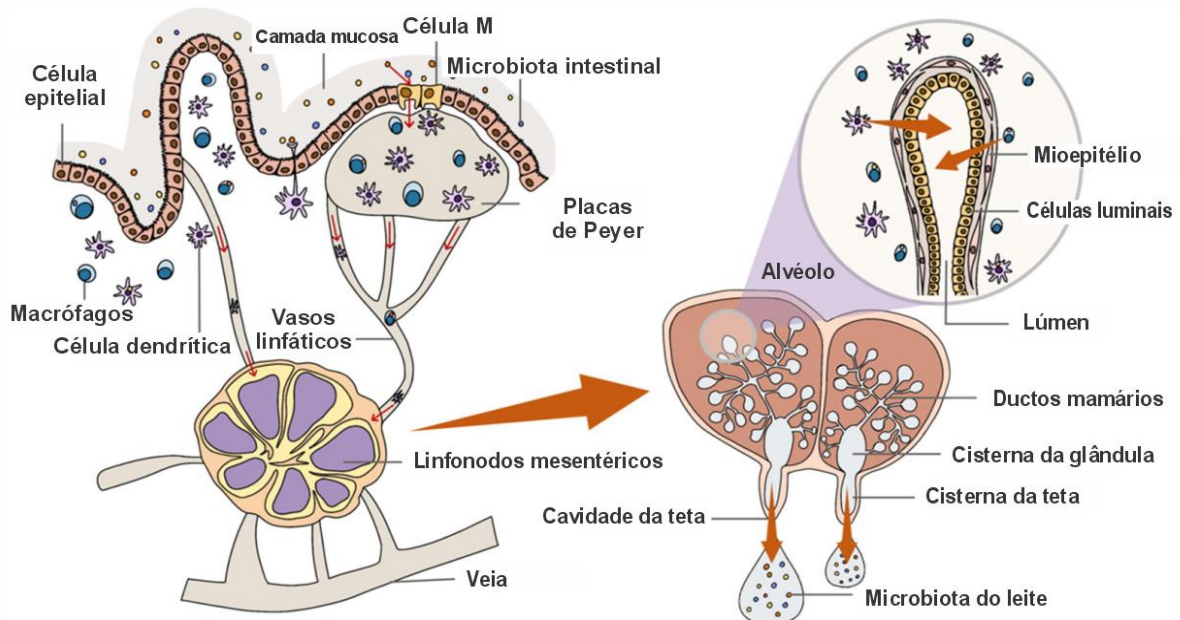
**Fonte:** Guo *et al.*, 2024 (tradução autor).

**Legenda:** Os microrganismos presentes no leite bovino podem ter origens externas e internas. Entre as fontes externas, destacam-se a água potável, os utensílios de ordenha, a cama, a pele do animal, as fezes e o ambiente do celeiro, que podem contribuir para a microbiota do leite. Já as vias de transferência endógena incluem a circulação de microrganismos pelas rotas enteromamária e rúmen-mamária, além da presença de microrganismos naturalmente residentes na glândula mamária.

Um dos mecanismos endógenos responsáveis pela colonização do leite ocorre pela via enteromamária, na qual células dendríticas e células mononucleadas capturam microrganismos do lúmen intestinal e os transferem para as glândulas mamárias durante a lactação, translocando essas bactérias para o leite, como apresentado na Figura 5. Outra hipótese sugerida é a via rúmen-mamária, embora ainda não haja estudos aprofundados sobre os mecanismos envolvidos, já existem pesquisas que relatam a presença de DNA da microbiota ruminal no leite bovino. A glândula mamária também desempenha papel significativo na colonização microbiana do leite. Acredita-se que a translocação de microrganismos pela via enteromamária ocorre apenas no período final da gravidez e lactação; entretanto, alguns estudos descobriram microrganismos vivos nos tecidos mamários de mulheres que nunca amamentaram, sugerindo que a glândula mamária é uma fonte potencial de microrganismos do leite. Dessa forma, esses microrganismos, adquiridos de forma endógena, são caracterizados

como a microbiota residente original da glândula mamária e fonte primária de colonização do leite no início da lactogênese (Guo *et al.*, 2024; Sakwinska *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2024; Metzger *et al.*, 2018; Royo *et al.*, 2021).

**Figura 5 – Via enteromamária**



**Fonte:** Guo *et al.*, 2024 (tradução autor)

**Legenda:** Mecanismo de transferência microbiana via enteromamária. Supõe-se que os microrganismos comensais do intestino sejam identificados e transportados pelo epitélio intestinal por meio de monócitos, células dendríticas e macrófagos. Essas células capturam microrganismos do lúmen intestinal e são temporariamente armazenados nos linfonodos mesentéricos ou transferidos diretamente para as glândulas mamárias através do sistema linfático e sanguíneo. Em seguida, por meio de interações com o epitélio mamário, essas células levam os microrganismos para a glândula mamária e, posteriormente, para o leite.

No leite humano, podem ser encontradas entre  $10^1$  e  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de bactérias vivas. *Staphylococcus* comensais e *Streptococcus* são os táxons predominantes no leite humano, enquanto as bactérias do ácido láctico (BAL) estão presentes em menor quantidade. No caso dos bovinos, gêneros como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Micrococcus* são frequentemente isolados no leite fresco. Já os filos bacterianos predominantes, identificados por sequenciamento do gene rRNA 16S, incluem Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (Steinberg, 2016; Derakhshani *et al.*, 2020; Sakwinska *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2024).

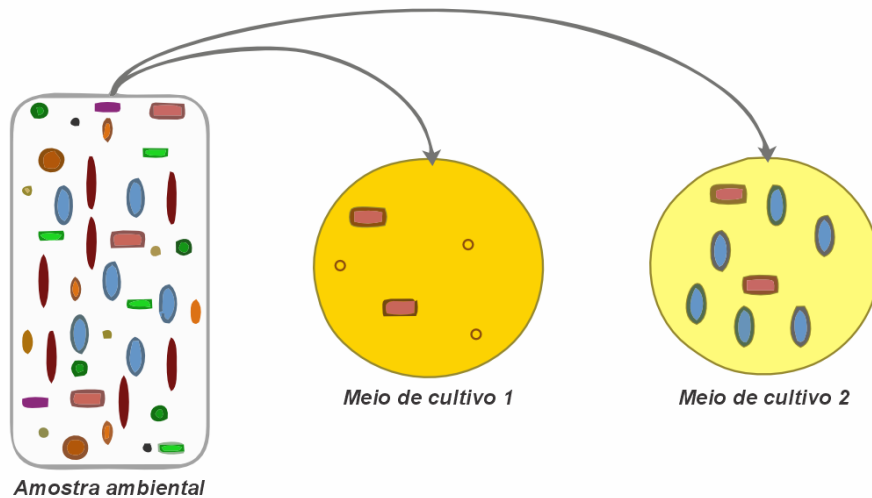
O crescimento de certas espécies bacterianas patogênicas no leite pode desencadear doenças inflamatórias da glândula mamária, como a mastite. Os principais agentes responsáveis pela disbiose desse ambiente e pelo desenvolvimento dessa condição são as espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli*. Esses microrganismos, quando presentes em abundância, podem provocar inflamação e infecção, prejudicando a saúde da glândula mamária e a qualidade do leite. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de explorar tratamentos bioterapêuticos para mastite, utilizando bactérias probióticas com potencial para interagir com os patógenos responsáveis pela doença. Essas bactérias probióticas podem ajudar a modular a suscetibilidade à infecção intramamária, promovendo um equilíbrio na microbiota da glândula mamária e combatendo microrganismos causadores de mastite, oferecendo uma abordagem promissora e natural para o tratamento e prevenção dessa condição inflamatória (Bouchard *et al.*, 2015; Rainard, 2017; Metzger *et al.*, 2018; Poder *et al.*, 2024).

### **3.5. Microbioma**

Khanna *et al.* (2014) estabelecem que microbioma se refere ao número total de microrganismos e seu material genético, enquanto microbiota é a população microbiana presente em diferentes ambientes. Para descobrir a população microbiana de determinado ambiente, atualmente, existem dois métodos: os dependentes de cultivo e os independentes de cultivo.

Os métodos dependentes de cultivo são conhecidos como métodos tradicionais, baseados em diferenças morfológicas, metabólicas e fisiológicas dos microrganismos. Nessa metodologia, há algumas limitações, pois muitas bactérias precisam de condições específicas de cultivo para se multiplicarem, como o meio de cultura utilizado, a temperatura e a atmosfera de incubação. Caso ocorra alteração em alguma variável, existe a probabilidade de falta de crescimento, podendo-se excluir várias representantes de uma análise, resultando em uma sub-representação da diversidade microbiana presente na amostra original. Essa limitação está ilustrada na Figura 6. Além disso, são técnicas que demandam muito trabalho e tempo, não contemplam aqueles microrganismos que não podem ser cultivados em laboratório e sua identificação não é baseada em evidências moleculares, podendo levar, algumas vezes, à identificação incorreta (Tarazi, 2010).

**Figura 6** – Método dependente de cultivo



**Fonte:** Adreote, 2020.

**Legenda:** A imagem representa como funciona o método dependente de cultivo, onde, em uma amostra ambiental rica em microrganismos, apenas alguns deles crescerão no meio de cultura, não obtendo a identificação real de todos os microrganismos presentes naquele ambiente.

Os métodos independentes de cultivo resolvem a problemática associada ao cultivo impreciso dos microrganismos. São baseados em técnicas que permitem o estudo das comunidades microbianas sem a necessidade de isolar e cultivar os microrganismos em laboratório. São úteis para investigação da diversidade de amostras ambientais, superando as limitações presentes nos métodos dependentes de cultivo. Essas metodologias são baseadas em sequenciamento de regiões variáveis do genoma (Forzani, 2017; Steinberg, 2021; Tarazi, 2010; Padilha, 2013).

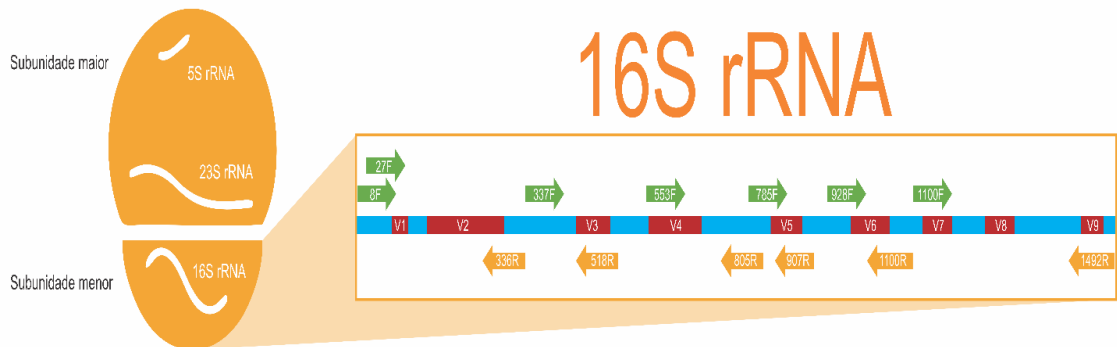
Para a análise de composição, diversidade e interação ecológica de microrganismos em determinado ambiente, é utilizada a técnica microbioma. Essa metodologia é independente de cultivo e isolamento microbiano, desempenhando melhores índices de precisão de resultados taxonômicos e filogenéticos. A técnica utiliza sequenciamento de *amplicons*, com finalidade de identificação taxonômica. Seu protocolo padrão se resume, basicamente, em extração do DNA de uma amostra ambiental, amplificação por PCR e sequenciamento dos *amplicons* gerados, com posterior análise dessas sequências por ferramentas de bioinformática. Quando usado para análise bacteriana, o microbioma se baseia nas regiões conservadas e

variáveis do gene rRNA 16S (aqui designado apenas 16S) (Couper *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2023).

O sequenciamento de *amplicons* é uma abordagem que permite a análise de variações genéticas em regiões específicas do genoma. O material genético é extraído da amostra ambiental, amplificado por PCR, e o produto de PCR (*amplicons*) passa por um sequenciamento ultraprofundo. Esse método utiliza *primers* (oligonucleotídeos) específicos, projetados e direcionados para captar regiões de interesse. É amplamente aplicado no sequenciamento de porções do gene bacteriano 16S, sendo extremamente útil na descoberta de mutações raras, como tumores de DNA gamético. As principais vantagens desse método, em relação a outros métodos independentes de cultivo, são: redução de custos e tempo de resposta em comparação a sequenciamento do genoma completo. Além disso, permite uma abordagem altamente direcionada para rastreamento de variantes e suporta multiplexação, possibilitando avaliação de múltiplas amostras simultaneamente (Illumina, 2024). Entretanto, a técnica apresenta certas limitações, como o fato de os táxons serem atribuídos com base na análise de uma única região do genoma bacteriano. Também, o uso de alguns *primers* específicos pode introduzir vieses, resultando na sub-representação de determinados táxons em detrimento de super-representação de outros (Rintala, 2017).

A sequência do gene codificador do RNA ribossomal 16S é amplamente utilizada na análise de comunidades bacterianas, sendo um marcador essencial para estudos taxonômicos. Esse gene é constituinte da subunidade menor do ribossomo dos procarionotes e está presente em todos os representantes dos domínios *Bacteria* e *Archaea*. Com cerca de 1500 pares de bases (pb) de comprimento, o gene 16S possui regiões altamente conservadas, essenciais para a estrutura do ribossomo, e nove regiões variáveis (V1 a V9) que estão intercaladas entre os trechos conservados, como apresentado na Figura 7. As regiões variáveis, devido à sua alta diversidade de sequências entre diferentes espécies bacterianas, desempenham um papel crucial na identificação filogenética, permitindo discriminações taxonômicas até os níveis de família, gênero e, em alguns casos, espécie. Assim, o gene rRNA 16S, presente em todas as bactérias, permite a análise das relações filogenéticas entre diferentes grupos bacterianos (Cj Bioscience, 2017; Clarridge, 2004; Chakravorty *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2023; Chappidi *et al.*, 2019).

**Figura 7** – Regiões conservadas e variáveis do gene rRNA 16S



**Fonte:** Bioscience, 2017; Adaptado.

**Legenda:** O rRNA 16S faz parte da subunidade menor do ribossomo dos procariotos e é formado por regiões conservadas, na coloração azul da imagem, e regiões variáveis, representadas pela coloração vermelha, que estão dispostas em nove regiões V1 a V9. Os *primers* responsáveis pela amplificação das regiões do gene estão representados pelas setas nas colorações verde (*forward*) e laranja (*reverse*).

### 3.6. Tanque de Expansão Refrigerado

A tecnologia tem sido um pilar fundamental para modernizar e impulsionar diversos setores, e a agropecuária é um grande exemplo disso. No Brasil, o setor cresceu, em média, 3,22% ao ano nos últimos 47 anos, sendo que 60% desse crescimento se devem à implementação de tecnologias inovadoras (Brasil, 2020). Tanto na agricultura quanto na pecuária, o uso de ferramentas tecnológicas transformou a eficiência e a produtividade do setor.

Na pecuária, os avanços tecnológicos têm feito uma grande diferença. O monitoramento dos animais com *chips* e sensores, o uso de inteligência artificial para gerenciar rebanhos e analisar dados, além do uso de drones para acompanhar as pastagens, garantem uma gestão mais eficiente e precisa. Sistemas de rastreabilidade asseguram a qualidade dos produtos, enquanto técnicas como reprodução assistida e melhoramento genético aumentam o potencial produtivo dos animais. Ao mesmo tempo, práticas sustentáveis, integradas à agricultura de precisão, ajudam a reduzir custos e a diminuir o impacto ambiental. O uso dessas e outras inovações pode aumentar a produtividade em até quatro vezes, quando comparado a técnicas de manejo tradicionais, promovendo lucratividade para o produtor e impulsionando o desenvolvimento do setor. Esses progressos têm transformado o Brasil em um dos líderes mundiais no setor agropecuário, promovendo uma pecuária mais produtiva e sustentável (Viana, 2023; Brasil, 2020; Kaur *et al.*, 2023; Dzermeikaite *et al.*, 2023; Aquilani *et al.*, 2022).

A indústria leiteira também tem se beneficiado enormemente dos avanços tecnológicos, transformando-se em um setor cada vez mais eficiente e sustentável. Um dos principais exemplos de inovação é o uso de sistemas automatizados de ordenha, que permitem uma coleta mais rápida, higiênica e menos estressante para os animais, resultando em maior produtividade e melhor qualidade do leite. Também é necessário destacar o uso do tanque de expansão refrigerado, um equipamento que desempenha um papel crucial para garantir a qualidade do leite produzido. É responsável pelo resfriamento e armazenamento do leite logo após a ordenha, um processo fundamental para manter a integridade do produto e prevenir a proliferação de bactérias. A rápida queda de temperatura no tanque de expansão inibe o crescimento de microrganismos, preservando as propriedades nutricionais e a segurança alimentar do leite (Hogenboom *et al.*, 2018; Christiansson, 2017; Sol *et al.*, 2022).

Com o impacto da globalização no Brasil, na década de 1990, a pecuária leiteira teve um acesso facilitado à tecnologia, o que resultou em avanços significativos na história do setor. Entre esses avanços, destacam-se a importação de equipamentos modernos e a chegada de multinacionais ao país, que facilitaram a aquisição de tanques de expansão para os produtores da época (Resende *et al.*, 2017). Em 18 de setembro de 2002, foi instituída pelo MAPA a Instrução normativa n.º 51 (IN – 51), legislação que marcou a utilização de tanques refrigerados na coleta de leite cru no Brasil. Esta foi uma tecnologia agregada à pecuária leiteira que alterou os padrões de qualidade, produtividade, desenvolvimento, dentre outras transformações advindas dessa legislação que padronizou o uso desse equipamento nas propriedades (Brasil, 2002; Melo *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2020).

Atualmente, a legislação vigente no país é a Instrução Normativa n.º 77 (IN - 77), de 2018, criada pelo MAPA, que descreve o tanque de expansão refrigerado como o local onde o leite cru é direcionado após a ordenha e armazenado no período máximo de três horas, em temperatura igual ou inferior a 4°C. Essa legislação tem como função uniformizar o uso desse equipamento nas diversas fazendas leiteiras, com a finalidade de assegurar a qualidade do leite entregue à indústria. Além disso, a normativa informa as restrições de instalação do tanque e armazenamento. Quanto às instalações, o Art. 15 destaca que o tanque deve ser instalado em um local provido de paredes, pavimentação, iluminação, ventilação, ponto de água corrente e condição de acesso apropriado ao veículo coletor, e o local e o equipamento devem ser mantidos sob condições de limpeza e higiene (Brasil, 2018).

Existem alguns estabelecimentos que não possuem condições de adquirir um tanque de expansão direta individual em sua produção; assim, necessitam da utilização de tanque de expansão comunitário. Segundo a IN-77, esse tipo de equipamento comunitário é descrito como “tanque de expansão direta, utilizado de forma coletiva exclusivamente por produtores de leite” (BRASIL, 2018) e possui um titular, que é o produtor de leite proprietário da propriedade em que o tanque de uso comunitário se encontra instalado. Sendo assim, ele é o responsável pelo cumprimento das normas legais da utilização do tanque, o qual deve estar devidamente cadastrado no sistema do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2018).

Os tanques de expansão comunitária, além de atenderem aos regulamentos mencionados anteriormente para o uso de tanques privados, também devem cumprir outras regulamentações, como: após a ordenha, o leite precisa ser imediatamente transportado ao local de uso do tanque comunitário, os latões devem ser identificados e é proibido o recebimento de leite previamente refrigerado; ao ser adicionado, o leite deverá ser coado e refrigerado à temperatura máxima de 4°C; todos os equipamentos utilizados deverão ser devidamente higienizados. Antes de adicionar o leite ao tanque comunitário, ele precisa passar pelo teste do Álcool/Alizarol, sendo que o produto que for reprovado deve ser descartado; por fim, precisa existir um registro, em planilha, da identificação do produtor, volume, data e hora da chegada do leite, resultado do teste Álcool/Alizarol e descrição dos procedimentos de limpeza e sanitização dos tanques e latões (BRASIL, 2018).

Como apresentado, o regulamento específico designa refrigeração igual ou inferior a 4°C e um período curto de armazenamento do leite. Essa temperatura e o tempo estipulados são imprescindíveis para a conservação do leite, pois permitem menor velocidade de multiplicação microbiana, além de um armazenamento seguro de grandes quantidades de leite até seu processamento ou transporte, minimizando perdas (Sibioni, 2024). A temperatura é um dos principais fatores que influenciam o crescimento microbiano, podendo tanto estimulá-lo quanto inibi-lo, além de, em certas faixas, ser capaz de eliminar microrganismos. Na indústria de alimentos, diversos processos de conservação utilizam o controle de temperatura para reduzir ou eliminar as taxas de crescimento bacteriano, garantindo maior segurança e durabilidade dos produtos. Existem quatro condições físicas principais que influenciam no crescimento microbiano: temperatura, pH, atmosfera gasosa e pressão osmótica. Dessa forma, as espécies de microrganismos encontrados em determinado ambiente e a velocidade de

crescimento podem estar diretamente relacionadas a esses fatores físicos ou químicos, o que denota a necessidade de padronização das técnicas de produção alimentícia. Além da temperatura, a higiene dos equipamentos é um fator imprescindível para reduzir ou eliminar o crescimento microbiano na produção leiteira (Nascimento, 2004).

A contaminação do leite pode ocorrer de duas formas: via endógena (animais doentes) e exógena (após a saída do úbere). As principais bactérias associadas a um úbere doente são *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus*; assim, um animal que se encontra com mastite subclínica e não está em tratamento pode contaminar o equipamento de ordenha e o leite despejado no tanque de expansão. Por isso, há necessidade de controle da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) regularmente nas fazendas. Já quando o manejo é feito fora dos padrões legais, a contaminação pode advir de diferentes fatores. Menezes *et al.* (2024) destacam que o leite cru, ainda que mantido sob refrigeração padrão, quando armazenado por longos períodos, pode apresentar uma variedade de gêneros bacterianos: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria* e alguns representantes do grupo dos coliformes. Alguns desses agentes contaminantes são responsáveis por secretar enzimas que degradam proteínas, causando alterações físico-químicas no leite cru. As principais fontes de contaminação do leite dentro da fazenda são: os utensílios de ordenha, a superfície exterior do úbere e tetos, o operador e tanque de expansão. Esses vetores de contaminação estão diretamente associados à não utilização de boas práticas de ordenha e à falta de higienização (Freitas *et al.*, 2019, Menezes *et al.*, 2014; Guerreiro, 2005; Deddofo *et al.*, 2023; Borreani *et al.*, 2019).

Em função da crescente demanda por segurança alimentar, qualidade e produtividade do leite e seus derivados, a utilização da pesquisa científica é fundamental para o avanço desse setor. Nesse sentido, o estudo da diversidade microbiana do leite em todas as fases de produção é essencial para garantir o controle e o desenvolvimento da pecuária leiteira. Um importante ponto ainda pouco explorado, que pode gerar respostas significativas para o setor, está relacionado às diferenças na diversidade microbiana presente nos tanques de expansão das fazendas, em comparação com a microbiota individual do leite de cada animal. Essa análise pode fornecer *insights* valiosos para o produtor no que diz respeito ao controle de índices de higiene, manejo, alimentação e saúde do rebanho, contribuindo para a melhoria da produção de maneira integral. A questão central deste estudo é investigar se há diferenças

significativas entre a microbiota do leite proveniente de animais individuais e a do leite armazenado no tanque de expansão refrigerado das fazendas. A hipótese inicial propõe que, sim, existem diferenças estatisticamente relevantes na composição e diversidade da microbiota do leite bovino de animais individuais em comparação com o leite presente no tanque de expansão refrigerado, e essas diferenças são influenciadas pela microbiota ambiental.

## **4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1. Fazendas, seleção de animais e coleta biológica**

Para análise do microbioma do leite, foram coletadas amostras de leite cru de 94 animais em lactação e 6 amostras do tanque de expansão refrigerado, de 6 fazendas distintas, nos meses de dezembro e março, nas cidades de Bambuí, Tapiraí, São Roque de Minas e Medeiros. As fazendas foram escolhidas a partir de cinco critérios: estar localizada na região da Serra da Canastra, ser produtora de Queijo Minas Artesanal Canastra, possuir tanque de expansão refrigerado, estar associada à Associação dos Produtores de Queijo Canastra (APROCAN), pois as fazendas vinculadas a ela seguem padrões semelhantes de produção, garantindo maior uniformidade nos processos, e possuir fiscalização regular de órgãos credenciados. A seleção dos animais ocorreu de forma aleatória, retirando da coleta aqueles que apresentaram características sugestivas de mastite clínica e animais tratados com medicamentos antimicrobianos no período de pelo menos 30 dias antes das coletas.

A coleta de leite foi efetuada individualmente; os tetos foram higienizados com solução de álcool 70% e secos com papel-toalha esterilizado. A ordenha ocorreu de forma manual, com descarte do primeiro jato, sendo que cada animal teve cerca de 150 mL de leite coletados: dois tubos de 50 mL possuíam bromopol e azidiol, para contagem de células somáticas (CCS) e para contagem bacteriana total (CBT), respectivamente; e um tubo de polipropileno estéril, sem nenhum tipo de reagente, para demais análises. Além disso, cada fazenda teve 50 mL de leite coletados diretamente do tanque de expansão refrigerado. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas a 4°C e transportadas para o Laboratório de Pesquisa Multiusuário do IFMG – *Campus* Bambuí, onde ficaram armazenadas a – 80°C até as análises do microbioma serem iniciadas. As amostras contendo bromopol e azidiol foram encaminhadas ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola Veterinária da UFMG, para análises de CCS e CBT.

Nenhum animal sofreu qualquer agressão ou sacrifício para se alcançar os objetivos deste trabalho. Para coleta das amostras de leite, a permissão dos proprietários foi obtida, e os procedimentos realizados fazem parte da rotina e vigilância sanitária das fazendas, não havendo necessidade de aprovação em comitê de ética, de acordo com a determinação em nível internacional (2010/63/EU).

#### **4.2. Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) do leite**

As análises de CCS e CBT ocorreram no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, no equipamento Bentley Combi System 2300® (*Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, EUA). Os resultados de CCS foram usados como critério para determinar os animais saudáveis e os acometidos com mastite subclínica, tendo como parâmetro  $CCS > 200.000$  células/mL a definição de animais doentes, e  $CCS < 200.000$  células/mL, animais saudáveis.

#### **4.3. Extração de DNA bacteriano total**

Para a preparação do leite cru no processo de recuperação do DNA metagênomico, foi utilizada a metodologia adaptada de Angelopoulou *et al.*, 2019, com posterior emprego do kit *DNeasy PowerFood Microbial*, seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras de leite foram descongeladas e mantidas a 37°C, sob agitação por 15 minutos em Shaker (Solab, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram distribuídos 30 mL de leite de cada amostra em dois tubos falcon de 15 mL, centrifugados duas vezes a 3.000 x g, por 40 minutos, a 4°C. O sobrenadante, produto da centrifugação, foi descartado, e a camada de gordura formada na parte superior do tudo foi removida com *swab* estéril. Os pellets foram lavados duas vezes com PBS esterilizado, com centrifugação entre cada lavagem de 300 x g por 40 minutos, e passados levemente em vórtex. Em seguida, os pellets foram ressuspensos em 100 µL de PBS, acrescidos de 120 µL de lisozima 40 mg/mL e 5 µL de lisostafina 1 mg/mL e incubados a 55°C, por 15 minutos, em banho-maria. Foram adicionados 30 µL de proteinase K 10 mg/mL, seguido de incubação por 15 minutos a 55°C e, posteriormente, centrifugação a 13.000 x g, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado.

O protocolo do kit foi iniciado com ressuspensão dos pellets com 450 µL de solução MBL, fornecida pelo fabricante, e o conteúdo ressuspensionado foi transferido para o tubo *PowerBead* e agitado no equipamento *Bead Ruptor* (*OMNI International*, *Kennesaw*, EUA), em velocidade 4 durante 120 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 1 minuto, e o produto da centrifugação foi passado para um tubo de coleta limpo de 2 mL, previamente identificado, adicionando-se 100 µL da solução IRS, fornecida pelo fabricante, com leve misturada em vórtex, seguida de incubação de 2 a 8°C durante 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 1 minuto, e o sobrenadante foi

transferido para um tubo de coleta limpo de 2 mL, adicionando-se 900 µL de solução MR, fornecida pelo fabricante. Na sequência, foi feito vórtex breve, para misturar. Um tubo vazio de coleta, acoplado com coluna de sílica MB Spin, foi carregado com 650 µL de sobrenadante, posteriormente centrifugado a 13000 x g por 1 minuto, e o fluxo resultante no fundo do tubo foi descartado, sendo este procedimento repetido até que todo o sobrenadante tivesse sido carregado e transpassado pela coluna completamente. Em seguida, a coluna MB Spin foi passada para um tubo de coleta novo, adicionando-se 650 µL da solução PW sobre membrana da coluna, seguida da centrifugação do sistema a 13000 x g por 1 minuto, descartando-se o fluxo resultante. Foram adicionados 650 µL de etanol fornecido, centrifugado a 13000 x g por 1 minuto, e o fluxo resultante foi descartado e novamente centrifugado a 13000 x g por 2 minutos, para retirada de resíduo de etanol da coluna. A MB Spin foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 mL, previamente identificado, adicionando-se 100 µL de uma solução de eluição EB (fornecida no kit) ao centro da membrana presente na coluna e centrifugado a 13000 x g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o produto final foi o DNA metagênomico da amostra.

Após extração, o DNA foi quantificado e analisado em aparelho NanoDrop (*ThermoFischer, Massachusetts, EUA*), com a utilização de 1 µL de cada amostra de DNA extraído do leite. Foram medidas a concentração do DNA em ng/µL e a pureza, a partir da relação 260/280 e 260/230, para indicar a contaminação por proteínas e solventes orgânicos, respectivamente.

#### **4.4. Amplificação por PCR e sequenciamento de alto rendimento**

A diversidade bacteriana de cada amostra de leite cru foi acessada por sequenciamento de alto rendimento da região V3-V4 amplificada do gene 16S rRNA usando-se *primers* 314F (5'CCTAYGGGRBGCASCAG3') e 806R (5'GGACTACNNGGGTATCTAAT3'), seguindo-se as diretrizes estabelecidas pelo *Earth Microbiome Project* (Gilbert *et al.*, 2014). As amplificações por PCR foram realizadas em quadruplicatas com o uso de *primers* personalizados contendo adaptadores Illumina. Todas as reações de PCR foram efetuadas com Go Taq® Master Mix Promega, utilizando-se as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida de 30 ciclos com 94°C por 45 s, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 s, terminada por uma etapa de alongação final de 10 min a 72°C. Os *amplicons* foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1,4%, para posterior purificação por isolamento de bandas (300-500 pb) usando-se

bisturi. As bandas de PCR foram purificadas a partir do gel de agarose com o emprego do kit NucleoSpin™ Gel e PCR Clean-up (Macherey-Nagel™, Düren, Germany). As amostras purificadas foram quantificadas com ensaios de Picogreen dsDNA (Invitrogen, Eugene, OR, USA) em Qubit®2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, CA, USA) e foram normalizadas para posterior construção de um *pool* de todos *amplicons*. O *pool* foi submetido a sequenciamento pareado (2 × 250 pb) em plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) com um kit MiSeq Reagent V2 (500 ciclos) localizado nas instalações do CEFAP (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

#### 4.5. Análises de Bioinformática

As sequências amplificadas do gene 16 rRNA foram processadas usando-se o *pipeline* baseado no trabalho de Junior *et al.* (2021), QIIME 2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*, versão 2), versão 2019.10. O *plugin* “demux” foi empregado para visualizar gráficos para verificar a qualidade de leitura. O *plugin* “DADA2” (abreviação de *Divisive Amplicon Denoising Algorithm*, versão 2) foi posteriormente aplicado para remover *primers*, separar bases de baixa qualidade, desrepliar, identificar quimeras e mesclar leituras emparelhadas. As sequências representativas das variantes de *amplicon* foram substituídas taxonomicamente com o *Naïve Bayes Classifier*, treinado com o *plugin* “classificador de recursos” usando-se o banco de dados do gene 16S rRNA, com 99% de similaridade com o banco de dados Silva (v.132), como referência. Análises exploratórias e estatísticas de dados foram realizadas no nível de sequências variantes de *amplicon*, uma vez que a abordagem por essas sequências é um equivalente de alta resolução da unidade taxonômica operacional, delimitada por 100% de similaridade de sequência.

Para comparar as diferenças na diversidade e na composição das comunidades bacterianas do leite cru em amostras individuais e no tanque de expansão refrigerado, utilizou-se o QIIME2 para gerar vetores de diversidade beta. As análises foram baseadas em amostras com mais de 5000 sequências, selecionadas a partir de curvas de rarefação. Os padrões de composição (diversidade beta) foram avaliados por meio das métricas de dissimilaridade de Bray-Curtis e Unifrac (ponderada e não ponderada), representadas em gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA). Além disso, o QIIME2 foi empregado para realizar todas as análises comparativas de diversidade beta e para criar mapas destacando as famílias bacterianas mais abundantes em todas as amostras.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, comparamos a diversidade do microbioma do leite de animais individuais com o microbioma do leite dos tanques de expansão de seis fazendas produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra. Usamos o sequenciamento de alto rendimento MiSeq de um segmento do gene 16S rRNA para identificar a microbiota, com a finalidade de obter dados da composição, riqueza e diversidade bacteriana.

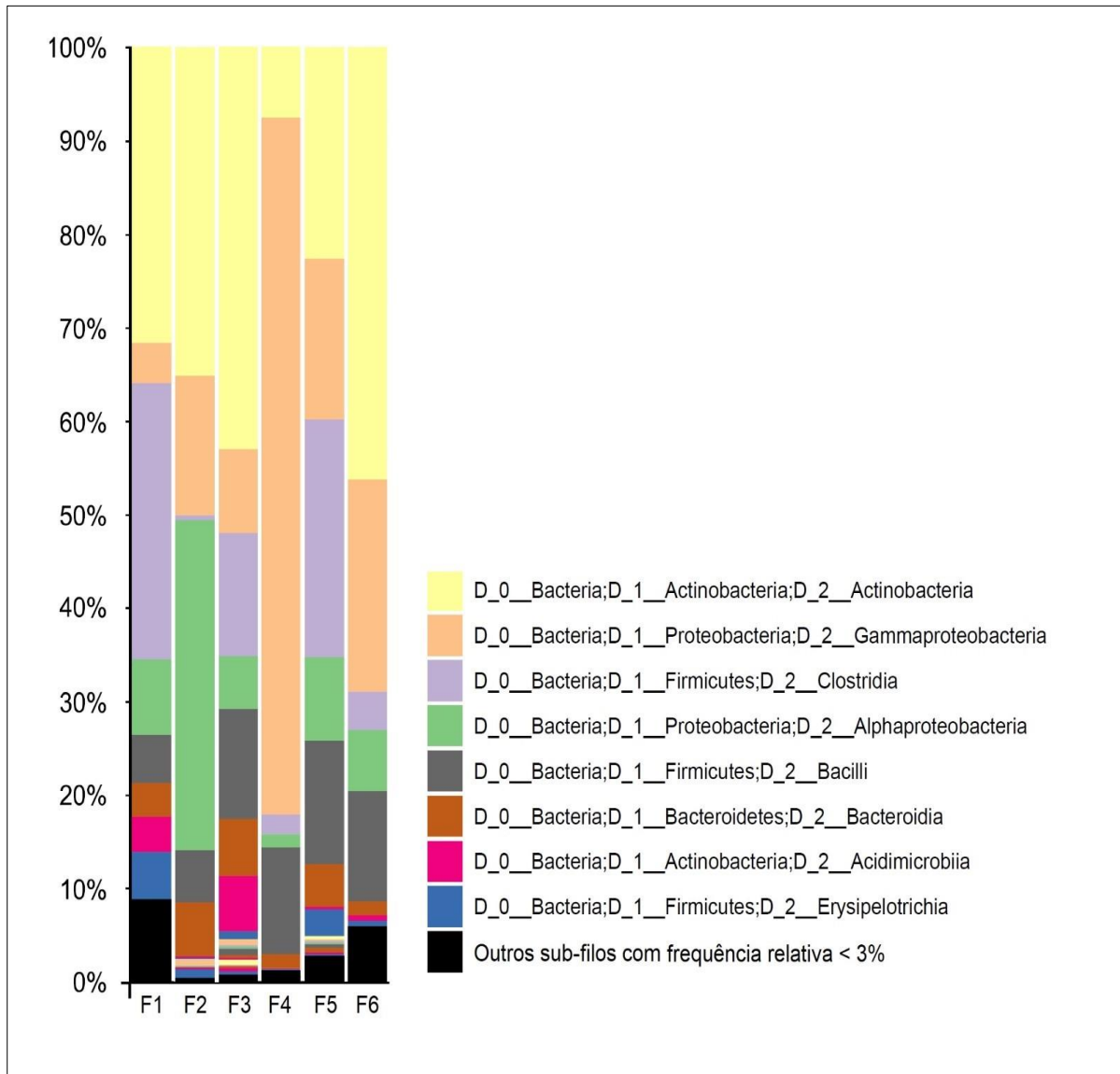
O leite é um fluido biológico com uma composição rica e complexa, que inclui não apenas macromoléculas como proteínas (caseína e proteínas do soro), carboidratos (principalmente lactose) e lipídeos, mas também micromoléculas, como vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), hidrossolúveis (Complexo B) e minerais, como o cálcio, essencial para a formação de ossos e dentes. Contudo, um aspecto significativo do leite é a presença de microrganismos, especialmente no leite cru, onde uma variedade de bactérias, leveduras e fungos pode estar presente. Essas bactérias incluem espécies benéficas, como as bactérias ácido-láticas (BALs), que desempenham um papel crucial na fermentação e na produção de produtos lácteos fermentados, como iogurtes e queijos, contribuindo para suas características sensoriais e benefícios probióticos. No entanto, o leite também pode abrigar microrganismos patogênicos que representam riscos à saúde humana, como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Por isso, existe a necessidade de análises e avaliação do leite cru, visando garantir a segurança alimentar dos produtos lácteos e melhorar o manejo dos animais. A composição microbiana do leite é influenciada por diversos fatores, incluindo a saúde do animal, as condições de ordenha e armazenamento, tornando o controle microbiológico um aspecto essencial na indústria leiteira. Assim, o leite não é apenas uma fonte de nutrientes essenciais, mas também um ecossistema microbiano complexo que desempenha um papel vital na qualidade e segurança dos produtos lácteos (Ravash *et al.*, 2020; Zironi *et al.*, 2014; Martín *et al.*, 2021; Erol *et al.*, 2024).

### 5.1. Perfil taxonômico

Para identificar os filos e classes predominantes no leite das seis fazendas produtoras de QMAC, foram analisadas 100 amostras, sendo 94 de animais individuais e 6 dos tanques de expansão. A classificação taxonômica foi realizada por meio da comparação com a base de dados Silva (v.132), e a visualização dos resultados foi gerada no QIIME2. Assim, na Figura 8, encontra-se um gráfico de barras que apresenta a distribuição percentual

dos filos e classes bacterianos identificados nas amostras analisadas. Cada barra representa uma fazenda, nomeadas de F1 a F6, destacando-se os grupos microbianos mais prevalentes. Essa análise permite compreender a composição microbiológica do leite cru, fornecendo subsídios para avaliar possíveis influências sobre a qualidade e as características do queijo produzido.

**Figura 8** – Gráfico de Filos e Classes



**Legenda:** Frequências das classes dominantes nas fazendas. No eixo das abscissas, encontramos as fazendas, representadas por F1, F2, F3, F4, F5 e F6; já no eixo das ordenadas, estão as porcentagens, numeradas de 0 a 100. À direita do gráfico, estão as cores que representam cada classe. Em ordem decrescente, as classes de maior frequência foram: Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Clostridia e Alphaproteobacteria.

Podemos observar, a partir da Figura 8, que os principais filos bacterianos presentes no leite das seis fazendas produtoras de QMAC foram: Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroides. Dentre esses, as classes encontradas com maior frequência no leite

de todas as fazendas foram, Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Clostridia e Alphaproteobacteria.

Observa-se alta frequência relativa para Actinobacteria, que é um grupo que forma um dos maiores filos bacterianos e está presente em uma ampla variedade de ecossistemas, tanto aquáticos quanto terrestres. As Actinobacterias desempenham papéis diversos em suas interações com diferentes organismos superiores, variando em estilos de vida. O filo inclui patógenos notáveis, como espécies de *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Tropheryma*, bem como habitantes do solo, por exemplo, *Micromonospora* e *Streptomyces* (Hazarika, 2020). É importante destacar que a presença de actinobactérias no leite não é necessariamente prejudicial. Na verdade, muitas dessas bactérias desempenham papéis importantes na produção de alimentos e podem ter benefícios para a saúde. Um exemplo comum de uma actinobactéria encontrada no leite de vaca são as espécies do gênero *Bifidobacterium*. As bifidobactérias são conhecidas por sua contribuição para a saúde intestinal, e algumas cepas são utilizadas em produtos lácteos fermentados, como iogurtes e leites fermentados. Essas bactérias têm a capacidade de metabolizar a lactose, o açúcar presente no leite, produzindo ácidos orgânicos que ajudam a acidificar o meio, proporcionando um ambiente desfavorável para o crescimento de bactérias indesejáveis (Komatsu, 2008).

Na literatura, grande parte dos estudos aponta o filo Actinobacteria como um dos mais abundantes no microbioma do leite cru, embora nem sempre ocupe a posição de maior abundância. Os resultados deste estudo, como podemos ver na Figura 8, mostram que o filo Actinobacteria é o mais abundante nas 6 fazendas estudadas. No entanto, outros trabalhos, como o de Steinberg *et al.* (2022), relatam o microbioma do leite bovino dominado por Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, sendo esse último o menos abundante em comparação com os dois primeiros. A presença destacada de Actinobacteria pode ter relação com o período de coleta das amostras, uma vez que esse filo inclui diversos representantes importantes do solo. As amostras deste estudo foram coletadas no mês de março, início do outono, estação marcada pela redução gradual da temperatura, maior incidência de ventos e diminuição da umidade do ar, características que podem influenciar na composição bacteriana do leite. O estudo de Li *et al.* (2018) caracterizou o microbioma do leite cru ao longo de 12 meses e suas variações. Em seus resultados, foi descrita maior abundância do filo Actinobacteria nos meses de janeiro, fevereiro, março e novembro, correlacionada com a baixa temperatura, enquanto a maior abundância de Firmicutes foi relacionada à alta temperatura; a

do filo Bacteroidetes, à baixa umidade; e a do filo Proteobactéria, à alta umidade (Steinberg *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2018).

O segundo filo mais frequente nos resultados foi o Proteobacteria, um grupo altamente diversificado de bactérias gram-negativas que abrange várias classes, como Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Epsilonproteobacteria. Essas bactérias apresentam ampla capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, podendo ser aeróbias, anaeróbias ou microaerofílicas, e sua diversidade morfológica inclui formas como cocos, bacilos e espirilos. Os representantes do filo Proteobacteria são encontradas em diversos ambientes, como solos, águas, fontes termais e alimentos, incluindo o leite, sendo que, neste, podem integrar a microbiota natural ou surgir devido à contaminação. Entre as classes identificadas, a Gammaproteobacteria foi a mais prevalente nas seis fazendas analisadas. Essa classe inclui patógenos de destaque, como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Pseudomonas* spp., que representam riscos significativos à saúde humana e animal, além de impactarem economicamente a produção de bovinos (Fukuyama *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018; Litvak *et al.*, 2017).

O estudo de Steinberg *et al.* (2022) identificou o filo Proteobacteria como predominante em animais saudáveis, caracterizados por apresentarem CCS < 200.000 células/mL. Esse resultado é particularmente interessante, dado que esse filo inclui representantes importantes, como *Escherichia coli*, um dos principais patógenos causadores de mastite. De forma complementar, Scarsella *et al.* (2021) investigaram o microbioma de fezes, sangue e leite em animais saudáveis e acometidos por mastite, observando, também, abundância de Gammaproteobacteria. Eles destacaram que os principais grupos identificados no microbioma fecal (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria) são também os mais representativos no microbioma do leite. Esses achados sugerem que a microbiota do leite pode ser influenciada por fatores ambientais, como fezes, ou pela via enteromamária (Steinberg *et al.*, 2022; Scarsella *et al.*, 2021; Sobur *et al.*, 2019).

O estudo de Cao *et al.* (2021) caracterizou a relação entre a qualidade do leite cru e a diversidade bacteriana a partir da amostragem de diferentes locais da fazenda, como o tanque de expansão refrigerado. O estudo também apresentou Gammaproteobacteria em graus de dominância, destacando que a abundância dessas bactérias aumenta com o prolongamento do tempo de refrigeração. Assim, durante o processamento desse leite cru, é necessário que haja uma redução de tempo, a fim de conter o crescimento bacteriano, pois a classe em destaque

inclui bactérias como *Pseudomonas* ssp., conhecidas por sua capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração e por causar deterioração em laticínios, produzindo enzimas proteolíticas que afetam o sabor, o aroma e a textura do alimento (Cao *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2018).

O terceiro filo mais frequente foi o Firmicutes, composto predominantemente por bactérias gram-positivas. Esse grupo inclui organismos com formatos variados, como cocos e bacilos, encontrados em uma ampla gama de ambientes, incluindo solos, águas e o microbioma de animais e humanos. Muitas espécies de Firmicutes possuem a capacidade de formar endósporos, estruturas altamente resistentes que garantem sua sobrevivência em condições extremas, o que pode ser um problema quando essas espécies são de organismos patogênicos. Esse filo desempenha um papel importante na microbiota do leite, com destaque para espécies do gênero *Lactobacillus*, amplamente reconhecidas por sua contribuição benéfica na fermentação láctea, essencial para a produção de alimentos como iogurtes e queijos. Contudo, enquanto muitas espécies têm aplicações industriais relevantes, outras, como as do gênero *Clostridium*, podem atuar como contaminantes indesejáveis, evidenciando a importância do controle microbiológico no processamento do leite e seus derivados (Rettedal *et al.*, 2019; Taye *et al.*; 2021; Zalewska *et al.*, 2018).

Dentro do filo Firmicutes, a classe Clostridia se destaca por sua alta frequência. Composta por bactérias anaeróbicas estritas, esses microrganismos são notáveis pela formação de endósporos, estruturas altamente resistentes que lhes permitem sobreviver a condições ambientais extremas, como calor, desidratação e presença de agentes antimicrobianos. Muitas espécies dessa classe são patogênicas para seres humanos, responsáveis por doenças graves como *Clostridium tetani* (tétano), *Clostridium botulinum* (botulismo) e *Clostridium perfringens* (gangrena gasosa). Além disso, devido à sua habilidade em produzir endotoxinas poderosas, essas bactérias têm grande capacidade de se multiplicar em alimentos mal processados, sendo transmissíveis por meio da ingestão de alimentos contaminados. Sua notável resistência ao calor e a outros fatores ambientais contribui para sua persistência em ambientes adversos, tornando-as uma preocupação significativa para a segurança alimentar, especialmente em produtos processados inadequadamente (Kator, 2003; Pothoulaskis, 1998; Johnson, 2009).

Segundo o estudo de Borreani *et al.* (2019), a silagem estragada é identificada como a principal fonte de contaminação por bactérias da classe Clostridia no leite ordenhado e no leite

do tanque de expansão das fazendas, devido à contaminação dos tetos das vacas por sujeira durante o processo de ordenha. Borreani *et al.* (2019) concluíram que a limpeza cuidadosa dos animais e a adoção de boas práticas de ordenha foram fundamentais para manter baixos os níveis de contaminação do leite no tanque de expansão. No entanto, o estudo destaca que essas boas práticas devem estar diretamente associadas à limpeza e ao manejo adequado da silagem, a fim de garantir que a contaminação por esporos de Clostridia seja minimizada e mantida em níveis controlados (Borreani *et al.*, 2019).

A análise de Borreani *et al.* (2019) é relevante ao indicar que a silagem estragada é uma das principais fontes de contaminação por Clostridia no leite ordenhado, especialmente em fazendas onde a ordenha não segue boas práticas de higiene. Contudo, ao associarmos essa informação com a realidade do nosso estudo, em que todas as fazendas analisadas utilizavam silagem de milho como alimento para os animais, observamos uma possível explicação para a abundância dessa classe bacteriana. A coleta realizada na transição entre a estação seca e a chuvosa pode explicar o possível aumento da contaminação por esporos de Clostridia, uma vez que, durante esse período, as condições para a fermentação inadequada da silagem se tornam mais favoráveis. Assim, a presença dessa classe bacteriana em níveis elevados pode estar diretamente ligada não apenas à qualidade da silagem, mas também às mudanças sazonais que afetam sua preservação, o que reforça a importância de estratégias de manejo que integrem a higiene dos animais, a qualidade da silagem e as condições ambientais para controlar a contaminação bacteriana no leite (Borreane *et al.*, 2019; Mosconi *et al.*, 2023).

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que a composição microbiológica do leite das seis fazendas produtoras de QMAC reflete a diversidade e a complexidade dos fatores ambientais e de manejo que influenciam o microbioma do leite cru. A predominância do filo Actinobacteria, seguida por Proteobacteria e Firmicutes, evidencia a relação entre a composição bacteriana e variáveis como a qualidade da silagem, as práticas de ordenha e as condições sazonais. Além disso, a presença significativa de classes bacterianas com potencial patogênico, como Gammaproteobacteria e Clostridia, destaca a importância de estratégias eficazes de manejo e higiene na produção leiteira, com vistas a minimizar riscos à saúde e à qualidade dos produtos. A integração de práticas adequadas de manejo animal, armazenamento e processamento do leite, bem como a continuidade de estudos sobre as dinâmicas sazonais do microbioma, são fundamentais para garantir a segurança alimentar e a qualidade dos produtos derivados, como o QMAC.

## 5.2. Bactérias do ácido láctico (BAL)

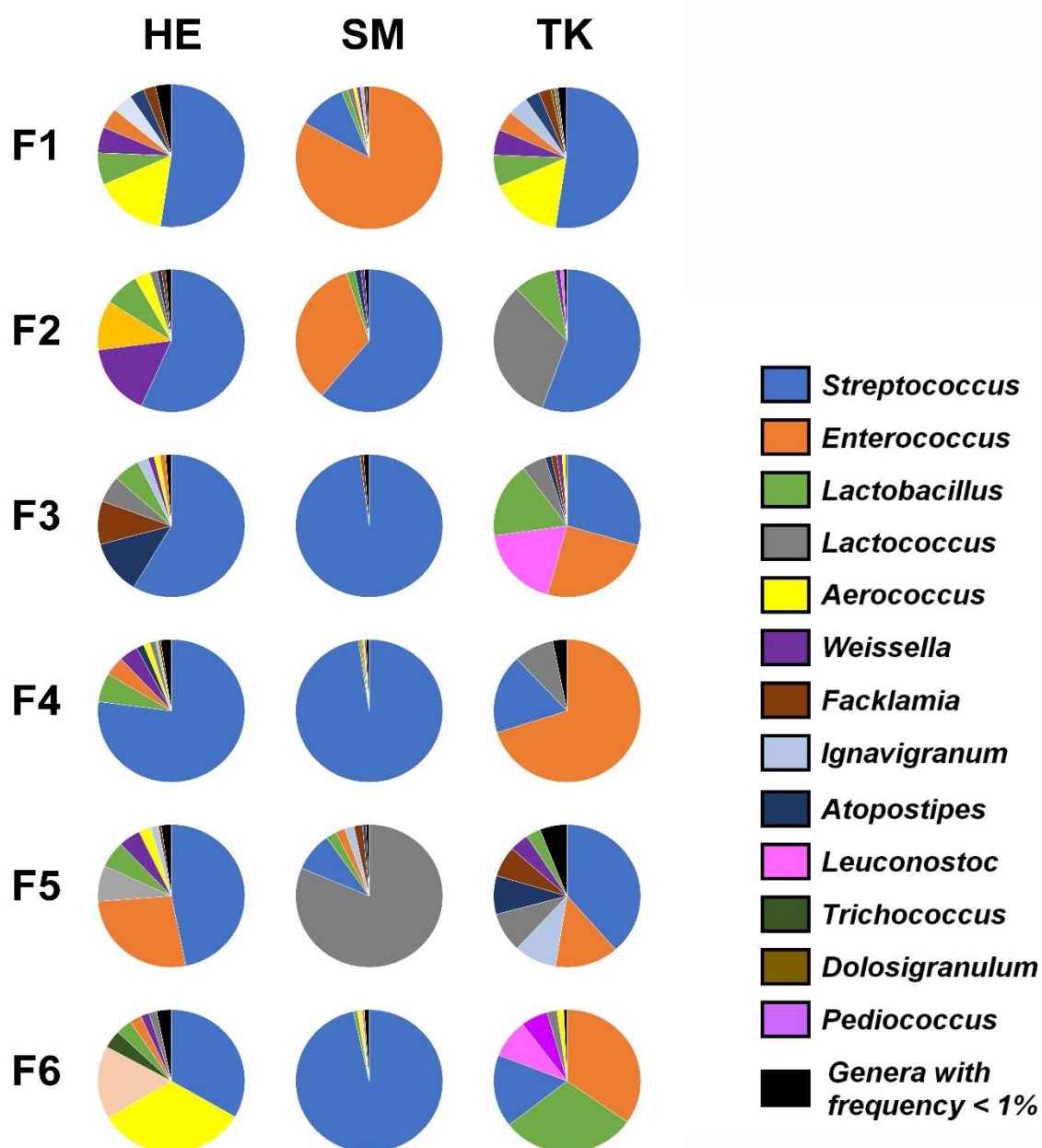
As bactérias do ácido láctico (BAL) foram inicialmente associadas ao "organismo acidificante do leite", com a primeira cultura pura identificada por Lister em 1873. Mais tarde, Beijerinck, em 1901, descreveu pela primeira vez esse grupo bacteriano e, em 1919, Orla-Jensen classificou essas bactérias com base em características fenotípicas, como morfologia, metabolismo e temperatura de crescimento. Elas pertencem à Ordem *Lactobacillales*, que é subdividida em seis famílias, que incluem gêneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, que são a base desse grupo. A classificação das BAL leva em conta fatores como a fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, adaptação a ambientes ricos em nutrientes e tolerância a condições ácidas ou alcalinas. Com o avanço das técnicas moleculares, a classificação dessas bactérias evoluiu, permitindo a identificação de novos grupos baseados no gene 16S rRNA (Reis, 2015; Silva, 2011; Azam *et al.*, 2017; Tsirigoti *et al.*, Garroni *et al.*, 2020; Taye *et al.*, 2021).

As BAL formam um grupo heterogêneo que inclui cocos e bacilos, gram-positivos, não esporulados e catalase negativos. Elas são anaeróbias facultativas, capazes de fermentar tanto em condições de anaerobiose quanto aerobiose, embora de forma mais lenta. Seu principal produto da fermentação dos açúcares é o ácido láctico, que contribui para a acidificação de alimentos destinados a humanos e animais. As BAL não produzem citocromos nem catalase positiva, embora algumas estirpes possam produzir peroxidases ou catalase em condições específicas de laboratório. Elas são microrganismos quimioorganotróficos, com metabolismo exclusivamente fermentativo e possuem a capacidade de crescer em temperaturas entre 5°C e 45°C. São fundamentais na produção queijeira, possuindo grande importância no desenvolvimento sensorial desses produtos. Também produzem compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, que melhoram a qualidade dos alimentos fermentados e podem secretar exopolissacarídeos, que influenciam a textura dos alimentos. No processo de fabricação de queijo, as BAL aceleram a coagulação do leite e influenciam o sabor, a textura e o corpo do queijo. Durante a produção e maturação, a microflora láctica enfrenta diversas condições adversas, como variações de temperatura e pH, que afetam seu desenvolvimento e metabolismo (Reis, 2015; Silva, 2011; Azam *et al.*, 2017; Tsirigoti *et al.*, Garroni *et al.*, 2020; Taye *et al.*, 2021).

O estudo das prevalências das bactérias do ácido lático (BAL) neste trabalho foi motivado pelo seu papel essencial na fermentação do leite cru para a produção do QMAC, processos que influenciam diretamente o sabor, a textura e a segurança desses produtos. As BAL são fundamentais na transformação da lactose em ácido lático, o que favorece a coagulação do leite e o controle do pH, contribuindo para a inibição de patógenos indesejáveis. Além disso, essas bactérias desempenham um papel crucial no desenvolvimento do perfil sensorial dos queijos artesanais, afetando características como aroma e sabor. O estudo desses microrganismos é igualmente importante para preservar os métodos tradicionais de produção e garantir a qualidade e a segurança alimentar desses produtos. Assim, foi utilizada uma contagem de *reads* por gênero de BALs, a partir da ferramenta QIIME2, resultando na Figura 9.

Os resultados obtidos na análise microbiológica dos rebanhos produtores de QMAC revelaram a predominância de *Streptococcus*, que representou 77% da população bacteriana. Outros gêneros identificados, embora em menor proporção, incluíram *Enterococcus* (9%), *Lactococcus* (5%), *Aerococcus* (3%) e *Lactobacillus* (2%). Os gêneros *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Atopostipes* e *Weissella* estavam presentes em quantidades inferiores, com cada um contribuindo com 1% da composição bacteriana. Por fim, os gêneros restantes apresentaram porcentagens menores que 1%, demonstrando uma diversidade bacteriana, embora em níveis significativamente mais baixos.

**Figura 9** – Distribuição de Gêneros de BAL entre Animais Doentes, Saudáveis e Tanques de Expansão Refrigerado, por Fazenda



**Legenda:** Gráficos de representação dos gêneros das bactérias do ácido láctico (BALs). A parte superior dos gráficos está dividida entre amostras de leite individual de animal saudável (HE), amostras de leite individual de animal acometido por mastite (SM) e amostras do tanque de expansão refrigerado (TK) das seis fazendas que estão representadas na parte esquerda do gráfico (F1, F2, F3, F4, F5, F6). As cores dispostas nos gráficos representam a frequência dos gêneros: azul-escuro – *Streptococcus*; laranja – *Enterococcus*; verde – *Lactobacillus*; cinza – *Lactococcus*; amarelo – *Aerococcus*; roxo – *Weissella*; marrom – *Facklamia*; azul-claro – *Ignavigranum*; cinza-escuro – *Atopostipes*; rosa-claro – *Leuconostoc*; verde-escuro – *Trichococcus*; marrom-claro – *Dolosigranulum*; lilás - *Pediococcus*; preto – gêneros com frequências < 1%.

Na Figura 9, a parte superior dos gráficos está dividida entre amostras de leite saudável (HE), amostras de leite acometido por mastite (SM) e amostras do tanque de expansão refrigerado (TK) das seis fazendas que estão representadas na parte esquerda do gráfico, numeradas de F1 a F6, e as cores representam os gêneros de bactérias do ácido lático e sua respectiva frequência.

Entre as seis fazendas amostradas, o gênero *Streptococcus* destacou-se como o mais abundante em quatro delas (F2, F3, F4 e F6) nas vacas com mastite subclínica, representando 77% das bactérias lácticas totais. Notavelmente, esse mesmo gênero também foi predominante nas vacas saudáveis dessas fazendas, sugerindo uma possível transmissão bacteriana durante o processo de ordenha. Por outro lado, nos tanques de armazenamento, a abundância de *Streptococcus* não foi observada nas fazendas F3, F4 e F6. Esse fenômeno pode ser explicado pela competição com outros gêneros bacterianos no ambiente do tanque ou pelo aporte de leite proveniente de outros animais não amostrados, o que diluiria a representatividade de *Streptococcus* (Kabelitz *et al.*, 2021).

Cameron *et al.* (2016) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana entre espécies de *Streptococcus* ambientais, isolados de vacas leiteiras. Como esses microrganismos estão presentes em praticamente todos os ambientes da fazenda e são uma causa frequente de mastite em vacas leiteira, o estudo dos padrões de suscetibilidade antimicrobiana é muito importante para orientar o tratamento desses agentes infecciosos nos animais. Os autores destacam que, embora alguns *Streptococcus* sejam classificados como patógenos ambientais, sendo, assim, a fonte do patógeno causador o ambiente em que o animal vive, tanto *S. uberis* quanto *S. dysgalactiae* demonstram ser agentes de mastite contagiosa, transmitida de animal para animal durante a ordenha. Além disso, de acordo com os resultados do referido estudo, houve diferenças na suscetibilidade antimicrobiana entre os gêneros e entre *S. uberis* e *S. dysgalactiae*. Desta forma, como apresentado por Cameron *et al.* (2016), os resultados das amostras saudáveis e acometidas por mastite possuindo os mesmos padrões de abundâncias para o gênero *Streptococcus*, como em F4, por exemplo, podem estar diretamente ligados por contágio durante ordenha (Cameron *et al.*, 2016).

Em F1, o leite dos animais acometidos por mastite subclínica (SM) e do tanque de expansão refrigerado (TK) de F4 possuía maior prevalência do gênero *Enterococcus*, representando 9% das BALs amostradas. A presença significativa de *Enterococcus* no leite, segundo Kagkli *et al.* (2012), possui origem de contaminação fecal, sugerindo uma possível

contaminação cruzada das fezes para as tetas durante a ordenha. O estudo sugere que a máquina de ordenha e o tanque de expansão são as principais fontes de bactérias no leite cru, ressaltando a importância da higiene e controle de contaminação nesses equipamentos. Esse gênero bacteriano é formado por bactérias gram-positivas, aeróbios facultativos, que, em humanos, possuem capacidade de causar diversas infecções, incluindo endocardite, prostatite, infecções do trato urinário, entre outras (Kagkli *et al.*, 2012; Bush *et al.*, 2023).

McAuley *et al.* (2015) desenvolveram um estudo em que analisaram o crescimento de *Enterococcus* em leite cru e pasteurizado no qual esse grupo apresentou contagens mais altas no leite cru, sugerindo que as principais populações de *Enterococcus* no leite cru são sensíveis ao calor, e os termodúricos sobreviveram à pasteurização. Além disso, foram detectados esses microrganismos em leite pasteurizado, armazenado a 4°C por 2 semanas, demonstrando seu potencial de crescimento e sobrevivência em temperaturas de refrigeração, podendo contribuir para a deterioração do leite (McAuley *et al.*, 2015). Yoon *et al.* (2021) estudaram a caracterização de *Enterococcus* isolados de amostra de leites de tanque a granel, com a finalidade de evitar a disseminação de espécies patogênicas e resistentes a antimicrobianos em empresas de laticínios. Seus resultados demonstraram que os *Enterococcus* possuem vários graus de resistência antimicrobiana e que o leite presente no tanque a granel pode se tornar um reservatório para disseminação de fatores de virulência e resistência antimicrobiana desses patógenos, por meio de processos de contaminação cruzada (Yoon *et al.*, 2021). Com bases nesses estudos, os resultados de F3, F4 e F6, para o leite do tanque de expansão refrigerado (TK), podem indicar falta de higienização adequada do tanque ou do equipamento de ordenha.

As amostras do tipo saudáveis (HE) e do tanque de expansão refrigerado (TK) apresentam maior variabilidade dentro do seu próprio grupo. É possível observar uma grande proporção de *Aerococcus* em F1 e F6 HE, também em F1 TK, por exemplo. Importante destacar que *Aerococcus* possui espécies que são consideradas como causa de mastite em bovinos, com função pouco evidente nas alterações patogênicas (Shaker, 2019). Porém, existem alguns estudos, como o de Jung *et al.*, 2024, que, em seus resultados, identificaram espécies de *Staphylococcus* e *Aerococcus* como potenciais candidatas para contribuir com a resistência à mastite clínica acometida pela colonização do patógeno *Escherichia coli*. Nesse trabalho, observou-se que a infecção por *E. coli* leva a uma redução significativa na diversidade da microbiota presente no leite de animais afetados, demonstrando que a bactéria é capaz de suprimir outros microrganismos. Contudo, após o controle da infecção, a diversidade se

restabelece rapidamente. No leite de quartos que permaneceram saudáveis, a composição da comunidade bacteriana foi altamente dominada por *S. auricularis*, *S. haemolyticus*, *A. urinaeegui* e *S. marcescens*, sem aumento na contagem de células somáticas (CCS) (Jung *et al.*, 2024). Sendo o gênero *Aerococcus* um dos mais frequentes, representando 3% das leituras de *reads*, as informações do trabalho de Jung *et al.* (2024) trazem *insights* importantes sobre a dinâmica da microbiota em casos de mastite. Esses dados reforçam a necessidade de mais estudos para esclarecer o papel do gênero *Aerococcus* na saúde do úbere, especialmente no contexto de resistência a infecções. Compreender a interação entre patógenos como *Escherichia coli* e a microbiota do leite pode ser fundamental para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas, contribuindo para a saúde animal e a qualidade do leite.

*Lactococcus* foi o terceiro gênero mais frequente, apresentando maior destaque nos animais acometidos por mastite subclínica em F5 e na amostra do tanque de expansão refrigerado de F2. Esse gênero bacteriano foi estudado por Tetili *et al.* (2017) quanto à sua ação antiestafilocócica e ao controle da produção de enterotoxinas estafilocócicas. Os pesquisadores observaram que, na presença de *Lactococcus lactis* isolado do leite, o número de *Staphylococcus aureus* diminuiu significativamente em queijos produzidos com leite cru na Argélia. Esse patógeno, além de ser um dos principais agentes responsáveis pela mastite bovina, também desempenha um papel significativo na ocorrência de intoxicações alimentares. Indivíduos suscetíveis podem desenvolver sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e cólicas abdominais após o consumo de alimentos contaminados por suas toxinas. O fato de o QMAC também ser produzido com leite cru torna-o suscetível aos danos provocados por *Staphylococcus aureus*. Entretanto, a presença de *Lactococcus* no leite pode ser um benefício, contribuindo para o controle desse patógeno e, conseqüentemente, para a melhoria da qualidade e segurança do produto final (Tetili *et al.*, 2017).

O gênero *Lactobacillus*, representando 2% das amostras de gêneros representadas, destacou-se nas amostras do tanque de expansão refrigerado (TK), principalmente em F2, F3 e F6. É um gênero comumente encontrado na microbiota do leite bovino e faz parte das bactérias indígenas da glândula mamária. Esse gênero bacteriano é altamente diversificado, abrangendo numerosas espécies e subespécies com características específicas que contribuem para sua importância em alimentos fermentados. Essas bactérias ácido-láticas (BAL) possuem atividade proteolítica e a capacidade de produzir compostos aromáticos e exopolissacarídeos, o que melhora a qualidade sensorial e nutricional de produtos fermentados. No leite cru, a composição de lactobacilos varia conforme o hospedeiro, geralmente, apresentando um

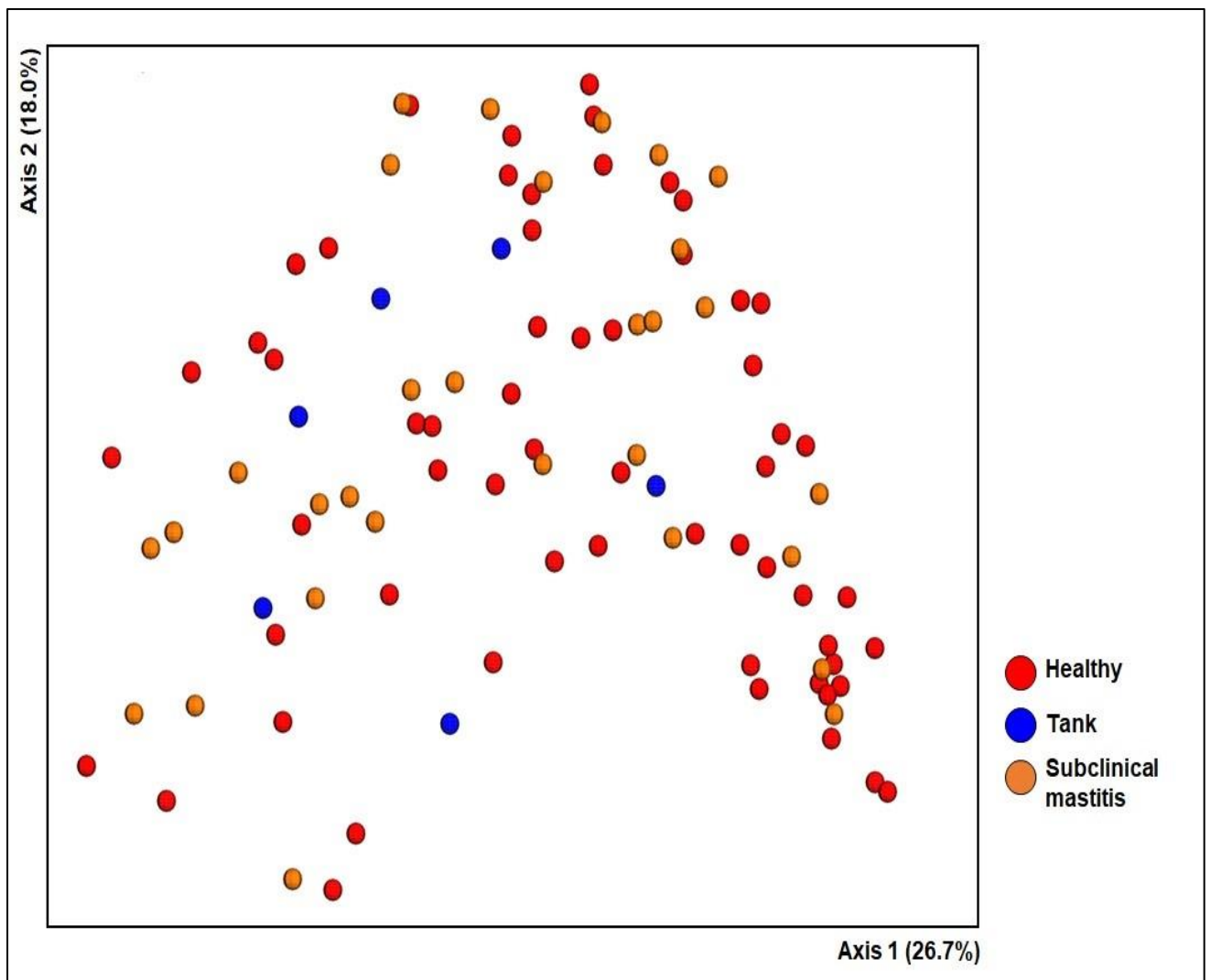
número limitado de espécies, como *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. brevis*. Estudos mostram que a diversidade e a abundância de *Lactobacillus* podem ser influenciadas por fatores como a raça do animal (Steinberg, 2016).

A análise das amostras avaliadas revelou uma diversidade marcante na composição das bactérias do ácido lático (BAL) entre as seis fazendas e tipos de amostras, destacando o caráter único da microbiota associada a cada ambiente. Essa diversidade reflete uma interação complexa entre fatores ambientais, condições de manejo e características individuais dos rebanhos. Por exemplo, a predominância de *Streptococcus* em vacas saudáveis e naquelas acometidas por mastite subclínica sugere a influência da transmissão bacteriana durante a ordenha, enquanto a presença significativa de *Enterococcus* nos tanques aponta para possíveis falhas no controle de higienização dos equipamentos. A maior abundância de *Lactobacillus* em tanques refrigerados também sugere sua resistência relativa a condições ambientais mais adversas, como baixas temperaturas, e sua adaptação à microbiota indígena do leite cru. Essa variabilidade intrínseca reforça a importância de estudos aprofundados sobre os fatores que moldam essas comunidades bacterianas, pois a microbiota altamente diferenciada das fazendas pode impactar significativamente a qualidade sensorial, a segurança e o perfil funcional dos produtos derivados, como o Queijo Minas Artesanal.

### **5.3. Perfil de similaridade entre amostras e fazendas**

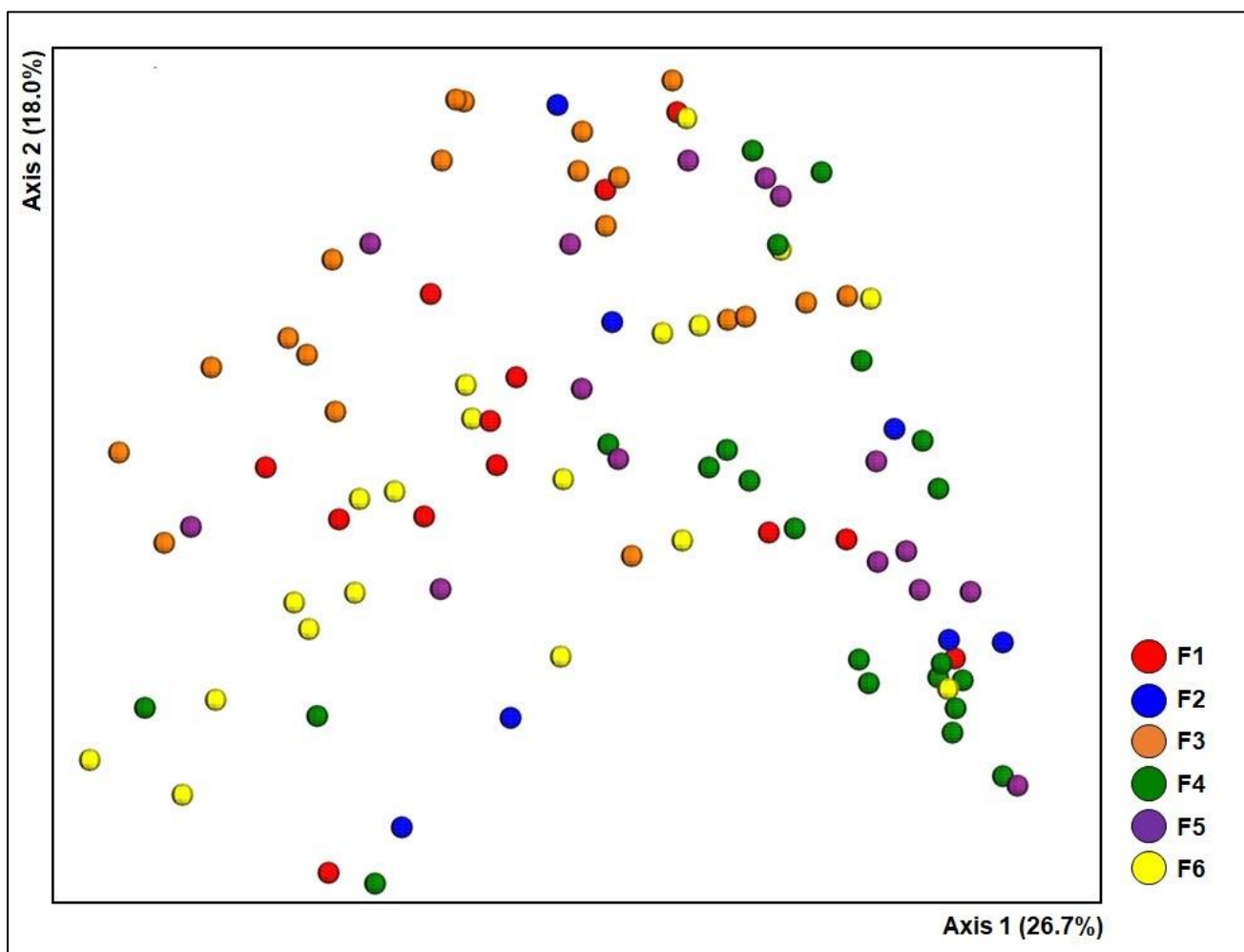
O estudo do perfil de similaridade bacteriana em amostras de leite é essencial para se compreender a dinâmica microbiana que influencia a qualidade, a segurança e o processamento do leite, permitindo identificar padrões associados a condições como mastite, contaminações ou tratamentos inadequados. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi a ferramenta utilizada nesse contexto, pois emprega métricas de similaridade e dissimilaridade para reduzir a complexidade dos dados microbiológicos e facilitar a visualização das relações entre as amostras. Essa abordagem possibilita identificar agrupamentos, variações intergrupais e fatores que impactam a composição bacteriana, fornecendo *insights* importantes para o controle de qualidade do produto e a saúde dos rebanhos. Assim, nas Figuras 10 e 11, temos um gráfico de dispersão de todas as amostras analisadas.

**Figura 10** – Análise PCoA Geral: Dispersão das amostras de leite por estado de saúde do animal, sendo divididas entre animais saudáveis (HE), animais doentes (SM) e o tanque de expansão refrigerado (TK)



**Legenda:** No gráfico, os círculos de cor vermelha representam amostras de leite saudável (Healthy), enquanto os de coloração azul são os do tanque de expansão refrigerado (Tank) de cada fazenda; os alaranjados representam amostras de leite acometido por mastite subclínica (*Subclinical mastitis*).

**Figura 11** – Análise PCoA Geral: Dispersão das amostras de leite estruturada por fazenda



**Legenda:** O gráfico mostra a similaridade das amostras de cada fazenda, em que os círculos de coloração vermelha representam a fazenda 1 (F1); os azuis, a fazenda 2 (F2); alaranjados, a fazenda 3 (F3); verdes, a fazenda 4 (F4); roxos, a fazenda 5 (F5); e amarelos, a fazenda 6 (F6).

Na Figura 10, o gráfico tem como objetivo avaliar se as amostras de microbiota provenientes de tanques (Tank) formam grupos distintos em relação às amostras de animais saudáveis (*Healthy*) ou com mastite subclínica (*Subclinical mastitis*). A análise revelou que as amostras dos tanques não se agruparam de forma separada, indicando que a condição de armazenamento no tanque não causou mudanças significativas na composição da microbiota. Se o efeito do tanque fosse relevante, seria esperado que as amostras de tanques formassem *clusters* específicos, o que não ocorreu. Isso sugere que o fator tanque não é determinante para a variação observada na microbiota do leite, indicando similaridade entre as amostras, mesmo quando consideradas suas diferentes condições.

É crucial reconhecer a possibilidade de viés no gráfico, especialmente quando há alta prevalência de determinada entidade, como o gênero *Streptococcus*, altamente frequente nas amostras HE das fazendas F1, F2, F3, F4 e F5, nas amostras SM das fazendas F2, F3, F4 e F6, e também nas amostras de TK das fazendas F1, F2 e F5. A marcante presença dessa bactéria pode ter efeitos significativos na interpretação dos dados e potencialmente mascarar a presença de outras bactérias durante o cálculo e projeção no gráfico. O viés introduzido pela predominância de uma variável pode distorcer a análise, levando a conclusões equivocadas ou simplificações excessivas da complexidade subjacente. Para mitigar esse viés, é recomendável adotar abordagens que considerem a normalização dos dados ou a realização de análises específicas para cada categoria de interesse (Wang *et al.*, 2022).

Kuehn *et al.* (2013) investigaram a composição da microbiota de amostras de leite com o objetivo de compreender a mastite bovina. Para isso, coletaram leite de animais saudáveis e acometidos por mastite clínica e subclínica em três fazendas de gado leiteiro. Os resultados das PCoA revelaram agrupamentos distintos: as amostras de leite de animais saudáveis formaram um grupo, enquanto as de animais com mastite formaram outro, indicando similaridade microbiológica dentro de cada grupo e dissimilaridade entre os dois. Porém, nesse mesmo trabalho, é observada uma maior dispersão entre amostras de leite de animais com mastite subclínica e animais com mastite clínica, abordando as diferenças filogenéticas entre os microrganismos de animais nessas duas condições (Kuehn *et al.*, 2013). Esses achados são notáveis, pois o leite de todos os animais caracterizados como doentes no presente estudo é de animais com mastite subclínica, podendo demonstrar maiores índices de proximidade microbiológica no leite de animais saudáveis e com mastite subclínica do que de animais com mastite clínica.

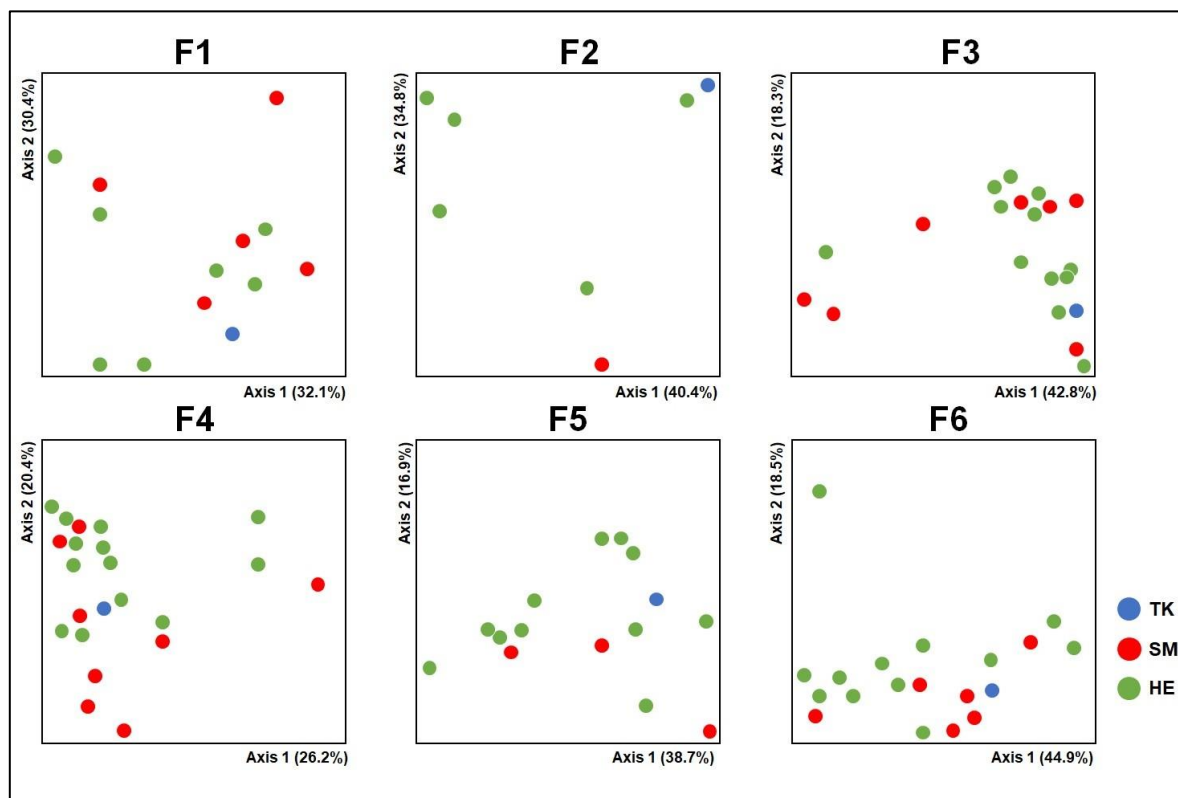
Na Figura 11, o gráfico explora se as amostras de microbiota possuem uma assinatura característica de cada fazenda. A dispersão das cores no gráfico, que representam diferentes fazendas (F1, F2, F3, F4, F5, F6), mostra que as amostras não se agruparam por origem, indicando a ausência de uma assinatura microbiológica local. Isso significa que a microbiota das amostras de leite é bastante similar, independentemente da fazenda de origem. Essa similaridade pode ser explicada pela proximidade geográfica das fazendas e pelas condições de produção similares, que não foram suficientes para gerar diferenças na composição microbiológica entre as amostras de leite provenientes de diferentes locais.

O estudo de Kuthyar *et al.* (2022) investigou o microbioma intestinal de macacos submetidos a dietas semelhantes, porém em localizações geográficas distintas. A análise revelou que, apesar das diferenças de localização, as microbiotas apresentaram características semelhantes, destacando a influência predominante da dieta na composição microbiana. Uma das possíveis vias de colonização do leite é a enteromamária, o que torna especialmente relevante destacar a influência da microbiota intestinal na similaridade alimentar. No presente estudo, os animais das seis fazendas distintas foram alimentados com silagem de milho, mantidos sob condições de manejo semelhantes e localizados em regiões próximas. Esses fatores, especialmente a dieta uniforme, podem ser uma explicação plausível para a similaridade observada na composição da microbiota intestinal entre os animais (Kuthyar *et al.*, 2022).

Costa (2006) investigou a influência das práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite, analisando três propriedades rurais familiares com localização próxima e manejo semelhante. Os resultados evidenciaram elevados níveis de contaminação microbiana no leite cru, indicando que a ausência de práticas higiênico-sanitárias adequadas é um fator determinante para a proliferação de microrganismos no produto. Essa semelhança no manejo entre as propriedades influencia diretamente os tipos e níveis de microrganismos presentes no leite, já que práticas inadequadas, como a falta de controle da qualidade da água e cuidados insuficientes durante a ordenha, favorecem a contaminação. Para obter leite com baixo teor de contaminantes, é essencial implementar medidas higiênico-sanitárias ao longo de toda a linha de produção, desde os cuidados iniciais com o rebanho até o término da ordenha, que são pontos críticos de contaminação (Costa, 2006).

Com finalidade de analisar a similaridade e a dissimilaridade das amostras, dentro de cada fazenda, foi produzido o gráfico de PCoA, da Figura 12, por meio da ferramenta QIIME2.

**Figura 12** – Análise PCoA por Fazenda: Estruturação das amostras de leite por animais saudáveis (HE), animais doentes (SM) e o tanque de expansão refrigerado (TK)



**Legenda:** Os gráficos estão divididos entre as fazendas, numeradas de F1 a F6. As cores separam as amostras entre saudáveis (HE), na coloração verde; acometidas por mastite (SM), vermelho; e tanque de expansão refrigerado, azul.

A Figura 12 foca na discriminação entre as amostras de tanques e as de leite antes de serem armazenadas, considerando também as fazendas de origem. As bolinhas azuis, representando os tanques (TK), aparecem misturadas com as amostras de leite saudável (HE) e acometido por mastite (SM), demonstrando que o armazenamento no tanque não gerou mudanças na microbiota que as diferenciavam das amostras coletadas antes do armazenamento. O curto tempo de permanência no tanque e as condições similares de manejo não foram suficientes para causar sucessões microbiológicas capazes de criar uma assinatura específica do tanque. Dessa forma, as amostras de tanques e as de leite mantêm uma composição microbiológica similar, reforçando a ideia de que o fator tanque não contribui para uma diferenciação significativa.

Ao comparar esses resultados com o gráfico das bactérias do ácido lático (BAL), observamos que a análise isolada de grupos bacterianos específicos revelou diferenças significativas. Em contrapartida, a microbiota, como um todo, não apresentou resultados semelhantes, indicando maior similaridade, sem a formação de agrupamentos distintos entre as

diferentes amostras. Mariota *et al.* (2020) fizeram análises de grupos específicos, com a finalidade de desvendar o potencial deteriorante desses grupos em cima do leite cru. Dessa forma, estudaram a microbiota mesófila, psicotrófica, termodúrica e esporulada do leite de tanques de expansão refrigerados de 20 fazendas e encontraram resultados insatisfatórios para a qualidade do leite das fazendas, evidenciados pelas altas contagens bacterianas de grupos degradantes. Esses resultados reforçam que, talvez, se o estudo tivesse abordado o microbioma total, as amostras poderiam ter evidenciado maior similaridade geral, o que levaria a conclusões distintas. Assim, destaca-se a importância de direcionar análises para grupos específicos, que podem revelar informações cruciais e diferenciadas, ao invés de considerar apenas o microbioma como um todo (Mariota *et al.*, 2020).

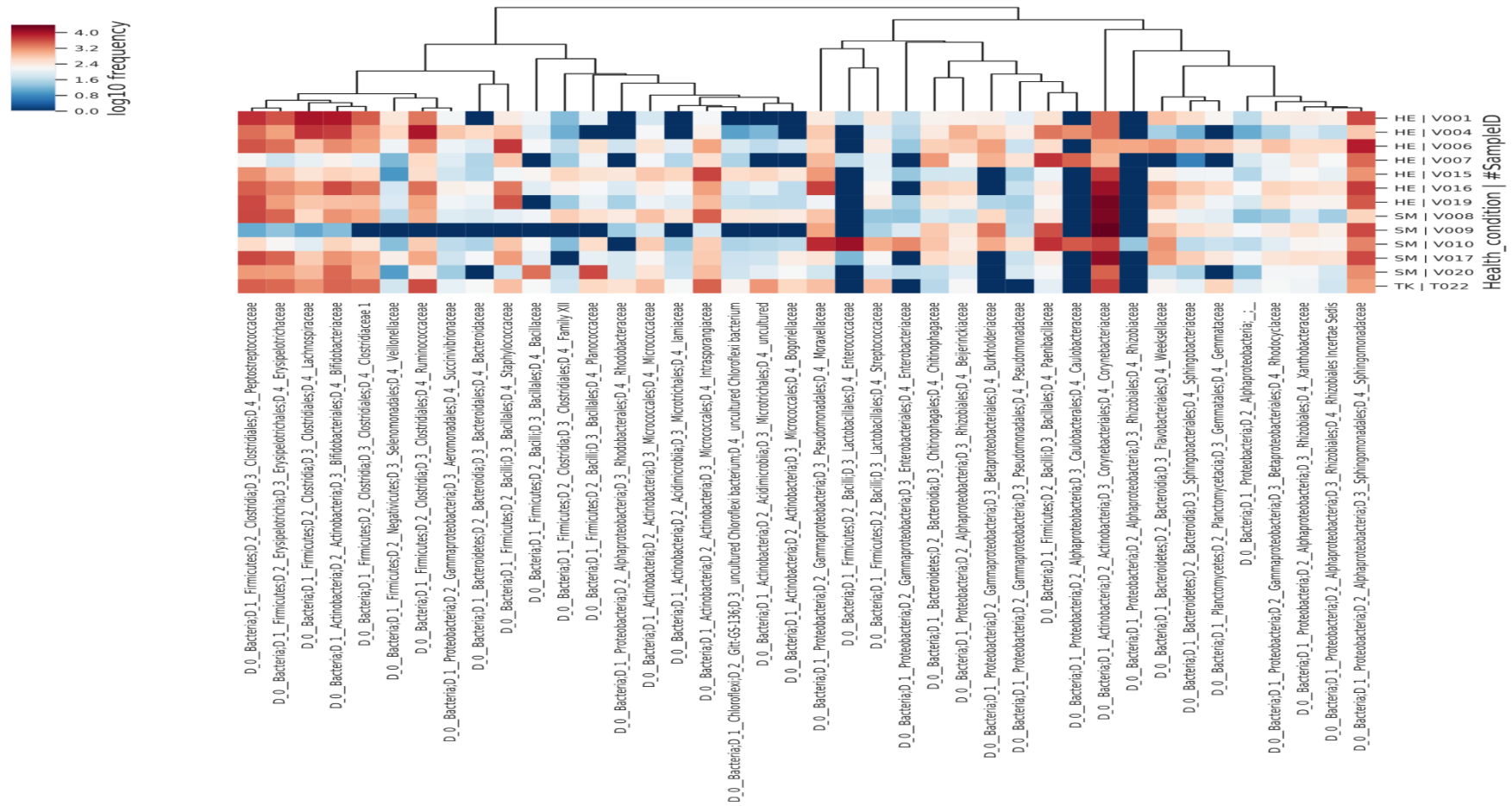
Os resultados dos gráficos de PCoA indicam que a composição da microbiota do leite é amplamente similar, independentemente do local de origem das amostras (fazendas) ou do armazenamento no tanque. Isso sugere que fatores como proximidade geográfica, condições de manejo e curto tempo de permanência no tanque não são suficientes para causar alterações significativas na microbiota. A ausência de agrupamentos específicos nos gráficos reforça que tanto as amostras de tanques quanto as de leite antes do armazenamento compartilham características microbiológicas semelhantes, refletindo a estabilidade da microbiota em sistemas de produção com condições ambientais e práticas de manejo semelhantes. Com o objetivo de complementar os resultados da PCoA, utiliza-se a análise estatística PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*), que avalia diferenças entre grupos com base em matrizes de distâncias. Enquanto a PCoA oferece uma visualização dos agrupamentos no espaço multivariado, a PERMANOVA permite testar estatisticamente se essas diferenças são significativas. Assim, torna-se evidente a necessidade de se realizar estudos adicionais empregando ferramentas estatísticas adequadas para confirmar a significância das distinções e similaridades entre os grupos analisados. Além disso, viu-se a necessidade de estudar e analisar mais grupos bacterianos específicos, em comparação ao microbioma como um todo, para compreender melhor as variações e interações dentro do microbioma do leite.

#### **5.4. Perfil taxonômico a nível familiar**

Conhecer o perfil taxonômico de bactérias a nível de família no leite cru destinado à produção de queijos artesanais é fundamental para garantir a qualidade, segurança e características sensoriais do produto final. Algumas famílias bacterianas incluem espécies

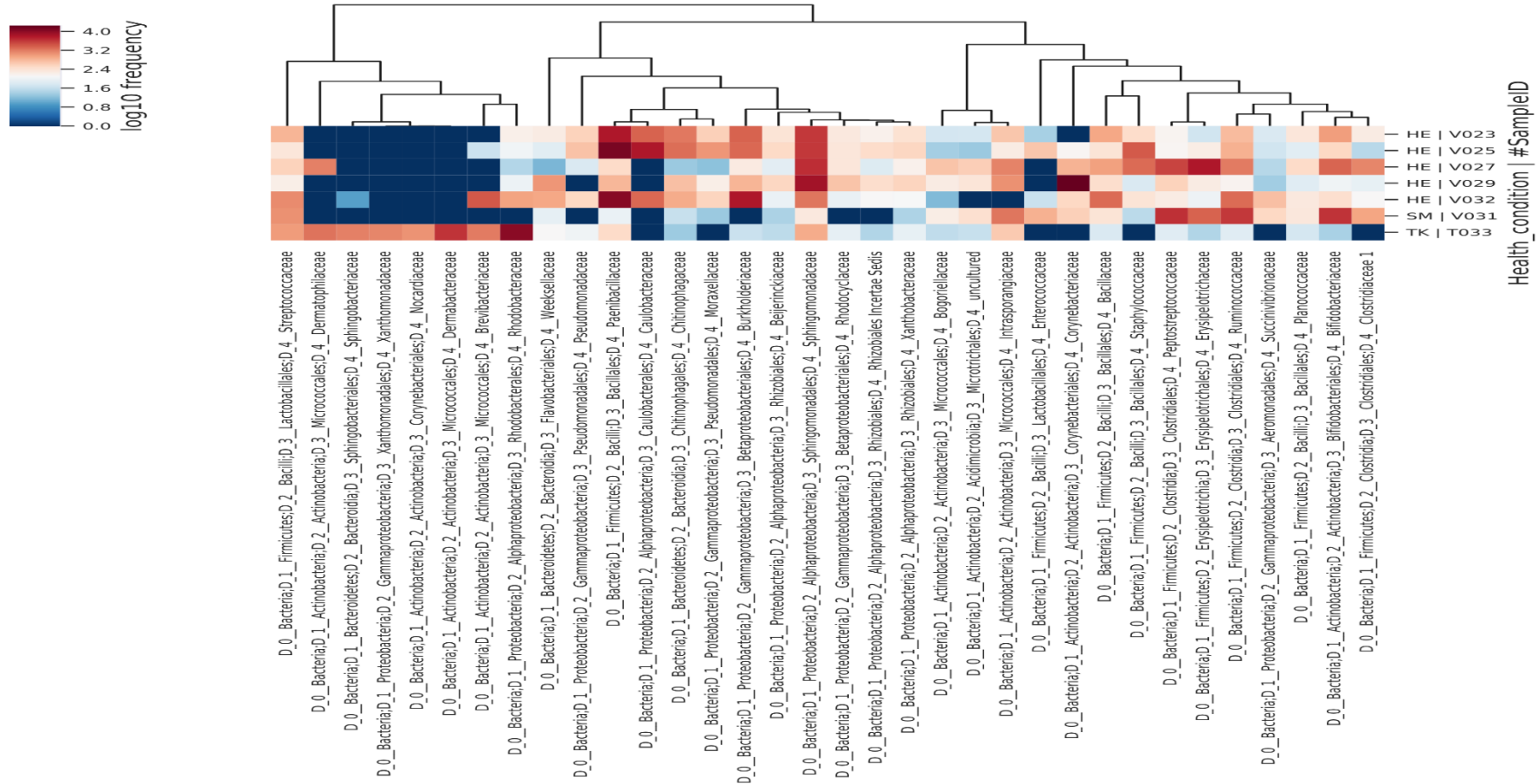
benéficas, como as *Lactobacillaceae*, responsáveis pela fermentação, desenvolvimento de sabor e textura dos queijos, enquanto outras, como as *Enterobacteriaceae*, podem conter patógenos ou bactérias indesejáveis que comprometem a segurança alimentar e a qualidade do produto. Além disso, o monitoramento do perfil microbiano permite controlar a presença de contaminantes, identificar possíveis fontes de deterioração e preservar a autenticidade e a tradição dos queijos artesanais, equilibrando segurança e características típicas desejadas. Dessa forma, com a finalidade de analisar e compreender o perfil taxonômico ao nível de família, foram produzidos *heatmaps* (Figura 13 até a Figura 19) a partir da ferramenta QIIME2, a partir de cada fazenda, e um sobre as amostras de leite de todos os tanques de expansão refrigerados (Cuevas-González *et al.*, 2024).

**Figura 13** – Heatmap de Família 1 (F1)



**Legenda:** Mapa de calor representando as famílias predominantes no microbioma das amostras de leite oriundas da Fazenda 1. A parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias das bactérias, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

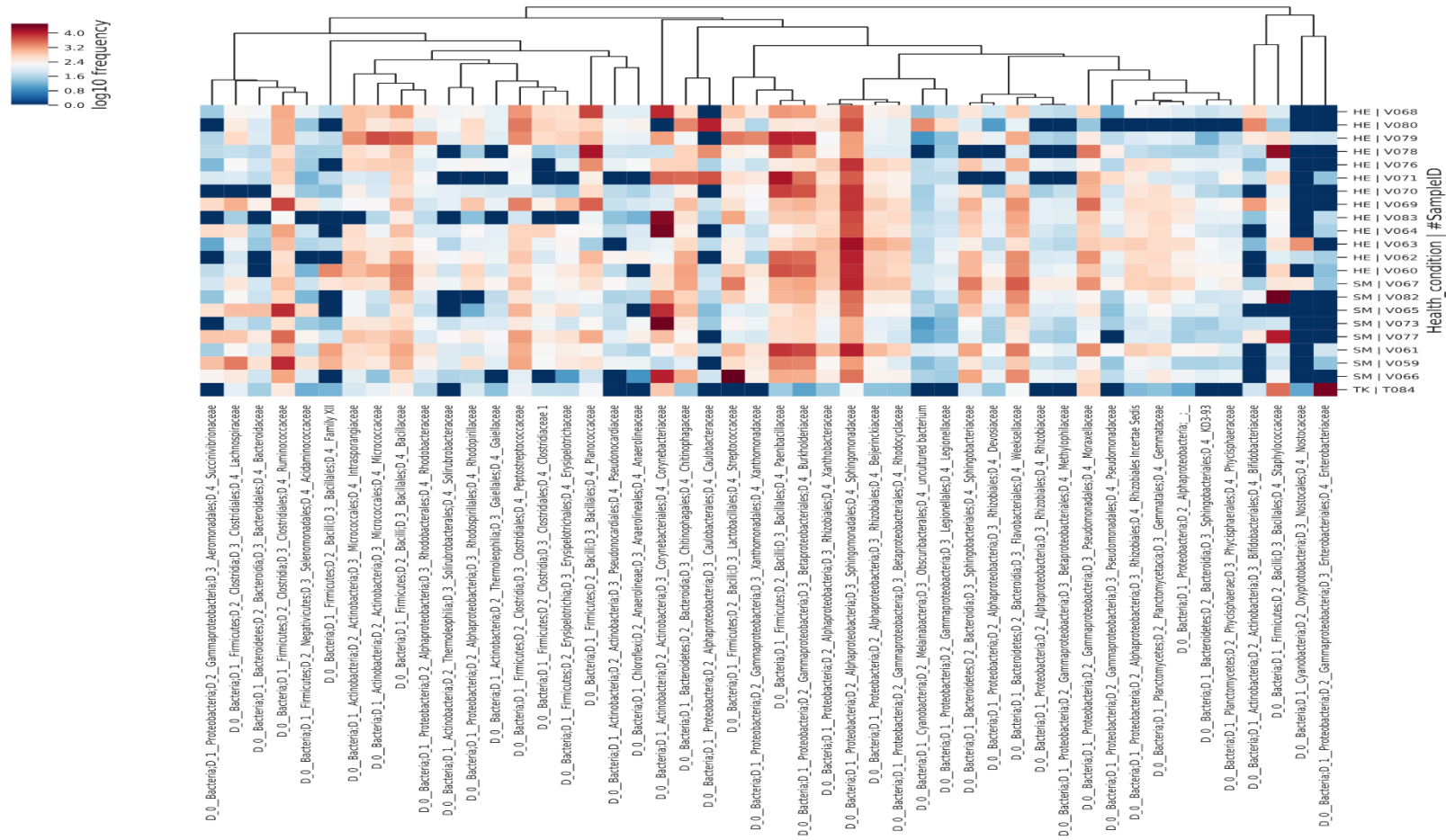
**Figura 14** – Heatmap de Famílias da Fazenda 2 (F2)



**Legenda:** Mapa de calor representando as famílias predominantes no microbioma das amostras de leite oriundas da Fazenda 2. A parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias das bactérias, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

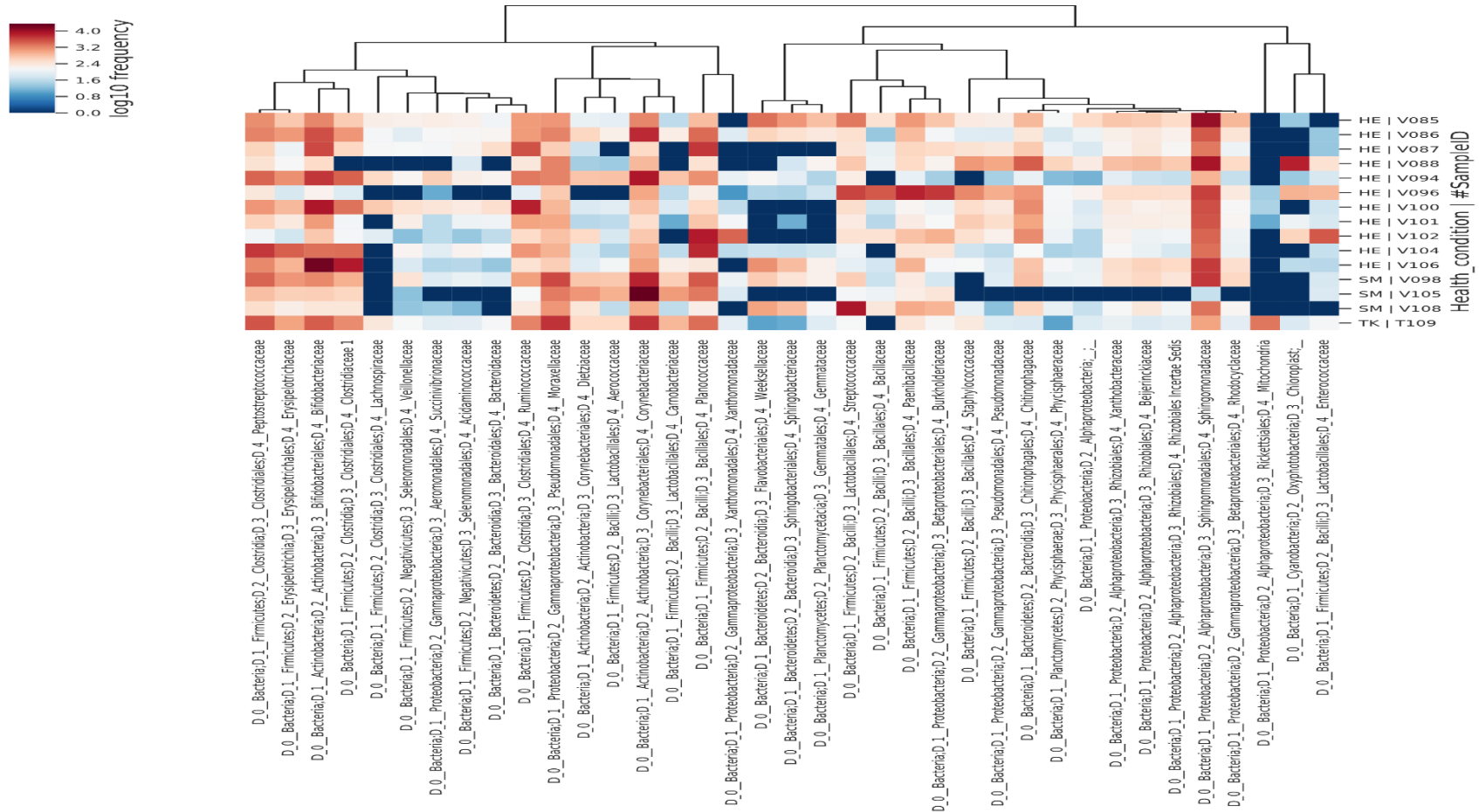


Figura 16 – Heatmap de Famílias da Fazenda 4



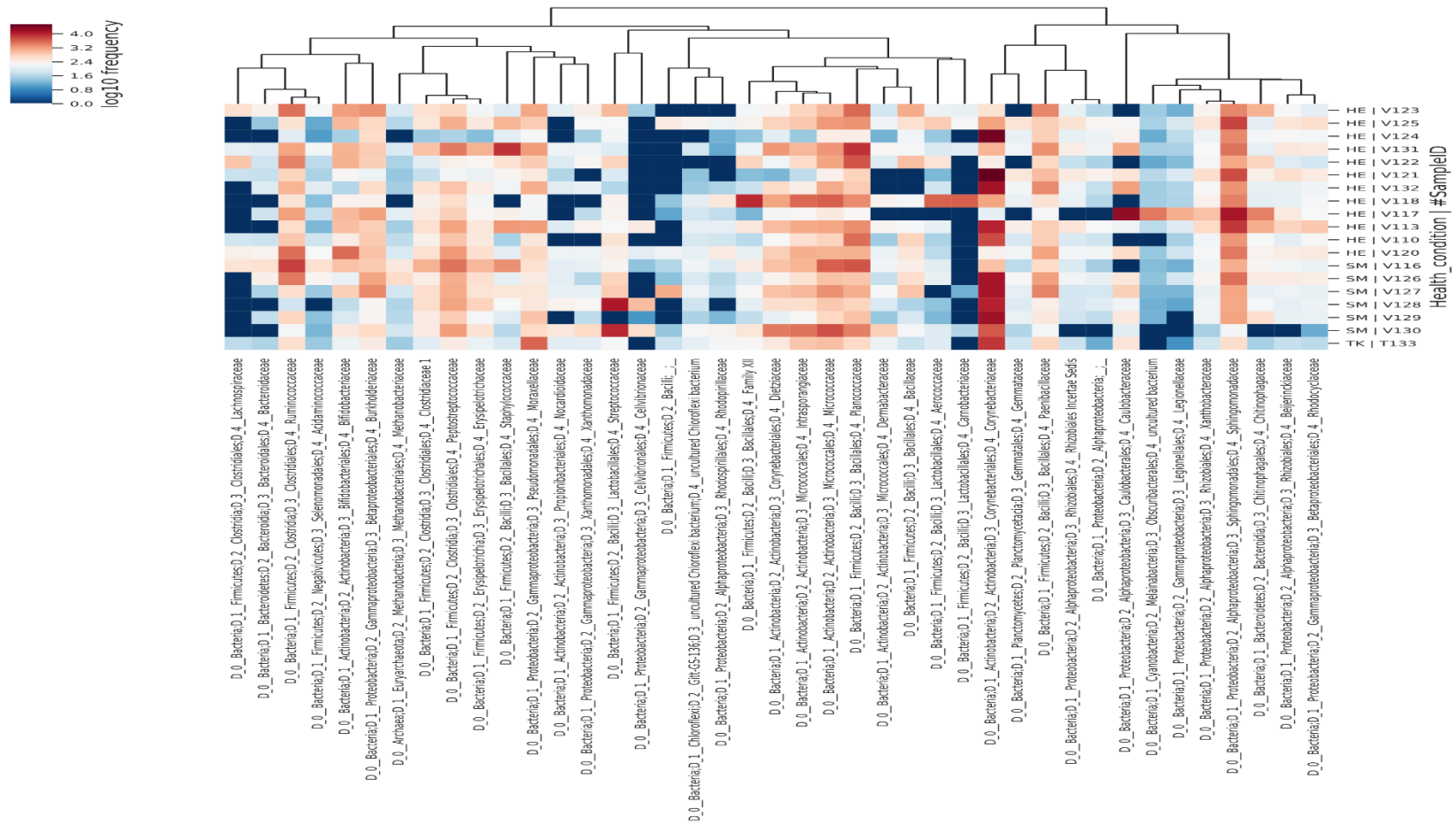
**Legenda:** Mapa de calor representando as famílias predominantes no microbioma das amostras de leite oriundas da Fazenda 5. A parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias das bactérias, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

**Figura 17 – Heatmap de Famílias da Fazenda 5**



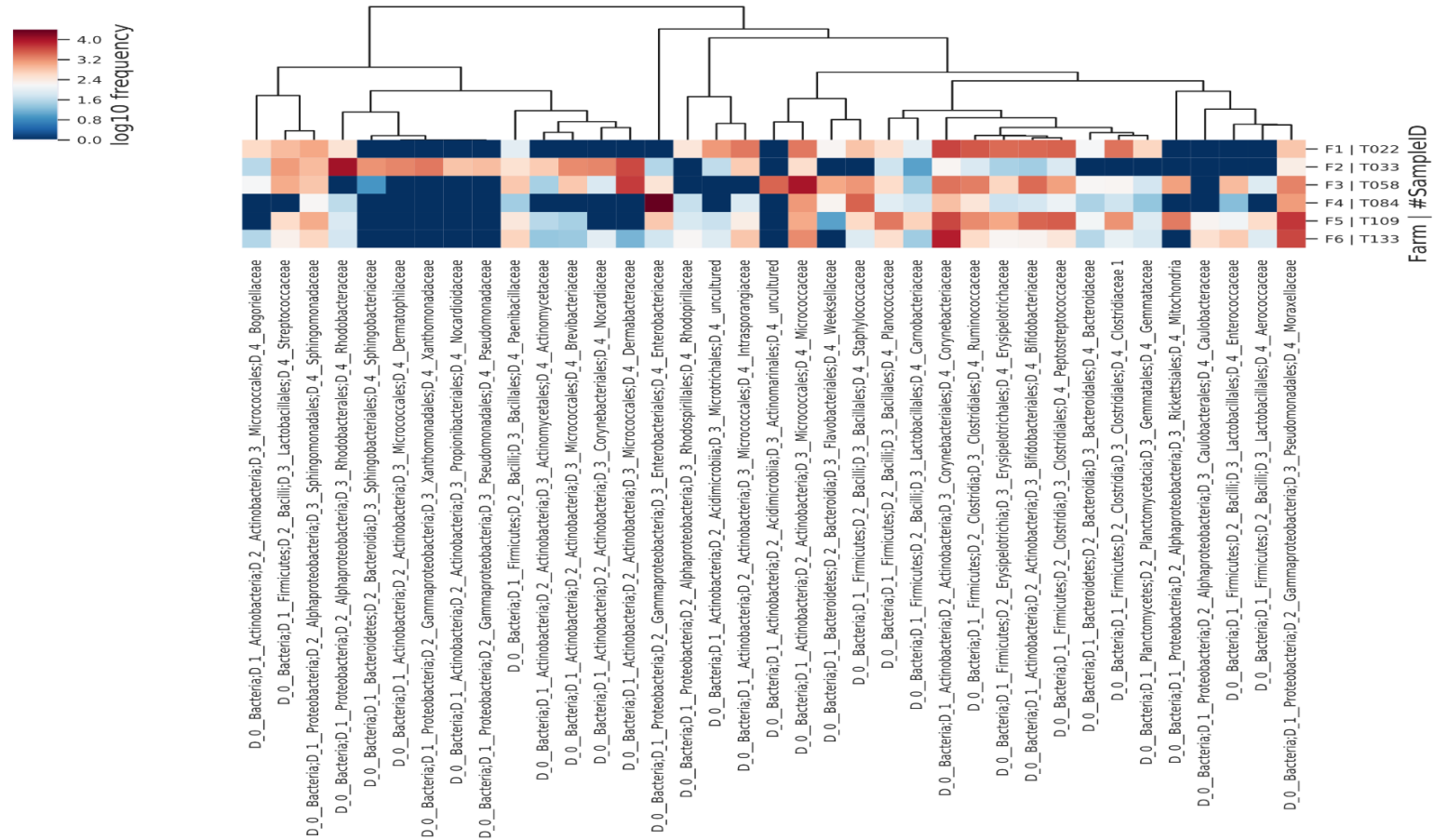
**Legenda:** Mapa de calor representando as famílias predominantes no microbioma das amostras de leite oriundas da Fazenda 5. A parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias das bactérias, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

**Figura 18 – Heatmap de Famílias da Fazenda 6**



**Legenda:** Mapa de calor representando as famílias predominantes no microbioma das amostras de leite oriundas da Fazenda 6. A parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias das bactérias, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

**Figura 19** – Heatmap de Famílias dos Tanques de Expansão



**Legenda:** Mapa de calor representando as famílias predominantes no microbioma das amostras de leite oriundas dos tanques de expansão de cada fazenda. A parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias das bactérias, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados, representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

Os mapas de calor (*Heatmaps*) das Figuras 13 a 19 estão dispostos da seguinte maneira: a parte inferior do gráfico representa os filos, subfilos e famílias bacterianas, enquanto o eixo das ordenadas contém as amostras de leite saudáveis (HE), acometidas por mastite (SM) e a amostra do tanque de expansão refrigerado (TK). As cores presentes nos quadrados representam a frequências log<sub>10</sub>, em cada amostra, em uma escala de 0.0 (representada pela cor azul-escuro) a 4.0 (representada pela cor vermelho-escuro). Na parte superior do gráfico, existe um agrupamento filogenético.

Nos *heatmaps*, na Figura 13, foi possível observar que, na Fazenda 1, as famílias bacterianas predominantes foram a Corynebacteriaceae, que também apresentou alta frequência no tanque, acompanhada de outras famílias como Sphingomonadaceae, Bifidobacteriaceae, Peptostreptococcaceae, Erysipelotrichaceae e Clostridiaceae. Na Figura 14, referente à Fazenda 2, destacaram-se as famílias Streptococcaceae e Sphingomonadaceae, com Rhodobacteriaceae predominando no tanque. Na Figura 15, relacionada à Fazenda 3, as famílias mais frequentes nas amostras de leite foram Corynebacteriaceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae e Peptostreptococcaceae, e a família Micrococcaceae foi a mais prevalente no tanque. Já na Figura 16, referente à Fazenda 4, as famílias Sphingomonadaceae, Paenibacillaceae e Burkholderiaceae foram predominantes, com Enterobacteriaceae sendo mais frequente no tanque. Na Fazenda 5 (Figura 17), as maiores frequências foram de Sphingomonadaceae, Corynebacteriaceae, Bifidobacteriaceae, Planococcaceae, Moraxellaceae, Peptostreptococcaceae e Ruminococcaceae, sendo Moraxellaceae predominante no tanque. Por fim, na Fazenda 6 (Figura 18), destacaram-se Sphingomonadaceae, Corynebacteriaceae, Planococcaceae e Micrococcaceae, com Coriobacteriaceae predominando no tanque. Quando analisados os tanques de todas as fazendas, na Figura 19, as maiores frequências observadas foram de Corynebacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae e Sphingomonadaceae.

Ao comparar os resultados entre as fazendas, é possível observar que, embora existam algumas variações nas famílias bacterianas predominantes nas amostras de leite, algumas se destacam de forma consistente. Sphingomonadaceae, Corynebacteriaceae aparecem com alta frequência em quase todas as fazendas, tanto nas amostras gerais quanto nos tanques, indicando que essas famílias são comuns ao microbioma das fazendas, de modo geral. No entanto, as fazendas apresentam algumas diferenças, como a predominância de Streptococcaceae, na Fazenda 2, e Micrococcaceae, na Fazenda 3, nas amostras de leite,

enquanto, no tanque, famílias como Rhodobacteriaceae (Fazenda 2), Enterobacteriaceae (Fazenda 4) e Moraxellaceae (Fazenda 5) se destacam, sugerindo que o ambiente do tanque favorece a concentração de diferentes famílias bacterianas em cada fazenda. No geral, as famílias predominantes nos tanques de todas as fazendas são mais semelhantes entre si, com destaque para Corynebacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae e Sphingomonadaceae, indicando que, apesar das variações nas amostras gerais, o ambiente do tanque tende a apresentar uma composição bacteriana mais similar.

Os membros da família Corynebacteriaceae, composta pelos gêneros *Corynebacterium* e *Turicella*, são amplamente distribuídos e possuem relevância ambiental, industrial e médica. Esses microrganismos, pertencentes à ordem Corynebacteriales, destacam-se pela presença de ácidos micólicos, que conferem resistência a medicamentos e propriedades imunomoduladoras, contribuindo para sua patogenicidade. No microbioma do leite bovino, a família Corynebacteriaceae desempenha um papel significativo, sendo recuperada a partir de locais como o canal do teto, útero e leite. Estudos recentes destacam sua alta prevalência em amostras de leite de diversas fazendas, sugerindo que essa família integra a microbiota central do úbere. Além disso, evidências apontam para um possível papel protetor dessa bactéria contra patógenos de mastite, como *Staphylococcus*, *Streptococcaceae* e *Enterococcaceae*, através da competição por nicho e da inibição de microrganismos patogênicos, reforçando sua importância para a saúde animal e a qualidade do leite (Bernard, 2016; Tauch *et al.*, 2014; Oliveira, 2024; Porcellato *et al.*, 2020; Brooks *et al.*, 1984; Braem *et al.*, 2012). Na Figura 8, a classe Actinobacteria destacou-se como a mais frequente entre as seis fazendas analisadas. Dentro dessa classe, a família Corynebacteriaceae apresentou os maiores índices de frequência, corroborando os resultados obtidos anteriormente.

No estudo de Porcellato *et al.* (2020), observou-se uma correlação negativa entre a abundância de *Corynebacterium* e *Staphylococcus*, indicando uma possível competição entre esses táxons. Essa interação foi fortalecida a partir de diferenças na composição da população de *Corynebacterium* em quartos mamários disbióticos, frequentemente associados à mastite. Assim, esse gênero pode desempenhar um papel crucial na manutenção do equilíbrio microbiano no leite bovino, com implicações para a saúde animal e a qualidade do leite (Porcellat *et al.*, 2020). Dessa forma, as altas frequências da família Corynebacteriaceae, observadas no presente estudo, podem indicar maiores índices de qualidade do leite nas seis fazendas analisadas. Esse táxon desempenha um papel significativo na simbiose no ambiente do úbere, contribuindo para a saúde dos animais e, conseqüentemente, para a qualidade do leite

produzido.

A segunda família com maiores frequências entre as amostras individuais e de tanque, das seis fazendas analisadas, foi a Sphingomonadaceae. Essa família bacteriana pertence à ordem Sphingomonadales, dentro do filo Proteobacteria. Seus representantes são bactérias Gram-negativas, geralmente aeróbicas, embora algumas sejam quimiorganotróficas anaeróbicas facultativas. São amplamente distribuídas em diversos ambientes, incluindo solo, água doce e marinha, e possuem uma notável capacidade de degradar compostos orgânicos e inorgânicos (Waigi *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2019). Essas características sugerem que a presença desses representantes nas amostras de leite e tanque das fazendas pode estar associada à contaminação ambiental, possivelmente originada de fontes como cama, solo e o ambiente do celeiro.

No estudo de Vries *et al.* (2019), efetuaram-se o isolamento e a caracterização da família Sphingomonadaceae em membranas de filtração de água. Os resultados revelaram que os representantes dessa família atuam como colonizadores iniciais desse tipo de membrana e permanecem dominantes com o desenvolvimento do biofilme, independentemente das propriedades da superfície da membrana. O estudo também destacou que a formação do biofilme resulta em incrustação biológica, um processo difícil de prevenir ou controlar, devido à capacidade desses microrganismos de se multiplicarem e secretarem substâncias poliméricas extracelulares que protegem a comunidade microbiana (Vries *et al.*, 2019). Ao comparar as características da família Sphingomonadaceae com os resultados do presente estudo, é possível supor que essas bactérias possam ter sido inicialmente introduzidas como contaminantes provenientes do solo ou da água das fazendas. Além disso, sua presença nos equipamentos de ordenha pode ter favorecido a formação de biofilmes nesses locais, potencialmente contaminando o rebanho e o leite destinado ao tanque de expansão refrigerado.

As famílias Peptostreptococcaceae e Bifidobacteriaceae foram identificadas simultaneamente em três fazendas (F1, F2 e F3), evidenciando uma ocorrência comum nesses ambientes. Apesar de não revelarem destaque nas frequências observadas nos tanques de expansão, a presença dessas famílias está alinhada com resultados anteriores, sugerindo sua relevância na composição microbiológica de amostras fora do tanque.

A família Peptostreptococcaceae, composta por bactérias Gram-positivas, anaeróbicas e fermentativas, pertence à ordem Eubacteriales e à classe Clostridia, englobando 15 gêneros, incluindo *Clostridioides*. Essas espécies habitam diversos nichos ecológicos, como

o corpo humano, solo, esterco e sedimentos, e algumas têm grande potencial patogênico, como *Clostridioides difficile*, responsável por infecções hospitalares (Bello *et al.*, 2024). Na Figura 8, a classe Clostridia se destacou como a terceira mais frequente entre as seis fazendas analisadas, com a família Peptostreptococcaceae apresentando um dos cinco maiores índices de frequência, corroborando os resultados anteriores. Com base nas características dessa família, podemos supor que sua presença no leite ocorreu tanto por vias ambientais quanto, possivelmente, por enteromamárias. De fato, Jovem *et al.* (2015) demonstraram que Peptostreptococcaceae estava presente em células sanguíneas, células somáticas do leite e fezes de vacas, apoiando a hipótese de uma via enteromamária endógena de transmissão de bactérias do intestino para a glândula mamária e, posteriormente, para o leite (Jovem *et al.*, 2015). Esse estudo sugere uma possível via de transmissão dessa família bacteriana nas amostras das fazendas 1, 3 e 5 do presente trabalho.

A família Bifidobacteriaceae é composta por bactérias Gram-positivas, pertencentes ao filo Actinobacteria. Possuem grande relevância no leite bovino, em especial, o gênero *Bifidobacterium*, principalmente devido à presença de espécies como *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium bifidum*, que podem ser encontradas em produtos lácteos fermentados, como iogurtes e queijos. Essas bactérias desempenham um papel importante na fermentação do leite, contribuindo para a produção de ácidos orgânicos, como ácido lático, que ajudam a preservar os produtos lácteos e a conferir-lhes características sensoriais específicas. Além disso, algumas espécies de *Bifidobacterium* têm sido utilizadas como probióticos em alimentos derivados do leite, devido aos seus benefícios à saúde intestinal, como a modulação da microbiota e a promoção de um ambiente gastrointestinal saudável. Na natureza, essas bactérias são comumente encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo humanos e animais ruminantes, como vacas, e também em fezes, solo e vegetação associada a sistemas digestivos. Em ambientes de produção de leite, como nas fazendas, a presença de Bifidobacteriaceae pode ser um indicador de um equilíbrio saudável na microbiota, favorecendo a saúde das vacas e a qualidade do leite produzido (Taye *et al.*, 2021; Dom *et al.*, 2024; Sibanda *et al.*, 2024). Na Figura 8, a classe Actinobacteria se destacou como a mais frequente entre as seis fazendas analisadas, com a família Bifidobacteriaceae, pertencente a essa classe, apresentando um dos cinco maiores índices de frequência. Esse resultado corrobora as evidências obtidas anteriormente. Considerando que os representantes dessa família habitam predominantemente o trato gastrointestinal, assim como a família Peptostreptococcaceae, sugere-se que a via enteromamária seja a principal rota de colonização dessas famílias no leite

bovino das fazendas investigadas.

A análise dos *heatmaps* das seis fazendas leiteiras revelou padrões distintos e consistentes na composição bacteriana das amostras de leite, com destaque para algumas famílias que se repetem em diversas fazendas. Famílias como *Corynebacteriaceae* e *Sphingomonadaceae* se destacaram em quase todas as fazendas, indicando sua prevalência no microbioma do leite bovino. A presença de *Corynebacteriaceae*, especialmente, sugere um papel protetor contra patógenos de mastite, contribuindo para a saúde dos animais e a qualidade do leite. Por outro lado, *Sphingomonadaceae* parece estar associada à contaminação ambiental, possivelmente, proveniente do solo e dos equipamentos de ordenha, com implicações para a formação de biofilmes. As famílias *Peptostreptococcaceae* e *Bifidobacteriaceae* também foram comuns em várias fazendas, com um possível caminho de transmissão enteromamário, reforçando a importância de mais estudos acerca da influência dessa via no microbioma do leite. No geral, os resultados sugerem que, apesar das variações entre as fazendas, algumas famílias bacterianas apresentam uma presença consistente, o que pode indicar um microbioma estável e relevante para a saúde do rebanho e a qualidade do leite.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados discutidos, observa-se que a microbiota do leite cru das fazendas produtoras de Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC) reflete diretamente a interação entre fatores ambientais, condições de manejo e características dos rebanhos. A diversidade na composição microbiológica, observada em diferentes níveis taxonômicos, ressalta a complexidade do sistema de produção leiteira e a necessidade de compreender as variáveis que influenciam a formação dessas comunidades bacterianas. Essa compreensão é crucial para garantir a qualidade do leite cru, a segurança dos produtos derivados e a saúde animal.

A predominância de filos como Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes indica um microbioma robusto, mas sensível às práticas de manejo e higienização. A presença de possíveis patógenos, como Gammaproteobacteria e Clostridia, reforça a necessidade de implementar estratégias rigorosas de controle sanitário e monitoramento contínuo em todas as etapas da cadeia produtiva. Essas medidas são essenciais não apenas para minimizar riscos à saúde, mas também para assegurar a qualidade sensorial e funcional do queijo artesanal, um patrimônio cultural e gastronômico da região.

A diversidade observada entre as bactérias do ácido lático (BAL) destaca a singularidade da microbiota associada a cada ambiente, refletindo a interação entre as condições de manejo e as características dos rebanhos. A predominância de *Streptococcus* em vacas saudáveis e com mastite subclínica sugere a influência da transmissão bacteriana durante a ordenha, enquanto a presença de *Enterococcus* nos tanques de expansão refrigerados aponta para possíveis falhas no controle de higienização dos equipamentos.

A estabilidade microbiológica observada entre as amostras de diferentes fazendas e etapas de armazenamento, por meio da análise de PCoA, sugere que práticas de manejo e condições ambientais semelhantes contribuem para um perfil microbiológico similar em sistemas de produção próximos geograficamente. Este estudo enfatiza a necessidade de integrar análises microbiológicas detalhadas com abordagens estatísticas robustas, como a PERMANOVA, para compreender as relações entre microbiota e fatores produtivos. Investimentos em pesquisas complementares, alinhados ao desenvolvimento de boas práticas de manejo e higiene, são fundamentais para fortalecer a cadeia produtiva do Queijo Minas

Artesanal Canastra, assegurando sua autenticidade, qualidade e sustentabilidade no mercado competitivo de produtos artesanais.

Os *heatmaps* indicaram a presença consistente de algumas famílias bacterianas, como Corynebacteriaceae e Sphingomonadaceae, em diversas fazendas. A presença de Corynebacteriaceae sugere um papel protetor contra patógenos de mastite, enquanto Sphingomonadaceae parece estar associada à contaminação ambiental, o que reforça a importância de práticas rigorosas de higiene na ordenha. A estabilidade de algumas famílias bacterianas nas amostras de leite indica que o seu microbioma pode ser relativamente constante, o que é essencial para a qualidade e segurança dos produtos derivados.

Por fim, os resultados deste estudo destacam a importância de práticas adequadas de manejo e controle de qualidade para garantir a produção de Queijo Minas Artesanal Canastra com segurança alimentar e características sensoriais desejáveis. Além disso, os achados sugerem a necessidade de estudos contínuos sobre as dinâmicas do microbioma do leite, com foco nas interações bacterianas e nas variações sazonais, para aprimorar os processos de produção e garantir a excelência do produto final.

## REFERÊNCIAS

ADDIS, M. F. *et al.* The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 8, p. 2359–2372, 2016.

ALEJANDRA, ANDREA, LATORRE *et al.* On-Farm Surfaces in Contact with Milk: The Role of *Staphylococcus aureus* Containing Biofilms for Udder Health and Milk Quality. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 1, p. 44–51, 9 jan. 2020.

ALMEIDA, C. C. DE *et al.* Enterobacteriaceae in calves, cows and milking environment may act as reservoirs of virulence and antimicrobial resistance genes. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 376–380, 2021.

ALVES, J. *et al.* Ordenha e boas práticas de produção. **Pecuária Leiteira na Amazônia**, 2020.

ANDREOTE, F. **Introdução aos Métodos Independentes de Cultivo**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5362772/mod\\_resource/content/1/PG\\_Microbiologia-Aula7-2020\\_compressed.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5362772/mod_resource/content/1/PG_Microbiologia-Aula7-2020_compressed.pdf)>. Acesso em: 29 dez. 2024.

AQUILANI, C. *et al.* Review: Precision Livestock Farming technologies in pasture-based livestock systems. **Animal**, v. 16, n. 1, p. 100429, jan. 2022.

AZAM, M. *et al.* Review - Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 5, p. 1803–1814, 1 set. 2017.

BASSOTTO, Leandro Carvalho; MACHADO, Luiz Kennedy Cruz. Gestão dos custos em uma propriedade leiteira familiar do sul de Minas Gerais. **ForScience**, Formiga, v. 8, n. 2, e00528, jul./dez. 2020

BELLO, S. *et al.* Robust demarcation of the family Peptostreptococcaceae and its main genera based on phylogenomic studies and taxon-specific molecular markers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 74, n. 2, 6 fev. 2024.

BENEDETTI, E *et al.* Estudo do impacto de técnicas agropecuárias na agricultura familiar no estado de Minas Gerais. **CAMPO-TERRITÓRIO: revista de geografia agrária**, v. 3, n. 6, p. 66-84, 2008.

BEMFEITO, R. M. *et al.* Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7886–7897, out. 2016.

BERNARD, K. Corynebacteriaceae. **ScienceDirect**, 1 jan. 2016.

BEZERRA, Katia Francielly. Focus group na avaliação da percepção do consumidor sobre queijo Minas artesanal. **Dissertação (Mestrado) – Área de concentração em Produção Animal. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**. Montes Claros, 2018.

BOBIŃSKI, R.; BOBIŃSKA, J. Fatty acids of human milk – a review. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, p. 280–291, 21 abr. 2020.

BORREANI, G. *et al.* Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, p. 8273–8289, set. 2019.

BOUCHARD, D. S. *et al.* Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144831, 29 dez. 2015.

BRAEM, G. *et al.* Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3-4, p. 383–390, 15 jun. 2012.

BRASIL. **D9918**. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2019-2022/2019/decreto/d9918.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2019-2022/2019/decreto/d9918.htm)>. Acesso em: 29 dez. 2024.

BRASIL. **Informações Sobre Visitação - Parna da Serra da Canastra**. Disponível em: <<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unicidade-deconservacao/unidades-de-biomas/cerrado/lista-de-ucs/parna-da-serra-da-canastra/informacoes-sobre-visitacaooparna-da-serra-da-canastra>>.

BRASIL. **Portaria IMA Nº 1969 DE 26/03/2020**. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=391762>>. Acesso em: 29 dez. 2023.

BROOKS, B. W.; BARNUM, D. A. The susceptibility of bovine udder quarters colonized with *Corynebacterium bovis* to experimental infection with *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus*

agalactiae. **Canadian journal of comparative medicine: Revue canadienne de medecine comparee**, v. 48, n. 2, p. 146–50, abr. 1984.

BUSH, L. M.; VAZQUEZ-PERTEJO, M. T. **Infecções por enterococos**. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/cocos-gram-positivos/infec%C3%A7%C3%B5es-por-enterococos>>.

BUSSE, H. *Corynebacteriaceae*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–4, 18 mar. 2012.

CAMERON, M. *et al.* Antimicrobial Susceptibility Patterns of Environmental Streptococci Recovered from Bovine Milk Samples in the Maritime Provinces of Canada. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, 15 set. 2016.

CAO, H. *et al.* High-Throughput Sequencing Reveals Bacterial Diversity in Raw Milk Production Environment and Production Chain in Tangshan City of China. **Food science of animal resources**, v. 41, n. 3, p. 452–467, maio 2021.

CARVALHO, G. R.; DA ROCHA, D. T.; CARNEIRO, A. V. **INDICADORES: LEITE E DERIVADOS**. v. 11, n. 100, 2020. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, mar. 2020.

CHAKRAVORTY, S. *et al.* A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, maio 2007.

CHAPPIDI, S.; VILLA, E. C.; CANTAREL, B. L. Using Mothur to Determine Bacterial Community Composition and Structure in 16S Ribosomal RNA Datasets. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 67, n. 1, 20 jun. 2019.

CHASTANT, S.; MILA, H. Passive Immune Transfer in Puppies. **Animal Reproduction Science**, v. 207, p. 162–170, 1 ago. 2019.

CHRISTIANSSON, A. A predictive model to evaluate the impact of the cooling profile on growth of psychrotrophic bacteria in raw milk from conventional and robotic milking. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 3, p. 318–321, ago. 2017.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840–862, 1 out. 2004.

COELHO, M. C.; MALCATA, F. X.; SILVA, C. C. G. Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2276, 29 jul. 2022.

CORRÊA, A; QUINZANI, S; CAPOVILLA, V. **Queijo artesanal da serra da canastra, patrimônio cultural brasileiro**. 2014.

COSTA, E. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro – MG**. Disponível em: <[https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFV\\_8273199750bdf0a458cce9031c1bb97](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFV_8273199750bdf0a458cce9031c1bb97)>.

COSTA, F. Interferência de práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares. **Dissertação (Mestrado) da Universidade Estadual Paulista**, 2006.

COSTA, R. *et al.* Os queijos Minas artesanais – uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022.

COUPER, L.; SWEI, A. Tick Microbiome Characterization by Next-Generation 16S rRNA Amplicon Sequencing. **Journal of Visualized Experiments**, n. 138, 25 ago. 2018.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F. *et al.* Microbiological quality and native lactic acid bacteria diversity of artisanal Mexican cheeses: A review. **Food research international**, v. 194, p. 114876, out. 2024.

DA, C. *et al.* Principais fontes de contaminação do leite cru por microrganismos aeróbios mesófilos. **XXVIII Congresso de Iniciação Científica**, 2019.

DEDDEFO, A. *et al.* Factors affecting the microbiological quality and contamination of farm bulk milk by *Staphylococcus aureus* in dairy farms in Asella, Ethiopia. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, 7 mar. 2023.

DERAKHSHANI, H. *et al.* Composition and co-occurrence patterns of the microbiota of different niches of the bovine mammary gland: potential associations with mastitis susceptibility, udder inflammation, and teat-end hyperkeratosis. **Animal Microbiome**, v. 2, n. 1, 14 abr. 2020.

DIAS, R. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, 1 ago. 2016.

DŽERMEIKAITĖ, K.; BAČĖNINAITĖ, D.; ANTANAITIS, R. Innovations in Cattle Farming: Application of Innovative Technologies and Sensors in the Diagnosis of Diseases. **Animals (2076-2615)**, v. 13, n. 5, p. 780, 1 mar. 2023.

EMBRAPA. **Hambúrguer: Influência da Temperatura na Concentração Microbiana** MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Rio de Janeiro: 1, 2004. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/76480/1/doc58-2004.pdf>>.

EMBRAPA. **Queijo Minas Artesanal Valorizando a Agroindústria Familiar**. Brasília: 1, 2018. v. 1p. 102

EMBRAPA. **Sobre o tema - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-agricultura-familiar/sobre-o-tema>>.

EMBRAPA. **Capítulo 4 - Processo de Produção do Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <[https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1110225/1/cap4queijominas\\_p55a70.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1110225/1/cap4queijominas_p55a70.pdf)>.

EROL, Z. *et al.* Antimicrobial resistance and prevalence of *Listeria* species from raw milk and dairy products in Burdur, Turkey. **Veterinary Medicine and Science**, v. 10, n. 5, 25 jul. 2024.

FASSIO, L; REIS, R; GERALDO, L. Desempenho técnico e econômico da atividade leiteira em Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, v. 30, p. 1154-1161, 2006.

FORZANI, M. **O impacto do manejo do cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e de pastagem (*Brachiaria decumbens*) na microbiota do solo**. Goiânia: 1, 2017. Disponível em: <[https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/104/o/Defesa\\_Final.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/104/o/Defesa_Final.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2024.

FUKUYAMA, Y. *et al.* Anaerobic and hydrogenogenic carbon monoxide-oxidizing prokaryotes: Versatile microbial conversion of a toxic gas into an available energy. **Advances in Applied Microbiology**, v. 110, p. 99–148, 2020.

GARRONI, E. *et al.* Characterization of Indigenous Lactic Acid Bacteria in Cow Milk of the Maltese Islands: A Geographical and Seasonal Assessment. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 812, 28 maio 2020.

GUERREIRO, P. K. *et al.* Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 216–222, 1 fev. 2005.

GUO, W. *et al.* Bovine milk microbiota: Key players, origins, and potential contributions to early-life gut development. **Journal of Advanced Research**, v. 59, p. 49–64, 7 jul. 2024.

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. **Chapter 21 - Actinobacteria**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128234143000216>>.

HENRIQUES-OLIVEIRA; ROCHA, I. C.; NESSIMIAN. Leptoceridae (Insecta, Trichoptera) from Serra da Canastra Mountain Range, Southeast Brazil: Diversity, Distribution, and Description of Two New Species. **Springer Nature**, v. 48, n. 2, p. 277–289, 1 abr. 2019.

HOGENBOOM, J. A. *et al.* Invited review: Hygienic quality, composition, and technological performance of raw milk obtained by robotic milking of cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, p. 7640–7654, set. 2019.

HOTT, M. *et al.* **Produção de leite na região Sul/Sudoeste de Minas**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1143341/1/Producaodeleite-na-regiao-Sul-Sudoeste-de-Minas.pdf>>. Acesso em: 6 maio. 2023.

IBGE. **Censo Agro 2017: população ocupada nos estabelecimentos agropecuários cai 8,8% | Agência de Notícias**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/25789-censo-agro-2017-populacao-ocupada-nos-estabelecimentos-agropecuarios-cai-8-8>>.

IBGE. **Em 2021, o rebanho bovino bateu recorde e chegou a 224,6 milhões de cabeças | Agência de Notícias**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia->

[noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34983-em-2021-o-rebanho-bovino-bateu-recorde-e-chegou-a-224-6-milhoes-de](https://www.gazetadopovo.com.br/noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34983-em-2021-o-rebanho-bovino-bateu-recorde-e-chegou-a-224-6-milhoes-de)>. Acesso em: 21 maio. 2024.

ILLUMINA. **Amplicon Sequencing Solutions**. Disponível em: <<https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dnasequencing/targetedresequencing/amplicon-sequencing.html>>.

JASWAL, S. *et al.* Critical Review on Physiological and Molecular Features during Bovine Mammary Gland Development: Recent Advances. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 3325, 21 out. 2022.

JUNG, D. *et al.* The occurrence of *Aerococcus urinaeequi* and non-aureus staphylococci in raw milk negatively correlates with *Escherichia coli* clinical mastitis. **Food Microbiology**, 10 set. 2024.

JUNIOR, M. *et al.* Assessments of Bacterial Community Shifts in Sediments along the Headwaters of São Francisco River, Brazil. **Conservation**, 1, 91–105. 2021.

KABELITZ, T. *et al.* The Role of Streptococcus spp. in Bovine Mastitis. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1497, 13 jul. 2021

KABLE, M. E. *et al.* The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. **ASM Journals**, v. 7, n. 4, 23 ago. 2016.

KAUR, U. *et al.* Invited Review: Integration of Technologies and Systems for Precision Animal Agriculture – A Case Study on Precision Dairy Farming. **Journal of Animal Science**, v. 101, 19 jun. 2023.

KHANNA, S.; TOSH, P. K. A Clinician's Primer on the Role of the Microbiome in Human Health and Disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 1, p. 107–114, jan. 2014.

KROEMKER, V. *et al.* Associations between Streptococcus uberis strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 9363–9375, 2019.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329–347, 1 set. 2008.

KUEHN, J. S. *et al.* Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61959, 25 abr. 2013.

LEMOS, Mauro Borges *et al.* Tecnologia, especialização regional e produtividade: um estudo da pecuária leiteira em Minas Gerais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 41, n. 3, p. 117-138, 2003.

LI, N. *et al.* Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 5 fev. 2018.

LIMA, L. P. DE *et al.* Evolução do marco legal do leite cru refrigerado no Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 190–203, 25 dez. 2020.

LIMA, M; CARVALHO, L; PREZOTO F. **Métodos em Ecologia e Comportamento Animal**. Teresina: EDUEFPI, 2015.

LITVAK, Y. *et al.* Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 39, p. 1–6, out. 2017.

LYONS, K. E. *et al.* Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1039, 9 abr. 2020.

MACHADO, M. **Nutrição e o Desenvolvimento da Glândula Mamária de Vacas Leiteiras: Revisão Bibliográfica**. JABOTICABAL: 1, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/089db51d56054e5c82236e3b7d14cdd5/content>>.

MAIA, Guilherme Baptista da Silva *et al.* Produção leiteira no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 37, mar. 2013, p. 371-398, 2013.

MARINHO, J. *et al.* Queijo artesanal Canastra: produção e características. **Revista Empreenda UniToledo**, v. 01, n. 01, p. 120–134, 2017.

MARIOTO, L. R. M. *et al.* Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrofica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, 2020.

MARTINS, D. *et al.* **Tecido Epitelial Glandular**. Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/tecido-epitelial-glandular/>>.

MCAULEY, C. M. *et al.* Prevalence, seasonality, and growth of enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8348–8358, dez. 2015.

MELO, A.; REIS, R. Tanques de Expansão e Resfriamento de Leite Como Alternativa de Desenvolvimento Regional Para Produtores Familiares. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 09, n. 01, p. 111–122, 2007.

MENEZES, M. *et al.* Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. **Revista Eletrônica Em Gestão, Educação E Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 76–89, 2014.

MENESES, José Newton Coelho. **Queijo Artesanal de Minas patrimônio cultural do Brasil – volume 1**. Belo Horizonte, 2006.

METZGER, S. A. *et al.* Understanding the Milk Microbiota. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 427–438, nov. 2018.

MLADENOVIC, K. G. *et al.* Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8615–8627, 3 nov. 2021.

MOSCONI, M. *et al.* Clostridium tyrobutyricum occurrence in silages and cattle feed: Use of molecular and simulation data to optimize predictive models. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 23 mar. 2023.

MORAES, Ismar Araújo. **Fisiologia da glândula mamária**. Rio de Janeiro, 2016.

NASCIMENTO, R; ROSALIN, J; ISMAEL, V. Os elementos da produção de queijos Minas artesanal na região da Serra da Canastra (MG): Paisagem e território na perspectiva da geografia cultural. Barra do Garças – MT: **Revista Geoaraguaia** v.11, n.1, p.278-293. jun-2021.

NASCIMENTO, R; ROSALIN, J; PAULA, V. Os Elementos da Produção de Queijo Minas Artesanal na Região da Serra da Canastra (MG): Paisagem e Território na Perspectiva da Geografia Cultural. **Revista Geoaraguaia**, v. 11, n. 1, p. 278-293, 2021.

NETTO, Marcos Mergarejo. A geografia do queijo minas artesanal. **Tese – Universidade Estadual Paulista – UNESP**. Rio Claro – SP. 2011. 4201 f.

OH, S.; CHOI, D. Microbial Community Enhances Biodegradation of Bisphenol A Through Selection of Sphingomonadaceae. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 3, p. 631–639, 24 set. 2018.

OIKONOMOU, G. *et al.* Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 14 fev. 2020.

OLIVEIRA, D. Caracterização funcional genômica dos micro-organismos predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da Serra da Canastra. **Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental**, p. 81, 2020.

OLIVEIRA, L. F. T.; SILVA, S. P. Mudanças institucionais e produção familiar na cadeia produtiva do leite no Oeste Catarinense. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. v. 50, n. 4, p. 705–720, 2012.

OLIVEIRA, R. Efeito pós-antibiótico de um novo derivado 1,2,4-Oxadiazol-Hidrazida e suas associações frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*. **Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pernambuco**, 2004.

OUAMBA, A. J. K. *et al.* Graduate Student Literature Review: Farm management practices: Potential microbial sources that determine the microbiota of raw bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 9, p. 7276–7287, set. 2022.

PARENTE, L. *et al.* Assessing the pasturelands and livestock dynamics in Brazil, from 1985 to 2017: A novel approach based on high spatial resolution imagery and Google Earth Engine cloud computing. **Remote Sensing of Environment**, v. 232, p. 111301, out. 2019.

PHILLIPS, C. J. C. Principles of Cattle Production. 3rd ed. **Wallingford: CABI**, 2018.

PORCELLATO, D. *et al.* A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21608, 10 dez. 2020.

POWER, M. L.; MULETZ-WOLZ, C. R.; BORNBUSCH, S. L. Microbiome: Mammalian milk microbiomes: sources of diversity, potential functions, and future research directions. **Reproduction & fertility**, v. 5, n. 2, p. e230056, dez. 2024.

PRECELIANO DE OLIVEIRA, D.; HOFFMANN, C.; PAULO, S. **Caracterização funcional genômica dos micro-organismos predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da Serra da Canastra.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde01072021183612/publico/Debora\\_Preceliano\\_de\\_Oliveira\\_ME\\_Corrigida.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde01072021183612/publico/Debora_Preceliano_de_Oliveira_ME_Corrigida.pdf)>. Acesso em: 29 dez. 2024.

PRICE, C. E. *et al.* From meadows to milk to mucosa – adaptation of Streptococcus and Lactococcus species to their nutritional environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 949–971, set. 2012.

RAINARD, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, 17 abr. 2017.

RAVASH, N. *et al.* Impact of high-pressure treatment on casein micelles, whey proteins, fat globules and enzymes activity in dairy products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 11, p. 2888–2908, 21 dez. 2020.

REIS, N. Propriedades Probióticas de Bactérias do ácido lático isolados de leite humano. **Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**, 2015.

RETTEDAL, E. A. *et al.* The Effects of Unfermented and Fermented Cow and Sheep Milk on the Gut Microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 6 mar. 2019.

RINTALA, A. *et al.* Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. **Journal of Biomolecular Techniques : JBT**, v. 28, n. 1, p. 19–30, abr. 2017.

RUIZ, L.; GARCÍA-CARRAL, C.; RODRIGUEZ, J. M. Unfolding the Human Milk Microbiome Landscape in the Omics Era. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 25 jun. 2019.

SAHANA KUTHYAR *et al.* Limited microbiome differences in captive and semi-wild primate populations consuming similar diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 98, n. 10, 1 set. 2022.

SAKWINSKA, O.; BOSCO, N. Host Microbe Interactions in the Lactating Mammary Gland. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 13 ago. 2019.

SCARSELLA, E. *et al.* Characterization of Microbiome on Feces, Blood and Milk in Dairy Cows with Different Milk Leucocyte Pattern. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1463, 19 maio 2021.

SELMA-ROYO, M. *et al.* Human milk microbiome: From actual knowledge to future perspective. **Seminars in Perinatology**, v. 45, n. 6, p. 151450, out. 2021.

SELMA-ROYO, M. *et al.* Human milk microbiota: what did we learn in the last 20 years? **Microbiome Research Reports**, v. 1, n. 3, p. 19, 2022.

SHAKER, E.; HASSANIEN, A.; ABD-ELHAMED, E. Incidence of aerococcus viridans in raw cow milk in sohag city, egypt. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, 2019.

SIBIONI, C. **Armazenamento do leite de vaca pós-ordenha: Revisão**. Jaboticabal: 1, 2024. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/d72fea2f-e737-4e98-a024-025e7e1f82f2/content>>. Acesso em: 20 abr. 2024.

SILVA, L. *et al.* Queijo Minas Artesanal: Manual de Boas Práticas de Fabricação. **Manual de BPF de Queijo Minas Artesanal**, v. 12, n. 40, p. 115–122, 2023.

SILVA, L. **Isolamento e Caracterização Bioquímica das Bactérias do Ácido Láctico do Queijo São Jorge DOP**. Disponível em:<[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2034819/mod\\_resource/content/1/Aula%20Bruno.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2034819/mod_resource/content/1/Aula%20Bruno.pdf)>.

SIMONCINI, João Batista Villas Boas *et al.* Produzir para viver ou viver para produzir: conflitos vividos pelos produtores familiares e as estratégias de resistência no território do queijo Canastra. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria**, 2017.

SOBUR, MD. A. *et al.* Antibiotic-resistant Escherichia coli and Salmonella spp. associated with dairy cattle and farm environment having public health significance. **Veterinary World**, v. 12, n. 7, p. 984–993, jul. 2019.

STEINBERG, R. S. *et al.* Changes in bovine milk bacterial microbiome from healthy and subclinical mastitis affected animals of the Girolando, Gyr, Guzera, and Holstein breeds. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 803–815, nov. 2022.

STEINBERG, R. S. Caracterização da microbiota da glândula mamária bovina saudável e com mastite subclínica e seleção de bactérias potencialmente probióticas isoladas deste ecossistema. **Dissertação (Mestrado) da Universidade Federal de Minas Gerais**, 2016.

SUN, L. *et al.* Milking system and premilking routines have a strong effect on the microbial community in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 1, p. 123–139, 1 jan. 2022.

SUN, Y. *et al.* Probiotic *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Probio-M8 improves the fermentation and probiotic properties of fermented milk. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 9, p. 6643–6657, 31 maio 2024.

TARAZI, M. Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia . **Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo**, 2010.

TAUCH, A.; SANDBOTE, J. The Family Corynebacteriaceae. **The Prokaryotes**, p. 239–277, 2014.

TAYE, Y. *et al.* Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 1–6, 10 ago. 2021.

TETILI, F. *et al.* Anti-Staphylococcal Enterotoxinogenesis of *Lactococcus lactis* in Algerian Raw Milk Cheese. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, 2017.

TSIRIGOTI, E. *et al.* Comparative qualitative and quantitative analysis of lactic acid bacteria by molecular methods in different Greek cheeses. **Journal of Dairy Research**, v. 89, n. 4, p. 449–452, nov. 2022.

VAN, P. J. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed. Ithaca: **Cornell University Press**, 1994.

VIANA. **Pecuária 4.0: como a tecnologia pode melhorar os seus resultados**. Disponível em: <<https://blog.esteiogestao.com.br/pecuaria-4-0-como-a-tecnologia-pode-melhorar-os-seus-resultados/>>. Acesso em: 22 jul. 2024.

VILELA, D. *et al.* A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**, v. 26, n. 1, p. 5–24, 8 set. 2017.

VILELA, Duarte. A importância econômica, social e nutricional do leite. **Revista Batavo**, v. 3, n. 111, p. 17-18, 2001.

VON NEUBECK, M. *et al.* Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 57–65, 15 out. 2015.

VRIES, H. *et al.* Isolation and characterization of Sphingomonadaceae from fouled membranes. **NPJ bofilms and microbiomes**, 2019.

WAIGI, M. G. *et al.* Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 333–349, 1 out. 2015.

WALD, R. *et al.* Comparison of the population structure of *Streptococcus uberis* mastitis isolates from Austrian small-scale dairy farms and a Slovakian large-scale farm. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1820–1830, fev. 2020.

WANG, Y. *et al.* AC-PCoA: Adjustment for confounding factors using principal coordinate analysis. **Computational Biology**, v. 18, n. 7, 13 jul. 2022a.

WANG, Y. *et al.* Discrepancies among healthy, subclinical mastitic, and clinical mastitic cows in fecal microbiome and metabolome and serum metabolome. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 9, p. 7668–7688, set. 2022b.

WENTE, N. *et al.* Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 9360–9369, out. 2019.

XU, R. *et al.* Residents or Tourists: Is the Lactating Mammary Gland Colonized by Residential Microbiota? **Microorganisms**, v. 12, n. 5, p. 1009–1009, 17 maio 2024.

YOON, S.; LEE, Y. J. Molecular Characteristics of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Bulk Tank Milk in Korea. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 661, 2 mar. 2021.

YOUNG, W. *et al.* Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v. 3, p. e888–e888, 23 abr. 2015.

ZALEWSKA, B.; KAEVSKA, M.; SLANA, I. Sequence Analysis of Changes in Microbial Composition in Different Milk Products During Fermentation and Storage. **Current Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 202–205, 24 out. 2017.

ZHANG, S. *et al.* Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 108, 28 maio 2021.

ZHANG, W. *et al.* Comprehensive Assessment of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing for Microbiome Profiling across Multiple Habitats. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, 15 jun. 2023.

ZIRONI, E. *et al.* Determination of vitamin B12 in dairy products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Italian Journal of Food Safety**, v. 3, n. 4, 18 dez. 2014.