

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS**

**Microbiologia do leite de ovelha e queijos produzidos no sul do brasil: um
estudo sobre a microbiota, qualidade microbiológica e resistência a
antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados**

CRECIANA MARIA ENDRES

**PORTO ALEGRE
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS**

Microbiologia do leite de ovelha e queijos produzidos no sul do brasil: um estudo sobre a microbiota, qualidade microbiológica e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados

CRECIANA MARIA ENDRES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Coorientador: Profa. Dra. Fabiana Quoos Mayer

PORTO ALEGRE

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Endres, Creciana Maria

Microbiologia do leite de ovelha e queijos produzidos no sul do Brasil: um estudo sobre a microbiota, qualidade microbiológica e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados / Creciana Maria Endres. -- 2022.

100 f.

Orientadora: Jeverson Frazzon.

Coorientadora: Fabiana Quoos Mayer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Microbiota. 2. Gene 16SrRNA. 3. sequenciamento de alto desempenho. 4. genes de resistência. 5. leite e queijos de ovelha. I. Frazzon, Jeverson, orient. II. Mayer, Fabiana Quoos, coorient. III. Título.

Ao meu esposo Ederson Cleiton Justino e
minha filha Ellen Maria Justino, que me apoiaram muito
durante toda a jornada.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a Deus, por me abençoar e me dar sabedoria para realização do doutorado. Posso dizer que foi a realização de um sonho.

Ao meu esposo que é quase um coautor da tese, você me apoiou tanto, meu amor, que não tenho palavras para agradecer. Quando iniciei o doutorado nossa filha tinha 4 meses e você a cuidou de forma intensa e extraordinária.

À minha menininha que foi o motivo pelo qual fiz cada viagem de Chapecó a Porto Alegre, tudo foi por você e para você.

Aos meus familiares, pais, irmãos, sogra, sogro, que até hoje acreditam que eu sou louca e tenho certeza que ainda não entendem muitas das escolhas que fiz.

Ao meu orientador Jeverson e minha coorientadora Fabi, que contribuíram sim para a realização do trabalho, mas que fizeram e oportunizaram o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Sou muito grata a vocês que são muito mais que professores, são amigos queridos que me ensinaram muito. Vou sempre levar esse carinho comigo por onde eu estiver, e a cada aluno em que eu orientar na minha vida profissional, quero seguir o exemplo de vocês.

À Michele Mann, que fez tantos desenhos me explicando as reações e contribuiu muito para a realização do trabalho e para o meu aprendizado, muito obrigada minha amiga.

A toda a equipe do laboratório, Ícaro, Laura, Alessandra, Katiane, Letícia, Tais por todos os conhecimentos transmitidos, pela compreensão, por todo o carinho! E sobretudo pela amizade!

Ao UniSENAI pela continuidade.

Por último não menos importante quero agradecer à minha amiga Maristela, que um certo dia me disse “ Creci você poderia fazer um doutorado, que tal a UFRGS em Porto Alegre”

Isto é também por vocês!

Um enorme obrigada!

“Não abandone a sabedoria, e ela o protegerá; ame-a, e ela cuidará de você”.

Provérbios 4:6, Bíblia, Nova Versão Internacional

RESUMO

O leite de ovelha e o queijo, vêm se destacando como uma importante atividade agropecuária no Brasil. Estes apresentam valor agregado e benefícios à saúde. O queijo apresenta uma microbiota própria, relacionada a qualidade do leite. A presença de microrganismos pode ser responsável pela deterioração e causa de infecções alimentares. O presente estudo teve por objetivo avaliar a diversidade microbiana presente em amostras de leite cru de ovelha e dos queijos produzidos na região sul do Brasil, assim como a qualidade microbiológica e presença de microrganismos resistentes a antimicrobianos beta-lactâmicos, rifamicinas, oxazolidinonas, sulfonamidas, macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, nitrofuranos, anfenicóis e lincosamidas. As amostras de leite cru foram coletadas em três fazendas distintas (n = 5 cada fazenda) e amostras de quatro tipos de queijo – tipo-feta, frescal, colonial e tipo pecorino, (n = 5 cada) - foram obtidas em fazendas e/ou adquiridas no comércio local. Para a análise da microbiota, o DNA das amostras foi extraído e a região V4 do gene *16S rRNA* foi amplificada por PCR. Após, as amostras foram submetidas ao sequenciamento de alto desempenho no equipamento MiSeq da Illumina. A qualidade microbiológica e a análise de enterotoxinas foram determinadas pelos métodos petrifilm e VIDAS SET2, respectivamente. Foi realizado o isolamento de *Staphylococcus* spp., que foram avaliados quanto à suscetibilidade antimicrobiana e a presença de genes de resistência *tet(L)*, *su1*, *su2*, *ermB*, *tetM*, GN, *tetW* e *strA*. Os resultados do sequenciamento mostraram 501 Variantes de Sequências de Amplicons (ASV), sendo 429 ASV correspondentes a amostras de leite e 72 ASV para as amostras de queijo. Os índices de Chao1 e Shannon mostraram que a diversidade bacteriana nas amostras de queijos foi inferior às amostras de leites. As amostras de leites mostraram a presença de 87 gêneros, incluindo *Phyllobacterium* spp. (42,59%), *Staphylococcus* spp. (29,20%), *Pseudomonas* spp. (10,96%), *Lactococcus* spp. (5,10%) e *Acinetobacter* spp. (1,38%). Nas amostras de queijos, os gêneros mais abundantes foram os *Streptococcus* spp. (73,15%), *Lactobacillus* spp. (19,91%), *Lactococcus* spp. (2,46%) e *Staphylococcus* spp. (1,74%). A análise de beta diversidade mostrou que houve diferenças significativas na estrutura das comunidades microbianas entre as amostras de leite e queijos. Com relação ao estudo de segurança dos alimentos, foi possível observar uma maior contagem de microrganismos nas amostras de leite de ovelha cru do que no queijo. Em relação a ocorrência de enterotoxinas foi observada em uma amostra de leite. Foram obtidos 39 isolados de *Staphylococcus* spp. (15 em queijo e 24 em leite de ovelha cru). Em 12,5% de leite de ovelha cru foi identificado *S. aureus* e outras espécies foram

identificadas: *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. lentus*, *S. pseudintermedius*, *S. chromogenes* e *S. warneri*. Com relação ao perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos, 90% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano avaliado, e a multirresistência foi detectada em cepas de *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *Staphylococcus* coagulase negativa. Quanto aos genes de resistência, 82% dos isolados carregavam o gene *tetM*, 59% o *ermB*, 36% o *strA*, 28% o *tetL*, 23% o gene *su1* e 3% GN e *su2*. O gene *tetW* não foi detectado em nenhum isolado. Esses achados impactam a indústria de laticínios, representando um risco à saúde pública. Os resultados podem auxiliar na estruturação de estratégias que garantam a qualidade e segurança dos produtos, servindo de base para a criação de legislação específica para leites de ovelha e queijos produzidos no Brasil.

Palavras-chaves: Microbiota, Gene *16SrRNA*, sequenciamento de alto desempenho, genes de resistência.

ABSTRACT

Sheep's milk and cheese have been highlighted as an important agricultural activity in Brazil. These have added value and health benefits. Since cheese has its own microbiota, which is related to milk quality. Nonetheless, the presence of microorganisms responsible for spoilage and food infections must be investigated. Thus, the present study aimed to evaluate the microbial diversity present in samples of raw sheep milk and cheese produced in southern Brazil, as well as the microbiological quality. Presence of microorganisms resistant to antimicrobials as beta-lactam, rifampicins, oxazolidinones, sulfonamides, macrolides, fluoroquinolones, tetracyclines, nitrofurans, amphenicols and lincosamides. In addition, the isolation of species of *Staphylococcus* spp. Raw milk samples were collected from three different farms (n = 5 each farm) and samples of four types of cheese - feta-type, fresh, colonial and pecorino-type, (n = 5 each) - were obtained from farms and/or or purchased from local businesses. For the analysis of the microbiota, the DNA of the samples was extracted and the V4 region of the *16S rRNA* gene was amplified by PCR. Afterwards, the samples were submitted to high-performance sequencing in the MiSeq equipment from Illumina. Microbiological quality and enterotoxin analysis were determined by the petrifilm and VIDAS *SET2* methods, respectively. *Staphylococcus* spp. was isolated and evaluated for antimicrobial susceptibility and the presence of resistance genes *tet(L)*, *sul1*, *sul2*, *ermB*, *tetM*, *GN*, *tetW* and *strA*. The sequencing results showed 501 Amplicon Sequence Variants (ASV), with 429 ASV corresponding to milk samples and 72 ASV to cheese samples. The Chao1 and Shannon indices showed that bacterial diversity in cheese samples was lower than in milk samples. Milk samples showed the presence of 87 genera, including *Phyllobacterium* spp. (42.59%), *Staphylococcus* spp. (29.20%), *Pseudomonas* spp. (10.96%), *Lactococcus* spp. (5.10%) and *Acinetobacter* spp. (1.38%). In cheese samples, the most abundant genera were *Streptococcus* spp. (73.15%), *Lactobacillus* spp. (19.91%), *Lactococcus* spp. (2.46%) and *Staphylococcus* spp. (1.74%). Beta diversity analysis showed that there were significant differences in the structure of microbial communities between milk and cheese samples. With regard to the food safety study, it was possible to observe a higher count of microorganisms in samples of raw sheep's milk than in cheese. Regarding the occurrence of enterotoxins, it was observed in a milk sample. 39 isolates of *Staphylococcus* spp. (15 in cheese and 24 in raw sheep's milk). In 12.5% of raw sheep milk, *S. aureus* was identified and other species were identified: *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. lentus*, *S. pseudintermedius*, *S. chromogenes* and *S. warneri*. Regarding the phenotypic profile of antimicrobial resistance, 90% of the isolates showed resistance to at least one antimicrobial agent evaluated, and multidrug

resistance was detected in strains of *S. aureus*, *S. pseudintermedius* and *Staphylococcus* coagulase-negative. For the resistance genes, 82% of the isolates carried out the *tetM* gene, 59% the *ermB*, 36% the *strA*, 28% the *tetL*, 23% the *sul1* gene and 3% *GN* and *sul2*. The *tetW* gene was not detected in any isolate. These findings impact the dairy industry, which poses a risk to public health. The results contribute to the structuring of strategies that guarantee product quality and safety. Furthermore, these data can serve as a basis for the elaboration of specific legislation for both sheep's milk and cheese produced in Brazil..

Keywords: Raw Sheep's milk, Cheeses, Microbiota, *16SrRNA* gene, high throughput sequencing, *Staphylococcus* spp., resistance genes, antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1. Fontes de microrganismos em leites e queijos.....	18
Tabela 1. Distribuição dos rebanhos de ovinos leiteiros situados nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul	13
Tabela 2. Composição centesimal média de leites de diferentes espécies	13
Tabela 3. Tipos de queijos, período de maturação, percentual de umidade e culturas iniciadoras utilizadas no processo de fabricação	15

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Ovinocultura leiteira.....	12
2.1.2 Legislação para produtos lácteos de ovelha	16
2.2 Diversidade das comunidades microbianas.....	17
2.3 <i>Staphylococcus</i> em alimentos e enterotoxinas	21
2.4 Resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	24
2.4.1 Biologia da resistência aos antimicrobianos.....	24
2.4.2 Resistência Natural	27
2.4.3 Resistência Adquirida.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Capítulo I.....	31
4.2 Capítulo II.....	51
5. DISCUSSÃO.....	51
5.1 Segurança microbiológica das amostras	80
5.2 Enterotoxinas estafilocócicas	81
5.3 Microbiota dos leites e queijos.....	82
5.4 Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i>	85
5.5 Susceptibilidade antimicrobiana e genes de resistência	86
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

Na quarta posição no ranking mundial, a produção de leite de ovelha no mundo gira em torno de 11 milhões de litros/ano. Destacam-se como os maiores produtores desta matéria prima os países como China, a Turquia e a Grécia com uma tradição milenar tanto no consumo do leite como do seu principal derivado, o queijo. No Brasil, a ovinocultura leiteira é uma atividade do agronegócio que vem apresentando um crescimento real nos últimos anos (GUIMARÃES *et al.*, 2022). Entretanto, nossa produção de leite ovino e derivados ainda é pequena quando comparada com os países do leste europeu (BONFIN; DA SILVA, 2017).

No Brasil as fazendas de produção de leite ovino são de pequeno ou médio porte, o que dificulta a produção em larga escala (TRIBST *et al.*, 2020). Além disso, há desafios na produção de leite de ovelha, como a sazonalidade da produção, o curto período de lactação e a baixa produtividade geral dos animais. Entre os Estados brasileiros, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais têm iniciativas para produção de leite de ovelha (SANTOS, 2016). Esse leite é utilizado na produção de queijos, ricota, iogurtes, doce de leite e sorvetes tanto em laticínios com registro nos Sistemas de Inspeção Federal, Estadual e Municipal, como em produções artesanais (PENNA, 2011).

O principal derivado do leite de ovelha é o queijo, cuja qualidade é associada ao leite utilizado em sua fabricação, às técnicas empregadas pelos manipuladores e ao uso de culturas iniciadoras na fabricação. A composição microbiana do leite associada às culturas iniciadoras influencia as características sensoriais do queijo (TILOCCA *et al.*, 2020). Além disso, a microbiota do leite é influenciada pela saúde do animal, alimentação, técnicas de ordenha e pela higienização adequada dos equipamentos e utensílios utilizados (ESTEBAN-BLANCO *et al.*, 2019).

O leite de ovelha apresenta uma microbiota diversificada e abundante. Isso ocorre porque apresenta alta atividade de água (0,85 a 0,89), pH próximo ao neutro (6,3 a 6,5) e diversos nutrientes como carboidratos, vitaminas, sais minerais (PINTO; LANDGRAF; FRANCO, 2019). Esses componentes favorecem o desenvolvimento de microrganismos desejáveis para a fabricação de derivados (MONTEL *et al.*, 2014).

A caracterização da microbiota de leites e de queijos é de extrema importância, para avaliação e definição da identidade do produto. Além de que, os microrganismos possuem importantes funções na qualidade do queijo, associados a características

sensoriais, definindo características únicas do produto. No entanto, alguns grupos de microrganismos contaminantes podem causar problemas de deterioração, defeitos e comprometer a inocuidade do produto (FERREIRA, 2021). Com isso surge a necessidade de avaliar a microbiota e a presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos.

A microbiota patogênica pode ser adquirida por contaminação cruzada após ordenha ou até mesmo antes disso, em decorrência de doenças no animal, como é o caso da mastite (BARREIRA, 2008).

Diante disso, a caracterização e a compreensão da microbiota dos leites e queijos, assim como a qualidade microbiológica tendo em consideração a resistência bacteriana a antimicrobianos, podem trazer respostas importantes para o melhor entendimento das comunidades microbianas, bem como sua importância para a saúde humana e para os processos tecnológicos. Desse modo, os objetivos foram avaliar a matéria prima utilizada, os queijos e seus diferentes períodos de maturação, produzidos a partir de leite pasteurizado e acrescidos de culturas iniciadoras, em diferentes regiões permite elucidar dados ainda inexistentes na literatura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ovinocultura leiteira

A ovinocultura leiteira é uma atividade crescente no Brasil e apresenta ascensão econômica, destacando-se como uma alternativa para agricultura familiar e indústria (MONTEIRO, et al. 2021). Nesse contexto, é possível observar grande interesse pela produção de leite de ovelha e seus derivados (JUNIOR *et al.*, 2015). Segundo Silva (2014), a produção mundial de leite de ovelha é de aproximadamente 11 milhões de litros por ano, sendo os continentes asiático e europeu os de maior produção.

Acredita-se que a importação de ovelhas para produção de leite tenha ocorrido na década de 1990, sendo a raça francesa Lacaune a primeira a chegar no Brasil (SANTOS, 2016). Estima-se que em 2019, o rebanho ovino brasileiro era representado por um total de 19,7 milhões de animais (MAGALHAES *et al.*, 2020), sendo a maior parte destinada à produção de lã e carne; a produção de leite de ovelha corresponde a somente 0,002% do total de leite produzido no país. No Brasil, o Estado do Rio Grande do Sul foi pioneiro na produção de leite de ovelha, enquanto Santa Catarina é o Estado com maior produção (BIANCHI, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos rebanhos de ovinos leiteiros situados nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul

Estado	Produtores	Rebanho (Matrizes)	Laticínios	Produção Anual de leite (L)
RS	7	2.000	4	270.000
SC	4	2.400	3	315.000
Total	11	4.400	7	585.000

Fonte: Adaptado de Bianchi, 2017.

O leite ovino apresenta alta concentração de macronutrientes e micronutrientes que podem favorecer o desenvolvimento microbiano. A composição química do leite de ovelha é a principal característica para a utilização dessa matéria prima, pois é fonte de cálcio, fósforo e lipídios (HALMENSCHLAGER, 2020). Além disso, o leite de ovelha apresenta alto teor de gordura promovendo bom rendimento na produção de queijos. Enquanto o leite bovino apresenta 10% de rendimento na fabricação de queijos, o leite ovino rende aproximadamente 25% (MAUS *et al.*, 2020). O teor de proteínas é 40% maior que o leite de vaca ou cabra e o teor de gordura é duas vezes maior que os demais leites (FAION, 2015). Quando comparado com a composição do leite das diferentes espécies, o leite ovino apresenta uma diferenciação maior em relação às concentrações de sólidos totais, gordura e proteínas (Tabela 2).

Tabela 2. Composição centesimal média de leites de diferentes espécies

Componentes (%)	Cabra	Ovelha	Vaca
Gordura	3,8	7,9	3,6
Sólidos não gordurosos	8,9	12,0	9,0
Lactose	4,1	4,9	4,7
Proteína	3,4	6,2	3,2
Caseína	2,4	4,2	2,6
Albumina/Globulina	0,6	0,8	0,2
Nitrogênio não proteico	0,4	0,8	0,2
Resíduo Mineral Fixo	0,8	0,9	0,7
Energia (Kcal/100 mL)	70	105	69

Fonte: Adaptado de Junior, *et al* 2015.

Cada componente presente no leite tem influência direta na produção de derivados e características organolépticas do produto. De acordo com a Tabela 2, o leite de ovelha apresenta elevado valor nutricional, sendo muito utilizado para a produção, principalmente, de queijos e iogurtes. Além disso, a gordura presente no leite de ovelha não contém caroteno, proporcionando um queijo com brancura típica (RIBEIRO *et al.*, 2007). Devido a essas características, é importante entender alguns pontos críticos da produção de leite ovino, como a logística utilizada pelos produtores que comercializam o leite para outros estabelecimentos muitas vezes distantes da propriedade.

Alguns produtores de maior porte, que estão localizados perto dos laticínios, realizam a estocagem do leite e o transporte do mesmo sob refrigeração (2 °C a 4 °C), no período máximo de até 48 horas após a ordenha. Enquanto isso, a maior parte são produtores menores, ou que estão distantes do laticínio, apresentando uma dificuldade maior para a realização do armazenamento e transporte. Esses produtores congelam o leite, e, apenas quando há um volume considerável, ocorre o transporte. Diferente do leite bovino, o leite de ovelha pode ser submetido ao congelamento antes da produção de queijos, em função das suas características físico-químicas. No entanto, essa prática eleva a perda de rendimento que varia de 3% a 5% (BIANCHI, 2017). Os produtores de leite ovino seguem a legislação Instrução Normativa MAPA 77 (MAPA, 2018) para leite de vaca pois não existe uma legislação específica no Brasil.

No Brasil, a produção de derivados de leite de ovelha em escala industrial, ocorre no Centro-Sul do Rio de Janeiro, Sul de Minas Gerais e Oeste de Santa Catarina (NESPOLO, C. R.; BIANCHI, A. E.; QUEIRÓS, A. A.; FATINATTI, 2012). As principais iniciativas são para produção de queijos, mas outros produtos como ricota, iogurtes, doce de leite, sorvetes e leite em pó também podem ser produzidos. Essa produção atende um público específico, que busca um produto com elevado valor nutricional (ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, 2011)). Produtos como queijos e iogurte representam 60% da renda dos produtores de leite ovino (FAION, 2015). No processo de fabricação de queijos de ovelha, a coalhada formada apresenta consistência mais firme e mais elástica do que a obtida no processo de fabricação de queijo de leite de vaca, devido aos teores de gordura e proteínas (MACEDO, 2018).

Os queijos frescal, colonial, tipo feta e tipo pecorino são exemplos de queijos produzidos a partir de leite de ovelha. É importante salientar que cada queijo apresenta característica específica e estima-se que o rendimento industrial na produção de queijo de ovelha atinja 18% a 25%, sendo necessário em torno de 4 a 5 litros de leite de ovelha para a produção de 1 kg de queijo (FAION, 2015). Assim, o custo estimado de produção de 1 kg de queijo de ovelha é de U\$ 8,00, comparado a U\$ 5,00 para queijo de cabra e U\$ 3,00 para o queijo produzido com leite de vaca (PENNA, 2011). Muitos dos queijos

produzidos a partir do leite de ovelha são produzidos com leite cru. A Instrução Normativa nº 30, de 2013 prevê a comercialização de queijos elaborados com leite cru apenas após maturação mínima de 60 dias. Portanto, com período de maturação inferior a 60 dias, o leite deve ser pasteurizado (BRASIL, 2013).

Os queijos são frescos possuem massa fina e delicada, sabor suave, levemente ácido e assemelhando-se ao sabor típico do leite de ovelha como é o caso do queijo Frescal. Esses queijos são brandos e apresentam teor de umidade relativamente alto (55% a 65%), sendo maturados ou não, com acidez um pouco mais acentuada (SILVA, 2014). O queijo colonial apresenta cor amarelada, semidura, de consistência elástica, crosta fina, proporcionando um odor ligeiramente ácido, enquanto o tipo Pecorino apresenta textura mais firme. Segundo Penna (2011), o queijo Pecorino apresenta características muito variáveis em função da fazenda produtora e da estação do ano (Tabela 3). São observados valores médios de 18,5% de gordura; 24,7% de proteína; e 48,8% nesse tipo de queijo, com um rendimento aproximado de 17,44%, com grandes variações entre os meses mais quentes e mais frios do ano. De acordo com Pellegrini (2012), os queijos Pecorino Frescal, Labneh e Feta, apresentam 24,6, 19,45 e 15,99% de proteína, 35,83, 27,31 e 18,81% de gordura, 33,62, 44,93 e 38,33% de umidade e 4,15, 5,12 e 1,04% de cinzas, respectivamente.

Tabela 3. Tipos de queijos, período de maturação, percentual de umidade e culturas iniciadoras utilizadas no processo de fabricação

Tipo de Queijos	Maturação (Dias)	Umidade (%)	Culturas Iniciadoras
Tipo Feta	0	45,9	<i>Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus e lactobacillus casei</i>
Colonial	20	38,3	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Frescal	0	44,6	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Tipo Pecorino	45	35,9	<i>Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus e lactobacillus casei</i>

O leite é um alimento com boas características nutricionais, o que propicia o crescimento e desenvolvimento de vários microrganismos que poderão impactar diretamente na qualidade e vida útil do produto e, por consequência, na fabricação dos diversos produtos lácteos derivados (PORCELLATO *et al.*, 2018). O leite é considerado de boa qualidade quando apresenta características nutricionais satisfatórias, baixa carga microbiana, ausência de contaminantes e agentes patogênicos (GUERREIRO *et*

al., 2005). Assim, a identificação das comunidades microbianas presentes no leite de ovelha é importante para conhecer as características desse produto, assim como garantir a segurança deste alimento e seus derivados.

2.1.2 Legislação para produtos lácteos de ovelha

Até o presente momento não há uma legislação específica para leite ovino e seus derivados no Brasil. Devido a isso há dificuldade em adequar esses produtos a algum sistema de inspeção como é o caso do SIF (Sistema de Inspeção Federal), SISBI (Sistema Brasileiro de Inspeção), SIE (Sistema de Inspeção Estadual). No início da década de 1950, surgiram as primeiras discussões sobre as regras para produção e comercialização de leite de ovelha (JUNIOR et al., 2015). Porém, devido ao baixo volume de produção, a legislação era inespecífica conforme descreve o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, Decreto nº 9.013, de 2017, em seus artigos 480 e 481, respectivamente, *“A produção de leite das espécies caprina, ovina e outras, fica sujeita às mesmas determinações do presente Regulamento, satisfeitas as exigências para sua identificação. A composição média ao leite das espécies caprina, ovina e outras, bem como as condições de sua obtenção; serão determinadas quando houver produção intensiva desse produto”* (BRASIL, 2017).

Para a avaliação da qualidade do leite, devem-se seguir os requisitos definidos pela Instrução Normativa 76/2018 (BRASIL, 2018) que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado. Já os produtos fabricados a partir do leite de ovelha são registrados pela Divisão de Inspeção de Leite e Derivados (DILEI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com base em literatura científica e outras publicações, devido à inexistência de Regulamento Técnico específico.

Em 07 de março de 1996, foi estabelecida a Portaria nº 146, elaborada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, essa define o Regulamento Técnico de Identidade de Queijos. Segundo a portaria, queijo é definido como sendo, *“o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”* (BRASIL, 1996). Os produtores de leite e derivados de ovelha seguem as legislações publicadas para leite de vaca, porém se sabe que as características destes

produtos são diferentes, sendo necessária a criação de legislações específicas para produtos de origem ovina.

Para elucidar as características e qualidade dos produtos de origem ovina, possibilitando a criação de legislações específicas, é fundamental compreender a composição microbiana presente no leite ovino e nos seus derivados. A microbiota presente nos alimentos, especialmente em produtos lácteos é fundamental na determinação de suas propriedades organolépticas e outras propriedades físico-químicas, além de promover o bem-estar do consumidor. Entender as várias contribuições, positivas e/ou negativas, desses microrganismos presentes no leite e seus derivados é importante.

2.2 Diversidade das comunidades microbianas no leite e queijo de ovelha

Os microrganismos podem ser provenientes do solo, da água, do ar, utensílios, seres humanos e animais que podem auxiliar de forma benéfica ou maléfica a produção de alimentos. Os microrganismos podem ser considerados como deteriorantes sendo responsáveis pela deterioração e diminuição da vida útil do produto; patogênicos, quando podem causar doenças, sendo responsáveis pela grande maioria das infecções alimentares. Há também os microrganismos fermentadores que são chamados de úteis industrialmente, utilizados nos processos de fabricação de alimentos responsáveis pelas características organolépticas do produto, bem como em alguns casos propriedades probióticas (AZEREDO; ET AL., 2012).

A composição microbiológica dos ambientes, sejam eles humanos, animais, insetos, alimentos, é denominada como microbiota. A composição desses microrganismos nestes ambientes é importante, pois estes estão envolvidos em vias metabólicas, modificando-as a ponto de influenciar, inclusive, alguns padrões comportamentais do hospedeiro. Além disso, podem atribuir sabores e aromas aos alimentos e mesmo configurar o alimento como um probiótico. Ao longo da vida, a composição e, conseqüentemente, o funcionamento da microbiota, pode sofrer influências de diferentes fatores: ambiente, manipulação dos alimentos, uso de antimicrobianos na produção animal, doenças, entre outros (BORTOLUZZI; MENEZES, 2014).

Recentemente, a microbiota do leite vem sendo explorada, sendo que dentre os objetivos dos estudos já realizados era obter informações dos microrganismos presentes, bem como a associação desses com a glândula mamária do animal. A microbiota do leite já foi investigada em mulheres, vacas, e em menor quantidade em outros mamíferos como cabras, burros, ovelhas, veados, renas entre outros (OIKONOMOU *et al.*, 2020).

Apesar do avanço em estudo sobre a microbiota do leite de ruminantes, o leite bovino é o mais estudado, sendo escassos os estudos sobre leite e derivados de outras espécies, como ovinos. Nos países desenvolvidos o leite ovino é considerado uma alternativa mais saudável que o leite de vaca por apresentar melhores propriedades nutricionais, além de ser uma alternativa de consumo para quem apresenta alergia à proteína do leite de vaca (MCDERMOTT *et al.*, 2010).

Por muito tempo, acreditava-se que a glândula mamária e o leite eram estéreis, ou seja, não apresentavam nenhum tipo de microrganismo, e que a maior parte da microbiota presente no leite era resultado da contaminação externa (YOUNG *et al.*, 2015). Assim, o interesse pela compreensão da microbiota presente no leite e seus derivados tem crescido significativamente nas últimas décadas. A Figura 1 apresenta as fontes de interferência da composição microbiana tanto do leite, quanto dos queijos.

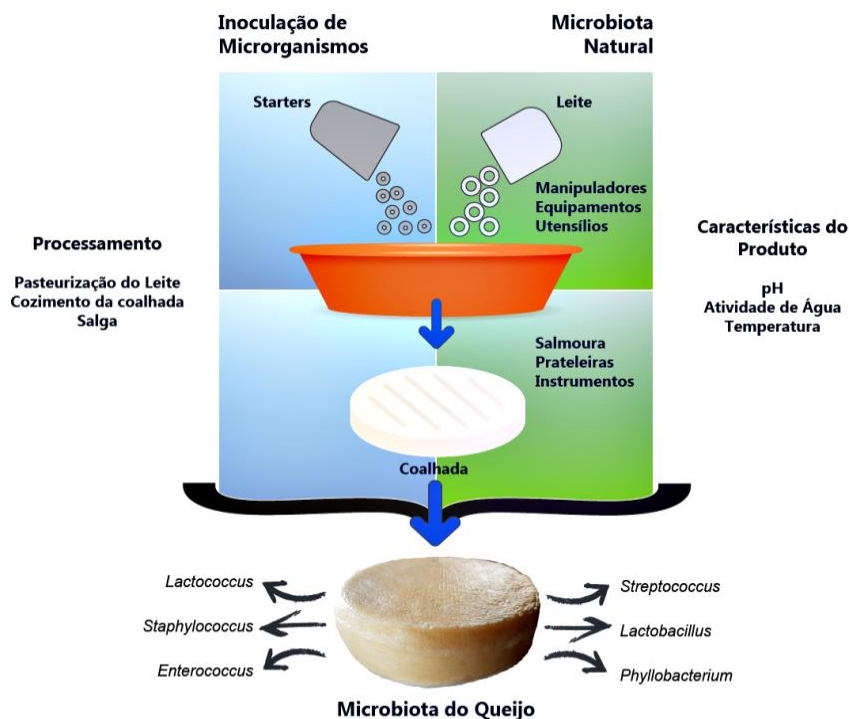


Figura 1. Fontes de microrganismos em leites e queijos

O leite apresenta uma microbiota típica, essa pode ser alterada pela saúde do animal, higiene de manipuladores, limpeza de equipamentos e utensílios. A microbiota dos queijos é influenciada pela qualidade da matéria prima, processo de higiene, processo de pasteurização, salga e maturação. A microbiota do leite cru e do queijo é abundante e composta principalmente por bactérias do ácido láctico (LAB), com os gêneros mais comuns sendo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Por ser um produto que permanece sob refrigeração até sua industrialização, algumas bactérias psicrotróficas podem estar presentes, como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* spp. (QUIGLEY *et al.*, 2013). Os queijos apresentam menor diversidade na microbiota, interferindo no processo de fabricação, tratamento térmico do leite, adição de culturas iniciadoras, os gêneros geralmente utilizados são *Lactobacillus* e *Streptococcus* (LI *et al.*, 2016).

O leite cru de ovelha apresenta naturalmente diversos microrganismos que podem contribuir de forma positiva para o organismo humano, como as bactérias lácticas, essas são gram-positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbias. Os principais gêneros são *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp., *Carnobacterium* spp., *Tetragenococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. e se classificam em homofermentativas e heterofermentativas. Esses grupos representam de 10% a 30% do total da contagem bacteriana do leite cru (KOCH, 2014). Ainda, cerca de 50% das bactérias lácticas são representadas pelo gênero *Enterococcus* spp., seguido por *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* (30%), *Lactococci* spp. (14%) e *Leuconostoc* spp. (8%), decorrentes diretamente do leite, ou do animal e ambiente (MEDINA *et al.*, 2011). Já a microbiota do queijo de vaca, cabra e ovelha é composta principalmente pelos gêneros *Lactococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Phylobacterium* spp., além de outros que podem ser encontrados dependendo do tipo de queijo e processos de fabricação. As principais fontes de contaminação por *Staphylococcus* spp., estão associadas aos animais, à manipulação humana, à qualidade da água, ao equipamento de ordenha e ao meio ambiente. Em animais esse microrganismo é o agente causador da mastite, especialmente em bovinos, ovinos e caprinos e isso o torna um contaminante comum do leite cru (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O uso das culturas iniciadoras, juntamente com as diferentes etapas de fabricação de queijos, como coagulação do leite, produção de ácido, aquecimento, salga e maturação, têm efeitos marcantes na composição microbiana, sendo que a principal vantagem das culturas iniciadoras, principalmente quando adicionadas em produtos

elaborados a partir de leite pasteurizado, é a maior segurança devido à rápida acidificação e maior uniformidade do produto final (RANDAZZO et al., 2002).

Estudos mostram que os microrganismos presentes no leite *in natura* são desejáveis para a produção de queijos, porém esporadicamente podem existir microrganismos patogênicos, que poderão causar doenças aos consumidores. Muitos microrganismos são utilizados como indicadores de higiene no processo. É o caso dos aeróbios mesófilos e os coliformes. Os mesófilos são todos os microrganismos capazes de se desenvolverem em temperaturas de 35 °C a 37 °C em condições de aerobiose, enquanto os coliformes são compostos pela família das Enterobacteriaceae que são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. As principais bactérias desse grupo são a *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia coli* (KOCH, 2014). Um grupo de microrganismo bastante relevante também é o *Staphylococcus aureus*, esse pode estar presente no leite cru, principalmente naquele proveniente de animais com mastite, porém quando encontrado em queijos sua contaminação se caracteriza basicamente pela contaminação posterior, que pode ser ocasionada pelo próprio manipulador. Pode-se afirmar isso pois a temperatura de pasteurização é suficiente para eliminar células viáveis dessas bactérias (ASSUMPÇÃO et al., 2003).

Várias espécies como *Corynebacterium casei*, *Microbacterium gubbeenense*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Arthrobacter bergerei*, *Agrococcus casei*, *Mycetocola reblochoni* e *Vibrio casei* parecem ser endêmicos em queijos e o ambiente da fabricação de queijos (BLEICHER; NEUHAUS; SCHERER, 2010; BORA et al., 2007; IRLINGER et al., 2005). Reservatórios ambientais como leite, úbere do animal, pele humana, salmoura, ambiente de maturação, vasos de madeira e prateleiras em que o queijo repousa durante o amadurecimento, apresentam uma diversidade microbiana, mas seu conteúdo de microrganismos permanece em grande parte não caracterizado (DIDIENNE et al., 2012; VERDIER-METZ et al., 2012). Comunidades microbianas de queijos e laticínios também representam em grande parte reservatórios inexplorados de diversidade genética e metabólica com potencial uso benéfico para a produção de alimentos fermentados. Muitas vezes no processo de fabricação de queijos são adicionadas culturas lácticas que apresentam um papel importante na produção de queijos, pois contribuem no desenvolvimento do sabor e textura. Além disso, algumas espécies produzem metabólitos que contribuem para a conservação dos queijos por meio da produção de bacteriocinas, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (BONFIN; DA SILVA, 2017).

Existem poucos estudos realizados com leite e queijo ovino no Brasil. Assim, é necessário avaliar a qualidade microbiológica do leite cru de ovelhas e dos queijos

produzidos, sendo os parâmetros potencialmente associados ao estágio de lactação, condições higiênicas de produção de leite, manejo e procedimentos de coleta. Dessa forma, é interessante conhecer os microrganismos presentes tanto no leite quanto nos queijos de ovelha, bem como conhecer as diferenças terminológicas utilizadas quando se fala da microbiologia desses produtos.

2.3 *Staphylococcus* em alimentos e enterotoxinas

O gênero *Staphylococcus* é composto por 85 espécies e 30 subespécies, pertencendo à família Staphylococcaceae (KOVAŘOVIC, 2022), sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais patogênica do gênero, podendo produzir mais de 30 fatores de virulência (KONEMAN et al., 2012). *Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, imóvel, não formador de esporos, sendo o terceiro microrganismo mais envolvido em doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil entre os anos de 2015 a 2019 (AMARAL et al., 2021).

Por apresentarem a característica de ubiquidade, espécies de *Staphylococcus* já foram descritas em vários tipos de alimentos, tanto de origem vegetal como de origem animal. Dentre os produtos de origem animal, destacam-se queijos (SILVA et al., 2021) e leite cru (ANGELIDIS et al., 2020). Em vegetais, já foi descrita a presença de *Staphylococcus*, incluindo vegetais minimamente processados, uma tendência de consumo pela praticidade que traz aos consumidores (OLAIMAt et al., 2021).

Segundo dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, alimentos manipulados após o cozimento, como carnes fatiadas, pudins, doces e sanduíches, apresentam maior risco de causarem intoxicação alimentar, sendo que alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. podem não apresentar nenhuma alteração organoléptica ou visual, tornando os consumidores mais vulneráveis à contaminação. Além de causar intoxicação alimentar, outro ponto discutido atualmente é a presença de estirpes resistentes a meticilina, denominados *Staphylococcus* resistentes a meticilina (MRSA), que estão presentes em animais de produção e conseqüentemente nos alimentos, o que pode agravar ainda mais o caso de intoxicações alimentares bem como disseminar a resistência aos antimicrobianos (EFSA, 2009).

Ainda, *Staphylococcus* spp. coloniza a pele, a mucosa nasofaríngea e, em menor grau, o trato gastrointestinal de humanos e animais, tornando o gênero um importante indicador de qualidade higiênica, pois manipuladores portadores podem contaminar os alimentos no processo de fabricação (LEROY et al., 2020). A condição de portador de *Staphylococcus* pode ser transitória ou permanente, estendendo-se até mesmo por anos. Condições que comprometam a integridade das defesas do hospedeiro, tais como

traumas, procedimentos invasivos ou infecções, fazem com que ocorra a manifestação do potencial de virulência das estirpes (FRANCO e LANDGRAFF, 2008).

Dentre os fatores de virulência, merece destaque a enzima coagulase, que inclusive diferencia o gênero em dois grandes grupos: estafilococos coagulase-negativa e estafilococos coagulase-positiva. Os estafilococos coagulase-positiva são estafilococos que produzem coagulase livre, enzima capaz de coagular plasma, sendo considerada um importante fator de virulência, onde a espécie *S. aureus* é a principal representante do grupo. Já o grupo de estafilococos coagulase-negativa são considerados não patogênicos, podendo ser utilizados como culturas iniciadoras na fabricação de alimentos fermentados e muito raramente são associados à produção de enterotoxinas estafilocócicas (FEITOSA et al., 2017; VERNOZY-ROZAND et al., 1996). Outro fator de virulência associado à produção de enterotoxinas é a enzima termonuclease, quase sempre presente em estirpes enterotoxigênicas (NETO et al., 2002).

A intoxicação alimentar por estafilococos é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns e ocorrem pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos por cepas enterotoxigênicas de estafilococos coagulase-positiva, sendo majoritariamente a espécie *S. aureus* identificada em surtos (HENNEKINNE et al., 2012).

Ainda, por causarem intoxicação alimentar, as enterotoxinas estafilocócicas são consideradas o fator mais importante ligado a patogenicidade do gênero *Staphylococcus*, presentes no leite e produtos lácteos, principalmente (AGUIAR et al., 2022). As enterotoxinas estafilocócicas consistem em uma superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas com base na homologia de sequência que combina atividades superantigênicas e eméticas, e seus pesos moleculares variam de 22 a 28 kDa (ARGUDÍN et al., 2010). São exotoxinas pirogênicas de baixo peso molecular que compartilham semelhanças funcionais (FOX et al., 2020). Além disso, são solúveis em água e soluções salinas, altamente estáveis e resistentes a condições ambientais que facilmente destruiriam a célula vegetativa produtora, sendo resistentes a enzimas proteolíticas (como por exemplo, tripsina, pepsina) e coagulantes (por exemplo, papaína, renina, quimotripsina), e valores de pH baixos, inclusive persistindo durante o processo de fabricação de alimentos, como queijos, bem como da acidez do trato gastrointestinal após a ingestão (ABOLGHAIT et al., 2020; LE LOIR e HENNEKINNE, 2014).

Atualmente, 26 enterotoxinas estafilocócicas já foram descritas (AGUIAR et al., 2022), sendo que as cinco enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por, aproximadamente, 95% dos casos e surtos de

intoxicação alimentar estafilocócica (AL-TARAZI et al., 2009; JOHLER e STEPHAN, 2010). Ainda, a enterotoxina estafilocócica A é reconhecida como a principal enterotoxina causadora de intoxicação alimentar em humanos no mundo (ARGUDÍN et al., 2010; HU e NAKANE, 2014). A enterotoxina B é conhecida por causar intoxicações com sintomas mais severos comparada com as demais enterotoxinas. O gene da enterotoxina C é frequentemente associado a estirpes de *S. aureus* oriundos de leite (ARGUDÍN et al., 2010; CARFORA et al., 2015; VALIHRACH et al., 2013). A enterotoxina D é reconhecida como a segunda enterotoxina estafilocócica mais comumente associada com intoxicação alimentar no mundo, sendo de grande importância, pois uma pequena dose infectante é capaz de induzir a intoxicação. A enterotoxina E também está associada a alguns casos de intoxicação alimentar, porém, com menor frequência (PINCHUK et al., 2010).

Em estudos realizados com isolados de *S. aureus* provenientes de leite, leite com mastite e produtos lácteos, existe grande diversidade nos tipos de enterotoxinas encontradas. Carfora et al. (2015) avaliaram isolados de *S. aureus* provenientes de leite e produtos lácteos, e encontraram prevalência do gene da enterotoxina C (28,6%), seguido pelos genes da enterotoxinas A e D (20%). Em estudo com isolados de leite de vacas com mastite, não houve presença de isolados portando os genes das enterotoxinas A, B e C (GÓMEZ et al., 2007).

Piechota et al. (2014) analisaram isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de vacas com e sem mastite, encontrando prevalência do gene da enterotoxina C em 70%, seguido pelas enterotoxinas D com 20% e B com 16,7%. Entre os isolados, poucos apresentaram os genes das enterotoxinas A e E. Os genes que codificam enterotoxinas foram identificados em 73,4% dos isolados de vacas com mastite e, em apenas 20% dos isolados de vacas sem mastite. Embora a presença de genes que codificam enterotoxinas não signifique necessariamente que elas serão produzidas, ela enfatiza o potencial da bactéria para desencadear a produção de enterotoxinas em condições ideais nos alimentos (SANTANA et al., 2010).

As principais causas da elevada incidência de intoxicação alimentar estafilocócica causadas por leite e derivados é a combinação inadequada de tempo x temperatura, a descontaminação ineficiente de superfícies e utensílios, a contaminação durante o preparo dos alimentos pelos manipuladores e a formação de biofilme. Uma vez que *Staphylococcus* spp. suporta diferentes condições de temperatura e pH e pode crescer em uma ampla variedade de alimentos, um alimento contaminado com isolados produtores de enterotoxinas estafilocócicas mantido sob temperaturas que permitam a rápida multiplicação da bactéria (refrigeração inadequada, por exemplo) é uma fonte comum de intoxicação (BHATIA e ZAHOOOR, 2007; PINCHUK et al., 2010). Outro fator

agravante é o fato de que determinadas condições ambientais que facilmente destroem os microrganismos produtores das enterotoxinas, como o calor, não inativam as enterotoxinas estafilocócicas (FRANCO e LANDGRAFF, 2008). É relevante mencionar que estirpes de *Staphylococcus* spp. não são capazes de sobreviver a temperaturas de pasteurização e esterilização durante o processamento de alimentos, no entanto, as enterotoxinas pré-formadas apresentam resistência a altas temperaturas, resistindo às estratégias usuais de controle térmico da indústria alimentícia, não sendo consideradas medidas de controle para intoxicação alimentar (MEDVEDOVÁ e VALÍK, 2012; ZIUZINA et al., 2018).

Ainda que não seja comum, outras espécies além de *S. aureus* podem produzir enterotoxinas estafilocócicas. Em estudo avaliando *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados, detectaram a ocorrência de *S. intermedius*, espécie pertencente ao grupo de estafilococos coagulase-positiva, em pasta de alho, servindo de alerta pois é um condimento muito utilizado na preparação de alimentos (NETO et al., 2002). Menos comum ainda, é a ocorrência de estafilococos coagulase-negativa produtores de enterotoxinas (PEREIRA et al., 2001).

Em um estudo avaliando amostras de leite cru e queijo artesanal, identificaram 58 isolados de estafilococos coagulase-positivo, sendo que nove deles (15,51%) carregavam pelo menos um dos genes das enterotoxinas clássicas investigadas. Dos 46 isolados de estafilococos coagulase-negativo, nenhum apresentou genes das enterotoxinas, justificando que este grupo de estafilococos dificilmente produz enterotoxinas (MELO et al., 2020).

Uma das medidas de controle e prevenção de casos e surtos de intoxicação alimentar, são as análises microbiológicas de alimentos. A legislação brasileira preconiza os parâmetros microbiológicos para leites e derivados, e para a contagem de estafilococos coagulase positiva, o limite aceitável é 10^3 UFC/g, sendo que para alguns produtos como doce de leite e leite pó o limite é 10^2 UFC/g. Para estafilococos coagulase positiva existe o parâmetro de contagem e não presença ou ausência pois só há produção de enterotoxinas a partir de uma concentração bacteriana de 10^5 - 10^6 UFC/g (ARGUDÍN et al., 2010). A legislação preconiza ainda a detecção de enterotoxinas estafilocócicas, onde os alimentos devem ter ausência, e o limite de detecção do método deve ser menor ou igual a 1 ng/g (BRASIL, 2019).

2.4 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

2.4.1 Biologia da resistência aos antimicrobianos

De acordo com critérios microbiológicos, uma bactéria é considerada resistente a um antimicrobiano quando apresenta capacidade de multiplicação *in vitro* em

concentrações maiores do princípio ativo em relação aos pontos de corte já estabelecidos para as cepas filogeneticamente relacionadas. Por outro lado, em relação aos critérios clínicos *in vivo*, um isolado é considerado resistente quando a terapia antimicrobiana instituída não resulta na sua eliminação (BLAHA, 2011; GUARDABASSI, 2010).

Em geral, a eficácia de um agente antimicrobiano tipicamente depende da expressão de genes de resistência de estirpes bacterianas, podendo ser influenciada pela exposição anterior ao antimicrobiano e pela pressão seletiva que o mesmo determina. O amplo uso de antimicrobianos na produção animal e no tratamento clínico de animais e seres humanos tem contribuído para o aumento de bactérias multirresistentes (quando apresentam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos) (EFSA, 2014), as quais possuem um diversificado acervo de determinantes genéticos que codificam resistência (BLAHA, 2011).

É importante salientar que os antimicrobianos não são agentes mutagênicos, e, portanto, não causam mutação em microrganismos. Os antimicrobianos exercem uma pressão seletiva e através do contato com os microrganismos, exercem sua atividade, causando a morte de bactérias suscetíveis e a manutenção das resistentes. Por isso, em ambientes hospitalares ou em ambientes com o uso recorrente de antimicrobianos, a disseminação de bactérias resistentes é favorecida fazendo com que prevaleçam na comunidade de uma forma geral, levando o aparecimento, inclusive, de cepas multirresistentes (LEVY; MARSHALL, 2004).

Cabe destacar, ainda, que a pressão seletiva é favorecida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto de uso terapêutico como profilático, humano ou veterinário, sendo este último utilizado inclusive no crescimento animal e com propósitos agrícolas, resultando na seleção e predominância de espécies cada vez mais resistentes (HUGHES, 2014; MORRISON e ZEMBOWER, 2020).

Devido ao amplo número de antimicrobianos e classes de antimicrobianos, são vários mecanismos bioquímicos que podem levar uma bactéria a se tornar resistente: produção de enzimas que modificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo; alteração do alvo; diminuição da permeabilidade à entrada do antibacteriano; síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano e expulsão do antibacteriano da célula (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

O mecanismo enzimático pode ser exemplificado pelas enzimas β -lactamases que destroem os antibióticos pertencentes a classe dos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, e enzimas modificadoras, que podem inativar cloranfenicol e aminoglicosídeos, como a estreptomicina e gentamicina. As bombas de efluxo conferem a expulsão do antimicrobiano do meio intracelular, mediando resistência à tetraciclina,

cloranfenicol e fluorquinolonas, por exemplo (MORRISON e ZEMBOWER, 2020). A alteração de permeabilidade é um mecanismo presente em bactérias Gram-negativas, onde estas apresentam porinas na membrana externa, local onde ocorre a difusão dos antimicrobianos, portanto, uma diminuição na função ou na quantidade das porinas confere resistência a alguns antimicrobianos, como aminoglicosídeos, fosfomicina e quinolonas (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008). O mecanismo de alteração do sítio de ação caracteriza-se pela diminuição, ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico pelo local de ligação no microrganismo, sendo este tipo de resistência observado em antimicrobianos β -lactâmicos e glicopeptídeos (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; RICE e BONOMO, 2005). Para o último caso, um exemplo é a resistência aos β -lactâmicos em MRSA, que é mediada pelo gene *mecA* não nativo, que codifica a proteína de ligação à penicilina modificada (PBP2a), que tem uma afinidade extremamente baixa por β -lactâmicos, fazendo com que não tenham efeito bactericida (BOONSIRI et al., 2020).

Embora os genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos contidos em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, normalmente codifiquem enzimas que inativam os antimicrobianos ou reduzem a permeabilidade das células, na resistência conferida por mutações cromossômicas geralmente o mecanismo de resistência envolve a modificação do alvo, não ocorrendo a ligação do antimicrobiano com a bactéria alvo (NEIHARDT, 2004).

No entanto, um mesmo tipo de mecanismo de resistência pode ser identificado por muitos genes diferentes, a exemplo das bombas de efluxo, que conferem resistência às tetraciclina, onde mais de 40 determinantes genéticos já foram descritos (ROBERTS e SCHWARZ, 2016). Além disso, mais do que um tipo de mecanismo pode proporcionar resistência ao mesmo antibiótico, sendo a resistência para tetraciclina ocorrendo tanto através de bombas de efluxo, como por proteínas de proteção ribossomal (CONNELL et al., 2003; GUILLAUME et al., 2004).

A resistência aos antimicrobianos tornou-se um risco para a sociedade, estando associada ao aumento das taxas de mortalidade e aos custos do tratamento (MORRISON e ZEMBOWER, 2020). Visto que a resistência bacteriana é resultante do uso incorreto e abusivo dos antimicrobianos e, considerando a escassez de novas moléculas no mercado, há necessidade de medidas de controle para evitar uma crise global na área da saúde e impedir a era pós-antibiótico, como utilização racional de antimicrobianos na saúde animal e humana, rigoroso controle de higienização e prevenção de infecções bem como a vigilância da resistência antimicrobiana (WHO, 2019).

De acordo com Trabulsi e Alterthum (2008), a resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana,

onde todas as amostras desta espécie têm esta propriedade. Na resistência adquirida, somente parte das amostras é resistente, sendo que a aquisição de resistência por uma célula bacteriana suscetível é sempre decorrente de uma alteração genética, através de mutações cromossômicas ou ainda pela aquisição de genes de resistência, por mecanismos como transdução, conjugação e transformação, que caracterizam a transferência horizontal de genes de resistência (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

2.4.2 Resistência Intrínseca

A resistência é uma característica intrínseca de um microrganismo, que ocorre sem a exposição prévia ao antimicrobiano (BAPTISTA, 2013). A resistência bacteriana intrínseca a determinados antimicrobianos deve-se a três possíveis razões: 1: ausência de um processo metabólico influenciável pelo antibiótico; 2: existência de enzimas que apresentam a capacidade de inativar o antibiótico; 3: presença de particularidades inerentes à morfologia bacteriana que favorecem a resistência para determinado antimicrobiano (TANAKA, 2017).

A resistência natural decorre de um fator inerente estrutural ou funcional associado com a espécie bacteriana, gênero ou grande grupo, portanto, está baseada em genes presentes no cromossomo que são transmitidos de forma vertical, de geração a geração, tipicamente não sendo transferíveis de forma horizontal, fato este que pode ocorrer na resistência adquirida (MORRISON e ZEMBOWER, 2020).

Na prática clínica de humanos e animais, para realizar a prescrição terapêutica antimicrobiana, é de fundamental importância conhecer as resistências intrínsecas do agente patogênico em questão, de modo a escolher o tratamento mais eficaz e adequado conforme o diagnóstico clínico (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008; ALMEIDA, 2020).

2.4.3 Resistência Adquirida

A aquisição de resistência a antimicrobianos é resultante de alterações genéticas no genoma bacteriano que ocorrem através de mutações ou pela aquisição de genes exógenos (BAPTISTA, 2013). A resistência adquirida pode ocorrer devido ao uso continuado de antimicrobianos, onde bactérias inicialmente suscetíveis a determinadas drogas adquirem perfil de resistência, pela pressão seletiva (HUGHES, 2014).

O principal mecanismo envolvido na resistência adquirida é a transferência horizontal de genes de resistência, através de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, bacteriófagos e transposons. Estes transferem genes de resistência para diferentes grupos taxonômicos e ecológicos, geralmente dirigidos a uma família ou tipo

de antibiótico, sendo que o mesmo microrganismo pode conter vários genes de resistência (HUGHES, 2014; LEVY; MARSHALL, 2004).

A transdução é o processo no qual o DNA bacteriano é transferido entre as células, mediado por um vírus denominado bacteriófago. Ao infectar uma nova bactéria, a porção de DNA irá integrar-se no DNA da bactéria infectada (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008). A transdução pode ser generalizada, sendo qualquer gene transduzido, ou especializada, em que ocorre a transferência de genes específicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Entretanto o mecanismo mais importante e comum para transferência de genes de resistência é a conjugação devido à localização frequente de genes de resistência em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, e devido ao seu amplo espectro de hospedeiros (GUARDABASSI; KRUSE, 2010). A conjugação é um processo que ocorre entre células bacterianas, da mesma ou de diferentes espécies, que ao entrarem em contato direto trocam pequenas porções de material genético (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; NEIHARDT, 2004; RICE; BONOMO, 2005).

Já a transformação é o processo no qual fragmentos de DNA livre no meio são incorporados pela célula receptora, resultando em alterações genotípicas. Fatores como composição do meio, estado de competência e fisiológico da célula são importantes para o sucesso do processo (BAPTISTA, 2013; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Por outro lado, a resistência mediada por alterações mutacionais cromossômicas ocorre em baixos níveis, e normalmente está relacionada a apenas um agente antimicrobiano (BAPTISTA, 2013). As mutações são mecanismos que contribuem para o aumento da variabilidade genética, incluindo a resistência bacteriana. As mutações que conferem resistência aos antimicrobianos são fenômenos complexos, em que a fisiologia, a genética, a dinâmica bactéria-antibiótico, o histórico de comportamento entre populações bacterianas, em conjunto com a estrutura física do meio seletivo desempenham um papel importante. O processo de mutação em populações bacterianas não é um evento estático, e a velocidade e o tipo de mutantes que são selecionados sob pressão seletiva dos antimicrobianos são influenciadas por vários fatores. Em muitos casos, o fenótipo nem sempre reflete o mesmo genótipo em mutantes selecionados, devido à ocorrência de mutações em diferentes genes ocasionarem fenótipos de resistência semelhantes (CÂMARA, 2011). Um exemplo de mutação seria o gene *vanA*, que causa alterações nas porções terminais de peptídeos, fazendo com que a vancomicina não se ligue na bactéria, originando os *Staphylococcus aureus* vancomicina resistentes (VRSA) (MORRISON e ZEMBOWER, 2020).

Devido a capacidade de transferência horizontal de genes, a resistência aos antibióticos é atualmente um dos mais importantes problemas de saúde pública. Isso

porque não envolvem apenas microrganismos patogênicos, mas também cepas utilizadas em larga escala podem propiciar a resistência (ZARZECKA, et al. 2022). A resistência antimicrobiana ameaça à saúde humana e animal. Atualmente os antimicrobianos são amplamente utilizados em animais produtores de alimentos, e com isso podem servir como um reservatório de bactérias resistentes a antibióticos, que podem ser transferidas para os seres humanos, ocasionando riscos a saúde (MA, et al 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade microbiana de amostras de leites cru de ovelha e queijos produzidos na região Sul do Brasil, avaliando a microbiota, qualidade microbiológica e resistência a antimicrobianos.

3.2 Objetivos específicos

I. Caracterizar as comunidades microbianas de amostras de leite cru de ovelha da raça Lacaune, coletados em diferentes fazendas da região Sul do Brasil;

II. Caracterizar as comunidades microbianas de amostras de queijo tipo feta, colonial, frescal e tipo pecorino, produzidos em diferentes fábricas da região Sul do Brasil;

III. Comparar a diversidade bacteriana entre os leites de diferentes fazendas e queijos de diferentes tipos;

IV. Avaliar a qualidade microbiológica do leite de ovelha e queijos de fazendas do Sul do Brasil e avaliar enterotoxinas nessas amostras;

V. Pesquisar *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite de ovelha e queijos;

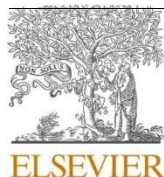
VI. Avaliar os perfis de suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. e genes de resistência nos isolados.

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados em dois artigos científicos, que serão apresentados como capítulos I e II desta tese.

O primeiro artigo foi publicado na revista LWT - Food Science and Technology”, doi <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111579>, e aborda a caracterização molecular das comunidades bacterianas presentes em leite de ovelha e queijo produzidos na região Sul do Brasil, por meio do sequenciamento *metabarcoding* do gene *16S rRNA*. Com este trabalho foi possível caracterizar a diversidade microbiana do leite cru de ovelha e queijos, sendo que *Phyllobacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. foram os gêneros mais frequentes nas amostras de leite. A microbiota central das amostras de queijo foi composta por *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. e a microbiota do leite apresentou maior variabilidade do que a microbiota do queijo.

O segundo artigo descreve a segurança microbiológica das amostras de leite cru de ovelha e queijos. Para isso foi avaliado a presença de enterotoxinas estafilocócicas e o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* spp. Foi possível observar alta resistência antimicrobiana nos isolados e foi verificada a frequência de alguns genes de resistência. Os resultados são preocupantes, pois a resistência a antimicrobianos é considerada um problema de saúde pública mundial.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Molecular characterization of the bacterial communities present in sheep's milk and cheese produced in South Brazilian Region via *16S rRNA* gene metabarcoding sequencing

Creciana M. Endres^{a,1}, Ícaro Maia S. Castro^{b,c,1}, Laura D. Trevisol^a, Juliana M. Severo^c, Michele B. Mann^d, Ana Paula M. Varela^c, Ana Paula G. Frazzon^d, Fabiana Q. Mayer^{e,*}, Jeverson Frazzon^a

^a Institute of Food Science and Technology (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Institute of Mathematics and Statistics (IME) - University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^c Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Department of Microbiology, Immunology and Parasitology (ICBS), UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Research Center for Animal Health, Institute of Veterinary Research Desidério Finamor (IPVDF), Diagnostic and Agricultural Research Department, Secretariat of Agriculture, Livestock and Rural Development, Eldorado do Sul, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacterial communities
Microbial diversity *16S*
rRNA gene
Metabarcoding
High-throughput sequencing.

ABSTRACT

Sheep's milk and cheese represent unexplored reservoirs of microorganisms' genetic and metabolic diversity. This study aimed to characterize the microbial communities of milk and cheese from sheep of Lacaune breed, produced in the South Region of Brazil. Milk samples ($n = 15$) from three dairy farms and four types of cheese (fresh, colonial, feta-type, and pecorino-type; $n = 20$) were subjected to partial *16S rRNA* gene sequencing. *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. were the dominant taxa (core microbiota) of cheeses, while *Phyllobacterium* spp. and *Staphylococcus* spp. were the most prevalent genera in milk. Regarding milk samples, no differences in alpha diversity were observed between the analyzed farms. However, beta diversity analysis revealed that milk collected on Farm 1 differed from the others. These differences may be associated with sheep feeding, mammary gland diseases, and the milking practices used. Upon analyzing cheese samples, significant differences in both alpha and beta diversities were observed between the different cheese types, suggesting that processing and maturation conditions are important for shaping cheese microbiota. Notably, other bacterial groups—including decomposers and potentially pathogenic microorganisms to humans—were observed in some of the analyzed cheeses. This study expands our knowledge of the bacterial composition of sheep's milk and cheese found in different geographic regions.

1. Introduction

Dairy sheep production has recently become a profitable activity in Brazil, especially when compared to the extensive production of sheep's milk in certain European countries such as Greece, Spain, Italy, and France. The annual production of sheep's milk in Brazil corresponds to approximately 840,000 L (Bianchi, 2017), which is the sum of small- and medium-sized farm producers. Most dairy sheep activity is applied to cheese production, which is increasing globally and represents a major

economic driver in many countries. Feta and pecorino cheeses have a protected designation of origin since they originate from Greece and Italy, respectively (Silva et al., 2013). Therefore, Brazilian legislation requires that locally produced versions be called "feta-type" or "pecorino-type" cheeses. The main sheep's cheeses produced in Brazil are colonial, fresh, pecorino-type, and feta-type. The soft cheeses (fresh and feta-type) have higher moisture content (44.6–45.9%) with pronounced acidity, while hard cheeses (colonial and pecorino-type) have a solid texture and lower moisture content (35.9–38.3%).

* Corresponding author.

E-mail addresses: bimmayer@gmail.com, fabiana-mayer@agricultura.rs.gov.br (F.Q. Mayer).

¹ These authors contributed equally for this work.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111579>

Received 15 January 2021; Received in revised form 25 March 2021; Accepted 21 April 2021

Available online 24 April 2021

0023-6438/© 2021 Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The organoleptic characteristics of these cheeses are influenced by several factors, including the raw materials used, geographic region of the property, seasonality, sheep feed, sheep breed, manufacturing process, and maturation period (Calasso et al., 2016; Kamimura et al., 2019; Van Hoorde et al., 2010). Thus, unraveling the bacterial diversity of the milk produced in different geographical regions and different cheese types is relevant. Moreover, there is still no specific legislation for sheep's milk products in Brazil. In this sense, knowledge of raw sheep's milk and cheese microbiota will help to define the requirements for new legislation and thus promote the expansion of the sheep's cheese market. Culture-based microbiological techniques have been used to identify lactic acid bacteria as well as deteriorating and pathogenic microorganisms in milk and cheese. However, when a bacterium is not culturable, which is true for most species, it cannot be identified via these methods. Therefore, culture independent methods such as high-throughput sequencing based on the *16S rRNA* gene are more adequate for microbiota evaluation (Sant'Anna et al., 2019). Thus, the present study aimed to characterize the microbial communities of raw sheep's milk and different types of sheep's cheeses produced in South Brazilian Region.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design and sampling

A total of 15 sheep's milk and 20 sheep's cheese samples were evaluated in the present study: milk samples from 3 different farms ($n = 5$ each) and four types of cheese: feta-type ($n = 5$), pecorino-type ($n = 5$), colonial ($n = 5$) and fresh ($n = 5$). The samples were collected from Lacaune breed sheep in dairy farms located in South Brazilian Region (Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S1). The milk and cheeses' samples were stored at 4 °C for maximum 24 h. The cheese was then processed and the milk stored at -18 °C until analysis. The milk samples were collected directly on the dairy farm on different days, in sterile packaging between August 2018 and September 2018. The cheeses were purchased at the farms where milk samples were collected between April 2018 and September 2018. The manufacturing process of each type of cheese is described in the Supplementary Table S2. The cheeses were analyzed from different batches of milk collected during this study.

2.2. Sample processing

Milk samples (35 mL) were centrifuged at 10,000 rpm for 40 min at 4 °C, followed by removal of the fat from the top with a spatula. Approximately 30 mL of the supernatant was discarded. The pellet was homogenized by addition of 3 mL of sterile distilled water and vortexing. Afterwards, 1 mL of the resulting solution was centrifuged at 14,000 rpm for 5 min at 4 °C for pellet formation. For cheese samples, 100 g were individually ground in a processor. From that, 25 g were withdrawn, diluted in 225 mL of sterile distilled water and homogenized in a shaker incubator (110 rpm for 2 h at room temperature). The samples were filtered with the aid of a sieve and gauze on top to separate the sediments. A total of 35 mL of the filtrate was centrifuged at 10,000 rpm for 40 min at 4 °C. The supernatant (30 mL) was discarded and 3 mL of sterile distilled water were added to the pellet, which was homogenized by vortexing. Then, 1 mL of this solution was added to a microtube and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min at 4 °C for pellet formation.

2.3. DSA extraction

The pellets were resuspended in 180 μ L of lysis buffer (22.5 mM Tris HCl, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 mg mL⁻¹ lysozyme), followed by homogenization in vortex and incubation for 1 h at 37 °C (homogenized every 15 min in the vortex). Subsequently, 20 μ L of proteinase K

(20 mg mL⁻¹) and 200 μ L of Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer were added to the samples and incubated at 55 °C for 30 min. Then 200 μ L of ethanol 100% were added and the samples were homogenized in vortex for 5 s. The sample suspension (approximately 640 μ L) was used for DNA extraction with Purelink Genomic DNA kit following manufacturers' instructions. DNA was eluted in 25 μ L of plain deionized water (Milli-Q) and stored at -20 °C until the time of analysis.

2.4. Library preparation and 16S rRNA sequencing

The libraries were generated amplifying the V4 domain of bacterial *16S rRNA* gene using F515 and R806 primers, both modified to contain an Illumina adapter region (Caporaso et al., 2011). Amplification was performed in a 25 μ L mixture, consisting of 12.5 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 2 U Platinum Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen™), and 1 X reaction buffer. Amplification was carried out in a BioRad MyCycler Thermocycler (BioRad, USA) according to the following program: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final cycle at 72 °C for 5 min. Amplicons were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, USA) and indexes were added to DNA libraries following the manufacturer instructions (Illumina Inc., San Diego, California, USA). Sequencing was conducted on an Illumina MiSeq System with a paired-end v2 500-cycles kit.

2.5. Bioinformatics data analysis

Bioinformatics data analysis of *16S rRNA* amplicons were performed using QIIME 2 version 2019.7 (Caporaso et al., 2012). Basically, raw sequence data were quality filtered, denoised and chimera filtered using the q2-dada2-plugin with DADA2 pipeline (Callahan et al., 2016). Reads with expected errors higher than 2 were discarded. Read length filtering was applied and the reads were discarded at the first instance of a phred score lower than or equal to 11. The remaining reads were truncated at 240 bp length. Chimera removal was performed using the consensus method. The amplicon sequence variants (ASV's) obtained by DADA2 pipeline were merged into a single feature table using the q2-feature-table plugin. The ASV's were aligned with MAFFT (via q2-alignment) (Katoh et al., 2002) and used to construct a phylogeny with fasttree2 (via q2-phylogeny) (Price et al., 2010). Taxonomy was assigned to ASV's using the q2-feature-classifier Naïve Bayes Taxonomy Classifier (Bokulich et al., 2018). The classifier was trained using extracted Greengenes 13.8 reference sequences with 99% similarity from *16S rRNA* variable region 4 (V4). The resulting feature table, rooted tree from reconstructed phylogeny, and taxonomy classification were imported from QIIME2 to R v3.6.1 environment for further data analysis using Microbiome v1.6.0 (Lahti et al., 2017) and Phyloseq v1.28.0 R packages (McMurdie & Holmes, 2013). For Taxonomic analysis, feature table was normalized to relative abundance using transform function from Microbiome R package.

2.6. Differential abundance analysis

The feature table was filtered to remove singletons using the q2-feature-table plugin, the ASV's that was observed less than two samples and less than 10 abundance frequency were removed from the feature table. The resulting filtered features were collapsed at the genus level using q2-taxa plugin for differential abundance analysis. Differential abundance analysis was performed with ANCOM (Martino et al., 2019) using q2-composition plugin, with mean difference as fold difference in feature abundances across groups and clr as transform-function for volcano plot. ANCOM is done by calculating pairwise log ratios between all features and performing a significance test to determine if there is a significant difference in feature ratios with

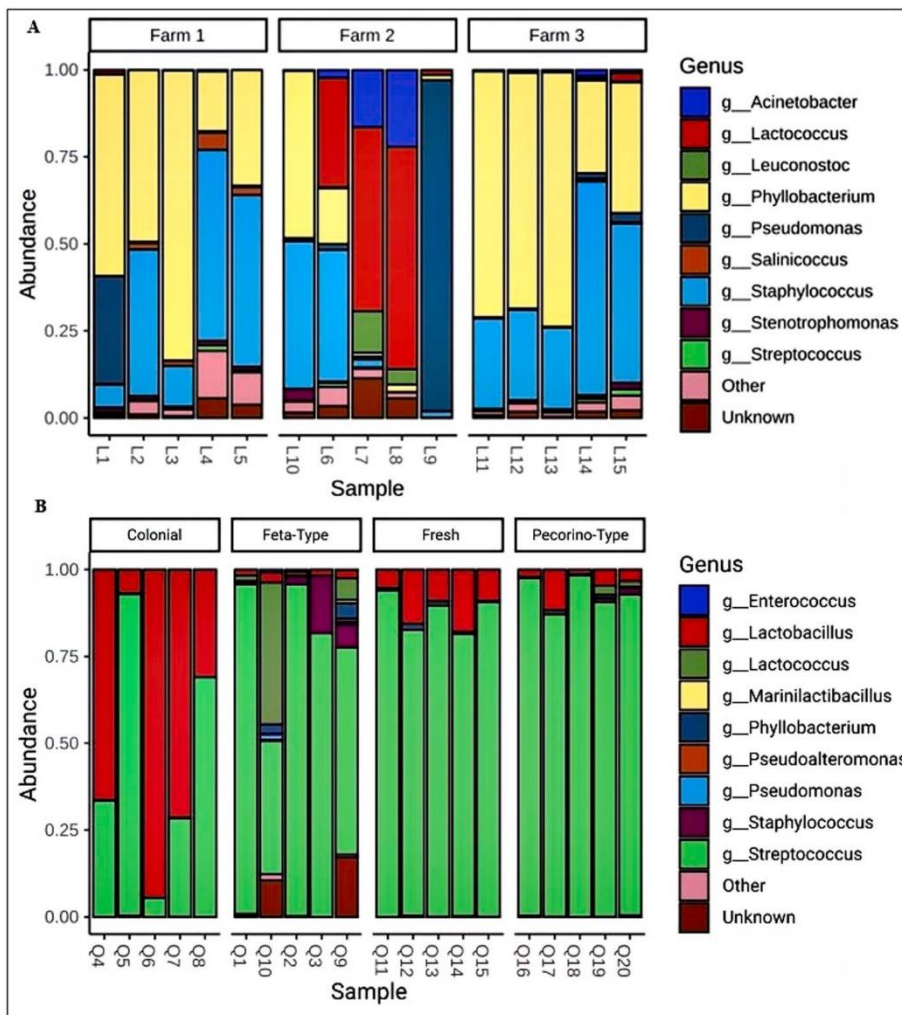


Fig. 1. Representation of the relative abundance of bacterial taxa based on the sequencing of the *16S rRNA* gene at the genus level in milk and cheese samples. Vertical bars indicate the average relative abundance of bacterial sequences present in milk (A) and cheese (B). Strings that could not be assigned are colored in brown and labeled “unknown”. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

respect to the variable of interest. “W” is the W-statistic, or number of features that a single feature is tested to be significantly different against.

2.7. Microbial community analysis

To evaluate bacterial communities’ structure, alpha (Shannon, Chao1) and beta diversity (Weighted UniFrac (Lozupone & Knight, 2005) and Bray-Curtis) were estimated using Microbiome and Phyloseq packages in R. Principal Coordinate Analysis (PCoA) ordination was applied to beta diversity metrics and visualized using plot ordination function from Phyloseq. Alpha diversity significance was estimated with a pairwise comparison using a non-parametric test Wilcoxon (Wilcoxon, 1945), using Vegan R package (Oksanen et al., 2007). Beta diversity significance were estimated with a permutational multivariate analysis of variance (Anderson, 2001) using distance matrices obtained by PCoA ordination with Permutational Multivariate Analysis of variance test (PERMANOVA), implemented as Adonis function in Vegan R package (Oksanen et al., 2007).

2.8. Nucleotide sequence accession numbers

All raw sequence reads have been deposited at Sequence Read Archive (SRA) database from the National Biotechnology Information

Center (NCBI) and available in BioProject PRJNA631574 (sequences of milk samples) and PRJNA555359 (sequences of cheese samples).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of microbial communities in sheep’s milk and cheese

In the present study, the microbial compositions of sheep’s milk from healthy animals and four types of sheep’s cheese were investigated by sequencing the V4 hypervariable region of the *16S rRNA* gene. A total of 1,292,178 reads were obtained for all samples (Supplementary Table S3), which were assigned to 501 ASVs: 429 for milk samples and 72 for cheese samples (Supplementary Table S4). The rarefaction curves showed saturation for both sample types, indicating sufficient sequencing coverage to estimate microbial composition and diversity (Supplementary Fig. S2).

A total of 14 phyla were identified in milk samples (with a relative abundance of >0.1%) that correspond to Proteobacteria (58.03%), Firmicutes (39.93%), Actinobacteria (1.79%) and Bacteroidetes (0.17%). Two phyla were identified in cheese, with a predominance of Firmicutes (97.50%) and Proteobacteria (2.48%) (Supplementary Fig. S3 A). This finding is consistent with other cheese-related *16S rDNA* metagenomics studies (Dalmaso et al., 2016; Kamilari, Anagnostopoulos, Papademas,

Kamilaris, & Tsaltas, 2020; Kamimura et al., 2020). Regarding the classes present in samples, Bacilli, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, and Clostridia were the most abundant in both milk and cheese samples. At the order level, Rhizobiales, Bacillales, Pseudomonadales, and Lactobacillales were observed in milk, while Lactobacillales, Bacillales, Enterobacteriales, and Rhizobiales were observed in cheeses. The most abundant families in the milk samples were Phyllobacteriaceae, Staphylococcaceae, Pseudomonadaceae, and Streptococcaceae, while Streptococcaceae and Lactobacillaceae were most abundant in cheese samples (Supplementary Fig. S3 B). At the genus level, the diversity and abundance of milk microbiota were wide-ranging (Fig. 1 A). Eighty-seven bacterial genera were identified in milk samples, of which *Phyllobacterium* spp. (42.59%), *Staphylococcus* spp. (29.20%), *Pseudomonas* spp. (10.96%), *Lactococcus* spp. (5.10%), and *Acinetobacter* spp. (1.38%) were the most abundant. Additionally, the differential abundance analysis (ANCOM) for milk samples indicated differences in *Staphylococcus* spp. abundance ($w = 130$) (Supplementary Fig. S4 A). *Phyllobacterium* spp. was the most prevalent genus in milk samples. This result was observed in raw goat's milk which was stored at 4 °C before freezing (Kamilaris, Anagnostopoulos, Papademas, Efthymiou, et al., 2020); here the samples were also preserved at 4 °C until freezing, which could have influenced microbiota, since storage conditions are critical to microbial communities shaping in raw milk and its products (Kamilaris, Anagnostopoulos, Papademas, Efthymiou, et al., 2020). Future studies may be performed to evaluate the storage influence on sheep milk microbiota. Notably, the presence of this genus can likewise be influenced by diet, environment, animal health, and manufacturing processes (McInnis et al., 2015). It is generally accepted that lactic acid bacteria predominate in the microbiota of raw sheep, goat, cow, and buffalo milk (Esteban-Blanco et al., 2019; Kamilaris, Anagnostopoulos, Papademas, Efthymiou, et al., 2020; Li et al., 2016). Among the most common genera *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. are also common in the raw milk microbiota, since they are psychrotrophic bacteria and milk is

stored at low temperatures (Kamilaris, Anagnostopoulos, Papademas, Efthymiou, et al., 2020; Quigley et al., 2013; Tilocca et al., 2020).

At the moment the milk is excreted, it is immediately colonized by a complex microbiota, including microorganisms that naturally inhabit the teat skin and the epithelial lining of the teat canal, which are mainly represented by the genera *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Micrococcus* spp. (Bortoluzzi & Menezes, 2014). Additionally, milking equipment, animal location, feeding place, bedding material, and lactation stage also influence the raw milk microbiota. Furthermore, the raw milk microbiota is influenced by the biochemical composition of milk as well as pH and water activity, which can affect microbial growth. In addition to the aforementioned genera, *Staphylococcus* spp. was also observed in milk samples. The presence of this genus could indicate udder inflammation in sheep since it is considered the main etiologic agent of intramammary infections. Since some *Staphylococcus* species are part of the natural microbiota of many mammals, this microorganism has frequently been observed in raw milk from healthy sheep (Esteban-Blanco et al., 2019; Gonzales-Barron et al., 2017). However, it is important to note that the presence of *Staphylococcus* spp. can also be the result of poor hygiene of the manipulator and/or facilities; however, this factor was not assessed in the present work. Since some *Staphylococcus* spp. species can be opportunistic pathogens to humans, its deeper characterization is necessary to better understand the pathogenic potential in evaluated samples.

The following genera were identified in the cheese samples: *Streptococcus* spp. (73.15%), *Lactobacillus* spp. (19.91%), *Lactococcus* spp. (2.46%), and *Staphylococcus* spp. (1.74%) (Fig. 1 B). *Lactobacillus* spp. ($w = 10$) and *Staphylococcus* spp. ($w = 8$) were differentially abundant (ANCOM) in these samples, corroborating with the taxonomic description (Supplementary Fig. S4 B). *Streptococcus* spp. and/or *Lactobacillus* spp. have been widely reported as the dominant bacteria in cheeses (Aldrete-Tapia et al., 2014; Castellanos-Rozo et al., 2020; Kamilaris, Anagnostopoulos, Papademas, Kamilaris, & Tsaltas, 2020) and are associated with their flavors and textures. Bacteria of these genera produce bacteriocins that act as bioprotectors to cheese by inhibiting the

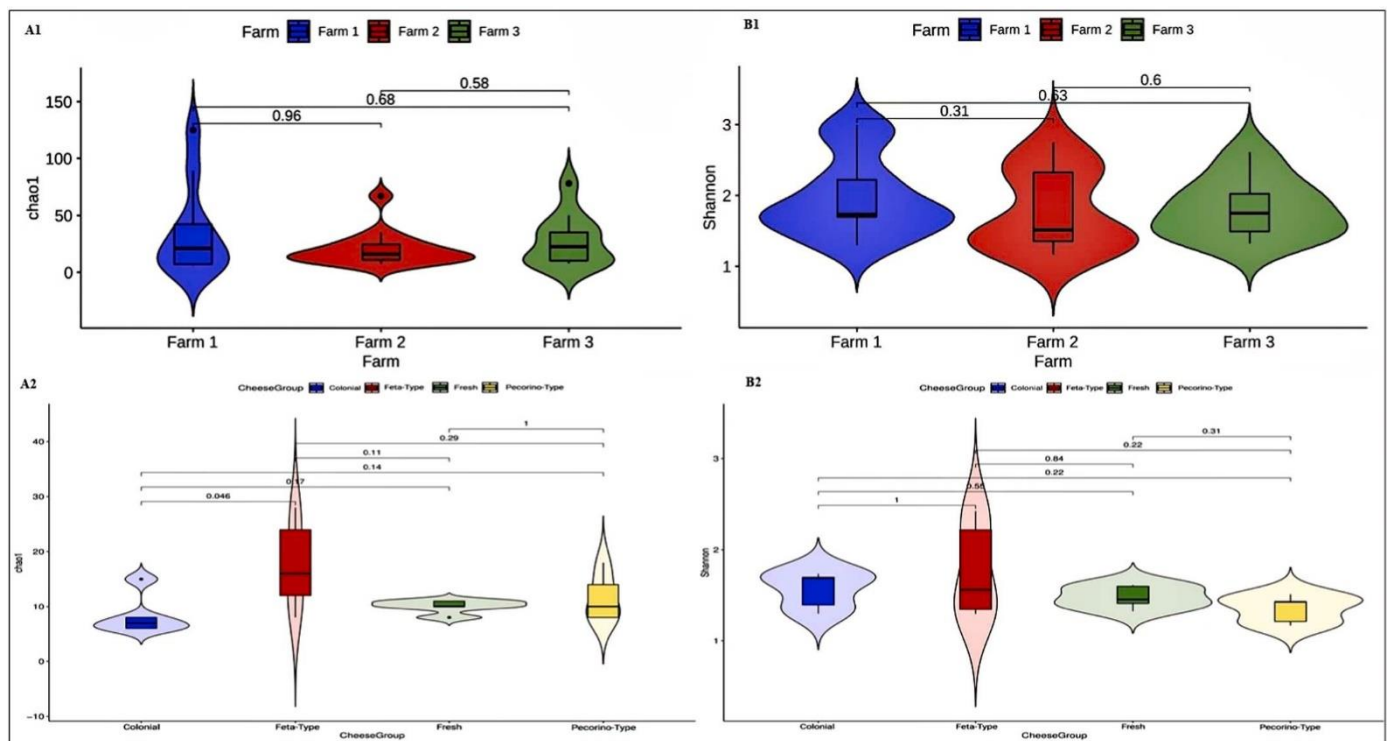


Fig. 2. Alpha diversity metrics featuring milk and cheese samples. Wealth measured using the Chao1 index (A) and Shannon index (B). (1) Milk samples collected

from different farms. (2) Cheese samples from different groups.

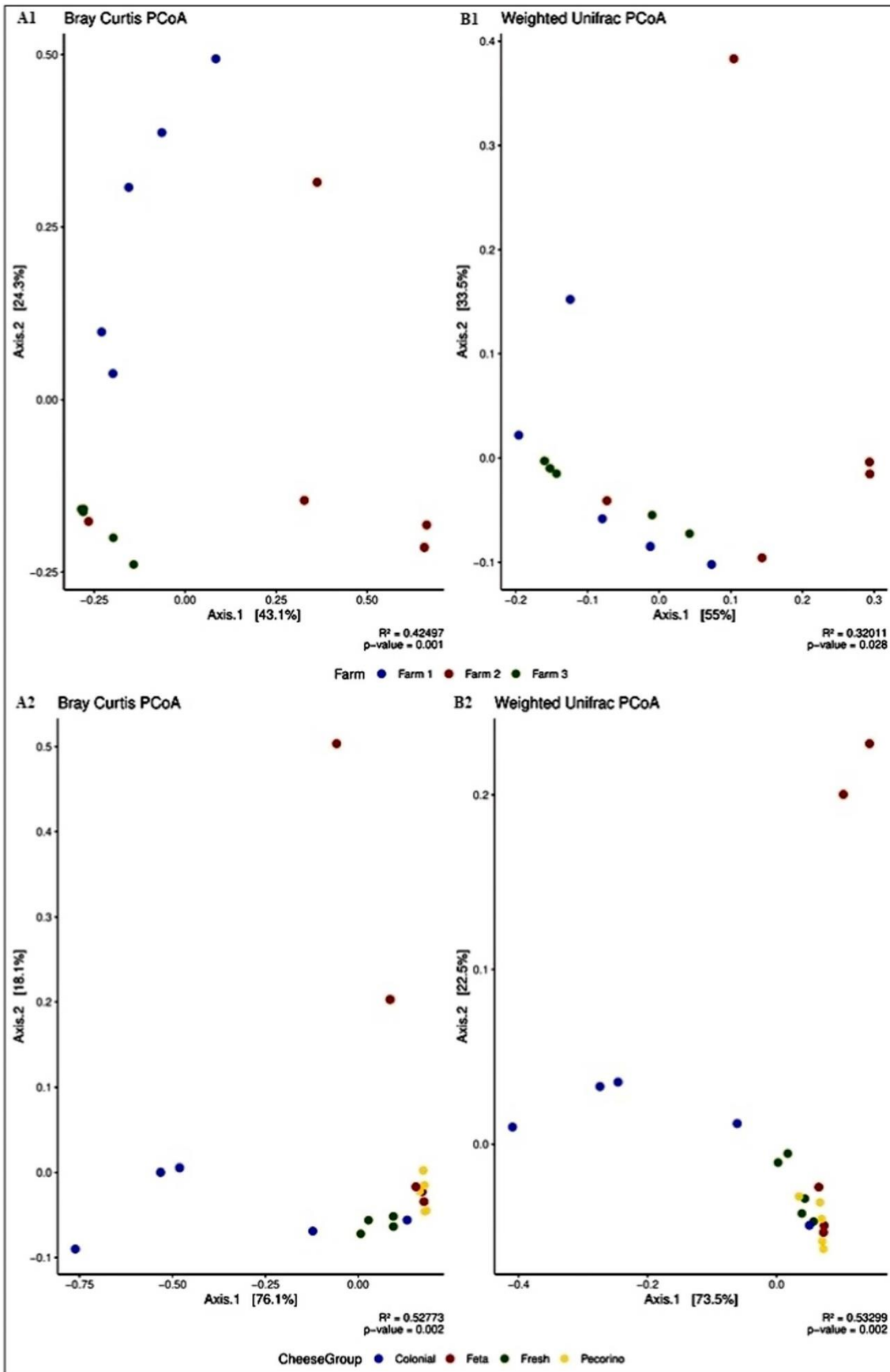


Fig. 3. Principal coordinate analysis (PCoA) based on the bacterial communities of milk and cheese samples. The PCoA analysis for these samples was based on the distance metrics of Bray-Curtis (A) and weighted Unifrac (B). (1) Milk samples collected from different farms. (2) Cheese samples from different groups.

growth of pathogenic and deteriorating microorganisms (Gontijo et al., 2020; Kaya & Simsek, 2019). The abundance of *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. was similar in feta-type and pecorino-type cheeses, which is an expected result since the starter cultures used in the production of these cheeses are generally composed of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, and *L. casei* (Supplementary Table S2). It is interesting to note that colonial and fresh cheeses are manufactured by the addition of *L. helveticus* only; however, high levels of *Streptococcus* spp. could be observed in the analyzed samples (Fig. 1B).

While *Lactobacillus* spp. grows slowly during the initial weeks of cheese maturation, they dominate the microbiota at the end of the maturation process. These bacteria are important for the ripening process due to the release of bioactive peptides, vitamins, and oligosaccharides (Santiago-Lo'pez et al., 2018). These properties explain the predominance of *Lactobacillus* spp. in hard cheeses (e.g., colonial) and their lower abundance in soft cheeses (e.g., fresh and feta-type). Notably, in cheeses with longer maturation periods, these microorganisms can die due to low pH, high salt concentrations, and decreased water content (Rantsiou et al., 2008). This justifies the low abundance of these microorganisms in pecorino-type cheese since it is matured for a longer period.

Besides genera related to cheese microbiota, the presence of *Staphylococcus* spp. may be a concern since some species are potential pathogens. This genus was mainly observed in feta-type cheese and at lower frequencies in pecorino-type cheese. Its presence may be associated with the health status of animals, handling practices, and contamination during the cheese-making process (Aldrete-Tapia et al., 2014). Thus, as for milk, further studies to determine the *Staphylococcus* spp. species in cheese samples, and their potential pathogenicity must be addressed.

Regarding species, only a few were identified in the present study. This could be related to the lower number of reads obtained by v2 Illumina kit, although the rarefaction curves show that the ASV's number was sufficient (Supplementary Fig. S2). Moreover, as published in previous studies, 16S rRNA partial gene sequencing has not enough resolution to identify a great number of species, due to its conservation degree (Johnson et al., 2019). From milk samples, it was possible to identify *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus sciuri*, *Stenotrophomonas geniculata*, *Staphylococcus succinus*, and *Leuconostoc mesenteroides*. *Pseudomonas fragi* is often associated with milk and dairy products and can produce volatile esters (Filippis et al., 2014). *Staphylococcus sciuri* has been described in goat cheese and produces enterotoxin (Cunha-Neto et al., 2002). Moreover, this species and *Staphylococcus succinus* are present in the udders of animals (Derakhshani et al., 2018). Furthermore, microorganisms from the genus *Leuconostoc* spp. have been associated with milk, while *L. mesenteroides* is related to product degradation (Frantzen et al., 2017).

Lactobacillus delbrueckii was identified in cheeses, especially in colonial cheese. Additionally, *Staphylococcus equorum* and *Lactobacillus helveticus* were present in feta-type and pecorino-type cheeses. These microorganisms are often used in the production of fermented products, and their presence in cheeses is expected since they contribute to the formation of aromatic compounds during cheese maturation (Irlinger et al., 2012; Vermote et al., 2018). Their presence can be associated with sensory changes that can influence a product and its shelf life.

3.2. Sample richness and bacterial diversity

Alpha diversity data were estimated using the Chao1 and Shannon indexes (Fig. 2; Supplementary Table S5). Regarding milk diversity, no differences were observed among the three evaluated farms ($p > 0.05$). For cheese samples, the feta-type cheese had higher microbial diversity than colonial cheese (Chao1; Fig. 2; Supplementary Table S5), which may be related to the moisture content of feta-type cheese, which allows the greater proliferation of microorganisms (Lima & Leal, 2017). Raw milk showed greater microbial diversity, which is expected

Table 1

Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions (PERMANOVA) using a pseudo-F test with 9999 permutations for Beta Diversity analysis by Bray-Curtis and weighted UniFrac. Bold numbers show statistically significant differences.

Milk		Bray curtis		Weighted UniFrac	
		Adjusted p value	R ^a	Adjusted p value	R ^a
Farm 1	Farm 2	0.050	0.3070	0.177	0.2637
Farm 3		0.021	0.4594	1.000	0.0577
Farm 2	Farm 3	0.141	0.3578	0.092	0.3304
Cheese					
Colonial	Feta-type	0.099	0.4149	0.042	0.4616
	Fresh	0.293	0.4653	0.255	0.4736
Pecorino-type		0.061	0.5761	0.107	0.5433
Feta-type	Fresh	0.096	0.2092	0.958	0.2178
	Pecorino-type	0.706	0.1843	0.725	0.2281
Fresh	Pecorino-type	0.044	0.5053	0.406	0.3377

^a R - Pearson correlation coefficient.

since this product is rich in nutrients and has a neutral pH, which makes it capable of supporting a rich microbiota (Porcellato et al., 2018). This result has also been demonstrated for other types of milk (Falardeau et al., 2019; Kamimura et al., 2020). In contrast, the lower microbial diversity of cheeses may be related to being prepared with pasteurized sheep's milk. A recent study comparing traditional and industrial methods of cheese production shows that microbial diversity is lower when more severe heat treatments are made (Kamilari, Anagnostopoulos, Papademas, Kamilaris, & Tsaltas, 2020). Therefore, cheeses made with raw milk have greater species richness in their microbiota (Van Hoorde et al., 2010). Additionally, starter cultures are used for cheese production and to inhibit the growth of undesirable microorganisms and/or pathogens. Thus, these bacteria represent the core microbiota of the evaluated cheeses.

3.3. Comparison of microbial communities in milk and cheese samples

Calculating beta diversity is an important criterion used to assess the diversity of ASV's between different samples (Pastore, 2016). Based on the relative abundance of sequenced ASV's, PCoA was used to analyze differences in the composition of bacterial communities in milk samples from different farms as well as different types of cheese samples using the Bray-Curtis method (Fig. 3 A) and weighted UniFrac distance metrics (Fig. 3 B).

Significant differences in beta diversity were observed when comparing the milk samples obtained from different farms based on Bray-Curtis (Fig. 3 A1; Table 1), which showed that the milk samples collected at Farm 1 differed from those of Farms 2 and 3. Weighted

UniFrac distance showed no significant differences between the milk samples ($p > 0.05$; Table 1). Differences in the milk microbiota between farms may be associated with sheep feeding, mammary gland diseases, and the milking practices employed (Esteban-Blanco et al., 2019; Kamimura et al., 2020) and were also observed for goat milk.

The composition of bacterial communities among the cheese types was also compared (Fig. 3 A2 and B2; Table 1), showing significant differences between some groups. Samples of fresh cheeses differed from the pecorino-type cheese group, which indicates that the bacterial communities in these types of cheeses have greater dissimilarity and share fewer taxa compared to others. Additionally, the weighted UniFrac distance showed a significant difference between the colonial and feta-type cheeses. The other cheese groups had very similar microbial communities, with no significant differences (Table 1). These results may be related to the effect of starter cultures, which are the same for

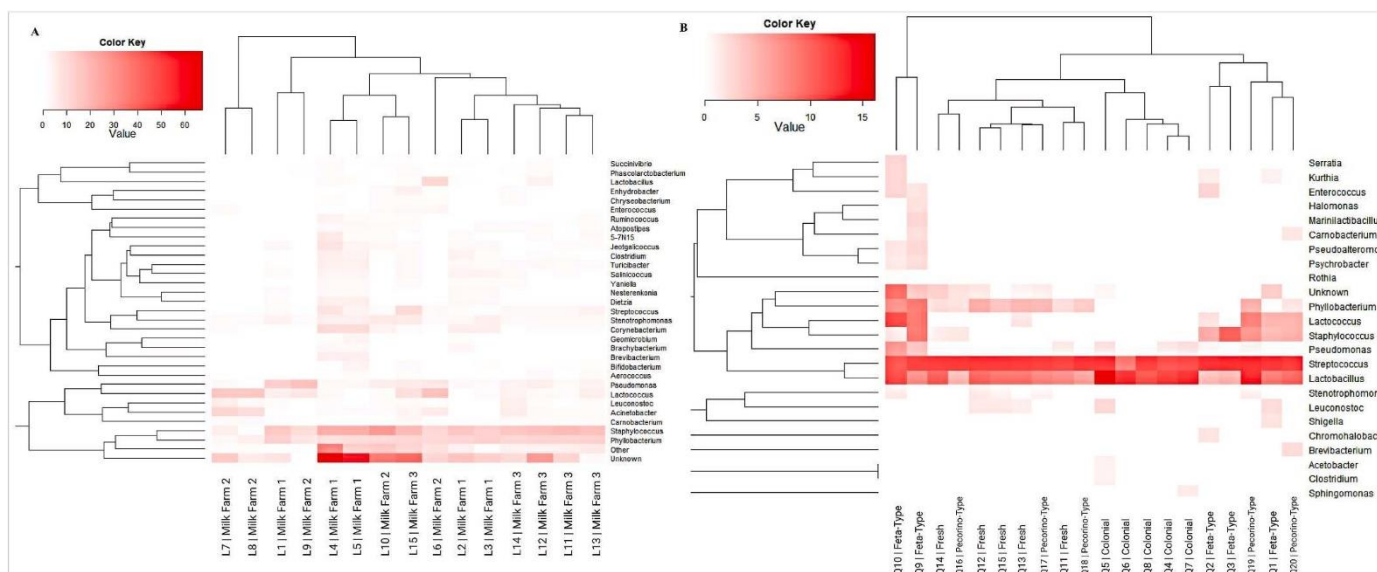


Fig. 4. Heat map and dendrogram cluster showing microbial diversity at the genus level. Hierarchical grouping in milk (A) and cheese (B) samples are presented. The color represents the relative abundance in the scale of each variable. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

feta-type and pecorino-type cheeses (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, and *Lacticaseibacillus casei*) as well as fresh and colonial cheeses (*L. helveticus*) (Supplementary Table S2). In addition, pecorino-type and feta-type are produced in the same factory, which was already showed to influence microbiota composition, probably related to the standardization of the processes along the production chain (de Paula et al., 2021).

The relationships between evaluated samples considered taxonomic classification at genus the level and were visualized using an exploratory heat map associated with hierarchical clustering based on the weighted UniFrac distances between samples (Fig. 4 A and 4 B). Since it was not possible to separate the different farms when analyzing milk samples, this suggests that even though the samples were from different lots and farms, they had similar microbiota despite originating from different lots and farms. Moreover, it was possible to confirm that *Staphylococcus* spp. and *Phyllobacterium* spp. were the dominant genera in milk samples. Regarding cheese samples, a cluster was observed for colonial cheese and similar diversity was noted among the different types of cheese, indicating that their microbiota was preserved. Previous studies showed that the origin of cheese influences the richness, uniformity, and relative abundance of bacterial species. In the present study, geographical localization does not seem to have this influence. This result is somewhat expected since the regions included in this study present very similar characteristics. Additionally, the heat map confirms that *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. made up the core microbiota of the analyzed cheeses.

4. Conclusions

This is the first study performed to characterize microbial communities of Lacaune breed sheep's raw milk and different types of cheese in the Southern Brazilian Region. The results demonstrated that sheep's raw milk have great microbial diversity, which could be associated with environmental conditions, diet and genetics of the animals. In addition, *Phyllobacterium* spp., *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. were the main genera found in milk, which could be associated with its cooling process or contamination. There was variation when analyzing beta diversity of milk samples from different farms, suggesting that animal feeding, mammary gland diseases or the milking practices may influence the milk microbiota.

The sheep's cheese microbiota showed lower diversity, with a core microbiota composed by *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. This could be associated to the starter cultures used for cheese manufacture and to pasteurized milk used in the process. Regarding the taxonomic diversity, the feta-type cheese had higher diversity when compared to colonial cheeses. This may be related to the higher moisture content of the feta-type cheese which may facilitate microbial growth. The beta-diversity analysis also showed difference between fresh and pecorino-type cheeses. These results show that the starter cultures and the processes along the production chain may shape cheese microbiota. The results of this study provide greater knowledge about the microbial structure on sheep's milk and cheeses and may be a useful tool to characterize the particularities of each product. Moreover, these data may be helpful to structure strategies that guarantee the quality and safety of products, serving as a basis for the creation of specific legislation for sheep's milk and cheeses in Brazil.

CRedit authorship contribution statement

Creciana M. Endres: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Icaro Maia S. Castro:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Writing – review & editing. **Laura D. Trevisol:** Methodology, Writing – review & editing. **Juliana M. Severo:** Methodology, Software, Writing – review & editing. **Michele B. Mann:** Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Ana Paula M. Varela:** Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Ana Paula G. Frazzon:** Conceptualization, Formal analysis, Resources, Writing – review & editing. **Fabiana Q. Mayer:** Formal analysis, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **Jeverson Frazzon:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

JF is grateful for The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for Financial support (#401714/2016-0 and # 305495/2018-0). The authors are thankful for Caroline Tochetto for drawing the map.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111579>.

References

- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M. C., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*, *44*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.022>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, *26*, 32–46.
- Bianchi, A. E. (2017). Caracterização dos sistemas produtivos de ovinos de leite no Brasil. <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos>.
- Bokulich, N., Kaehler, B., Rideout, J., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., et al. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *School of Biology*, *6*–90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bortoluzzi, D. P., & Menezes, C. R. De (2014). Microbiota e conservação do leite. *Microbiota and Conservation of Milk*, 76–89.
- Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology*, *54*, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.008>
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Sature Methods*, *581*–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, *6*(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Castellanos-Rozo, J., Pérez Pulido, R. P., Grande, M. J., Lucas, R., & Gavéz, A. (2020). Analysis of the bacterial diversity of Paipa cheese (a traditional raw cow's milk cheese from Colombia) by high-throughput sequencing. *Microorganisms*, *8*(2), 218. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020218>
- Cunha-Neto, A., Da Silva, C. G. M., & Stamford, T. L. M. (2002). *Staphylococcus enterotoxigenicus* em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *22*, 263–271. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612002000300012>
- Dalmasso, A., Soto del Rio, M. de los D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., & Bottero, M. T. (2016). Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, *69*, 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.004>
- Derakhshani, H., Plaizier, J. C., De Buck, J., Barkema, H. W., & Khafipour, E. (2018). Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *Journal of Dairy Science*, *101*(11), 10191–10205. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14858>
- Esteban-Blanco, C., Gutiérrez-Gil, B., Puente-Sánchez, F., Marina, H., Tamames, J., Acedo, A., & Arranz, J. J. (2019). Microbiota characterization of sheep milk and its association with somatic cell count using 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *137*(1), 73–83. <https://doi.org/10.1111/jbg.12446>
- Falardeau, J., Keeney, K., Trmčić, A., Kitts, D., & Wang, S. (2019). Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiology*, *83*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.002>
- Filippis, F. De, Stora, A. La, Stellato, G., Gatti, M., & Ercolini, D. (2014). A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS One*, *1*–10.
- Frantzen, C. A., Kot, W., Pedersen, T. B., Ardo, Y. M., Broadbent, J. R., Neve, H., Hansen, L. H., Bello, F. D., Østlie, H. M., Kleppen, H. P., Vogensen, F. K., & Holo, H. (2017). Genomic characterization of dairy associated Leuconostoc species and diversity of leuconostocs in undefined mixed mesophilic starter cultures. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00132>
- Gontijo, M. T. P., Silva, J. de S., Vidigal, P. M. P., & Martin, J. G. P. (2020). Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. *Food Research International*, *128*, 108783. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108783>
- Gonzales-Barron, U., Gonçalves-Tenório, A., Rodrigues, V., & Cadavez, V. (2017). analysis approach. *Current Opinion in Food Science*, *18*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.002>
- Irlinger, F., Loux, V., Bento, P., Gibrat, J., Straub, C., Bonnarme, P., et al. (2012). Genome sequence of *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* Mu2, isolated from a French smear-ripened cheese. *Journals ASM Org*, *194*, 5141–5142. <https://doi.org/10.1128/JB.01038-12>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Sature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kamilari, E., Anagnostopoulos, D. A., Papademas, P., Efthymiou, M., Tretiak, S., & Tsaltas, D. (2020). Snapshot of Cyprus raw goat milk bacterial diversity via 16S rDNA high-throughput sequencing; impact of cold storage conditions. *Fermentation*, *6*, 100. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040100>
- Kamilari, E., Anagnostopoulos, D. A., Papademas, P., Kamilaris, A., & Tsaltas, D. (2020). Characterizing Halloumi cheese's bacterial communities through metagenomic analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *126*, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109298>
- Kamimura, B. A., Cabral, L., Noronha, M. F., Baptista, R. C., Nascimento, H. M., & Sant, A. S. (2020). Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. *Journal of Food Microbiology*, *89*(February), 103453. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103453>
- Kamimura, B. A., Filippis, F. De, Sant'Ana, A. S., & Ercolini, D. (2019). Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Journal of Food Microbiology*, *80*, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>. December 2018.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). Mafft: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*, 3059–3066.
- Kaya, H. I., & Simsek, O. (2019). Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *115*, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108464>
- Lahti, L., Shetty, S., & Blake, T. (2017). Microbiome R package. *Tools Microbiome Anal R*. <https://doi.org/10.18129/ijor.17010001>
- R, J. S.-T. M. A., & 2017, U.
- Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: A meta-

- Lima, B. B. de, & Leal, M. C. (2017). *Parametros Indicadores de Qualidade de Queijos Artesanais Comercializados em Castro-Pr.* Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Li, L., Renye, J. A., Feng, L., Zeng, Q., Tang, Y., Huang, L., Ren, D., & Yang, P. (2016). Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7016–7024. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11041>
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Martino, C., Morton, J. T., Marotz, C. A., Thompson, L. R., Tripathi, A., Knight, R., & Zengler, K. (2019). A novel sparse compositional technique reveals microbial perturbations. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00016-19>.
- McInnis, E. A., Kalanetra, K. M., Mills, D. A., & Maga, E. A. (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, 46, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.021>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8(4), Article e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Wagner, H. (2007). Community ecology package. In *The vegan Package*. <https://doi.org/10.4135/9781412971874.n145>
- Pastore, R. A. A. (2016). *Diversidade Taxonômica e Biodegradação de Lignina em Comunidade Bacteriana do Solo da Catinga*. Universidade Estadual de Campinas.
- de Paula, A. C. L., Medeiros, J. D., Fernandes, G. R., da Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2021). Microbiome of industrialized Minas frescal cheese reveals high prevalence of putative bacteria: A concern in the one health context. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 139, 110791. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110791>
- Porcellato, D., Aspholm, M., Skeie, S. B., Monshaugen, M., Brendehaug, J., & Mellegård, H. (2018). Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.004>
- Price, M., Dehal, P., & Arkin, A. (2010). FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, 5(3), Article e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2008). International journal of food microbiology micro flora of feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.031>
- Sant'Anna, F., Wetzels, S., Cicco, S. S., Figueiredo, R., Sales, G., Figueiredo, N., Al, E., Machado, F., Anna, S., Urimarie, S., Henrique, S., Cicco, S. S., Alvaro, C., Schmitz-esser, S., Mann, E., Wagner, M., & Resende, M. (2019). Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Journal of Food Microbiology*, 82(February), 349–362. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.016>
- Santiago-Lopez, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive

compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>

Silva, A. P. S. P., Santos, D. V., Kohek, I., Machado, G., Hein, H. E., Vidor, A. C. M., & Corbellini, L. G. (2013). Ovinocultura do Rio Grande do Sul: Descrição do sistema produtivo e dos principais aspectos sanitários e reprodutivos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(12), 1453–1458. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200010>

Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., & Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>

Van Hoorde, K., Heyndrickx, M., Vandamme, P., & Huys, G. (2010). Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, 27(3), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.001>

Vermote, L., Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2018). Amplicon and shotgun metagenomic sequencing indicates that microbial ecosystems present in cheese brines reflect environmental inoculation during the cheese production process. *International Dairy Journal*, 87, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.010>

Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. In *Vol. 1. Biometrics bulletin*. Issue 6 <http://www.jstor.org/about/terms.html>.

Supplementary Figures

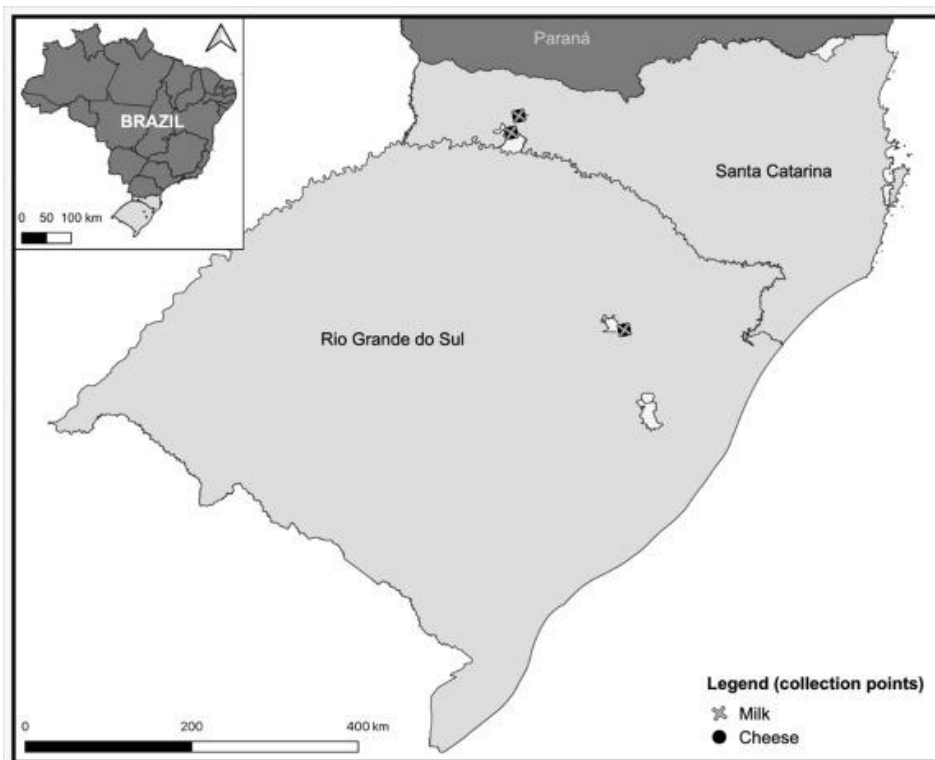


Figure S1. Milk sample collection locations according to the farm and cheese groups

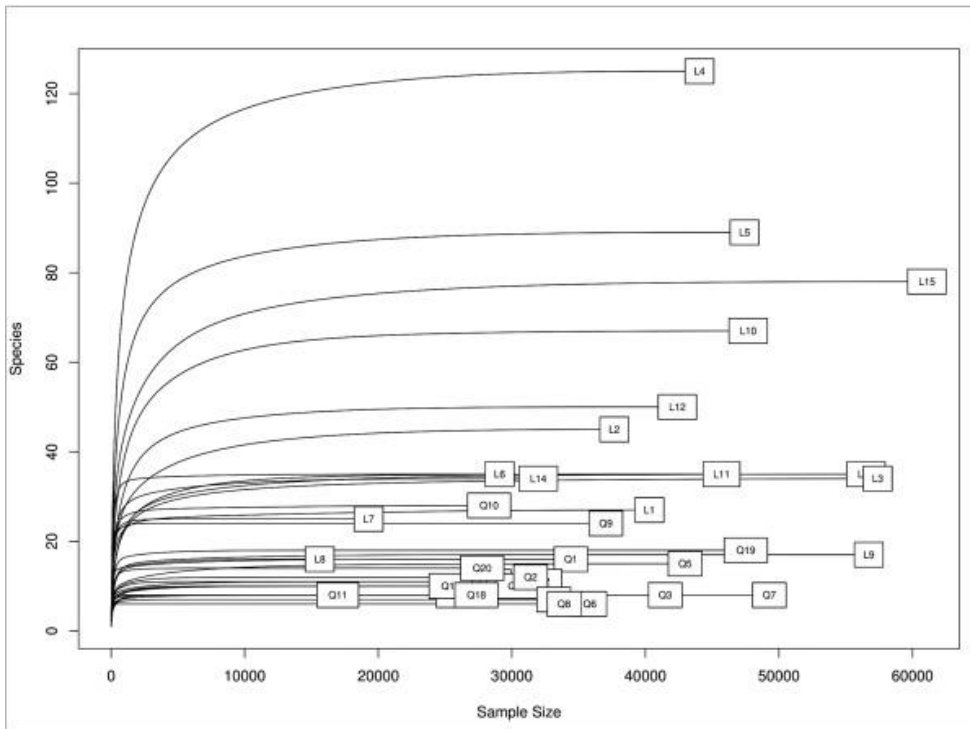


Figure S2. Rarefaction curves indicating microbial diversity. The observed curvature of the number of species and number of variants is represented for both milk and cheese

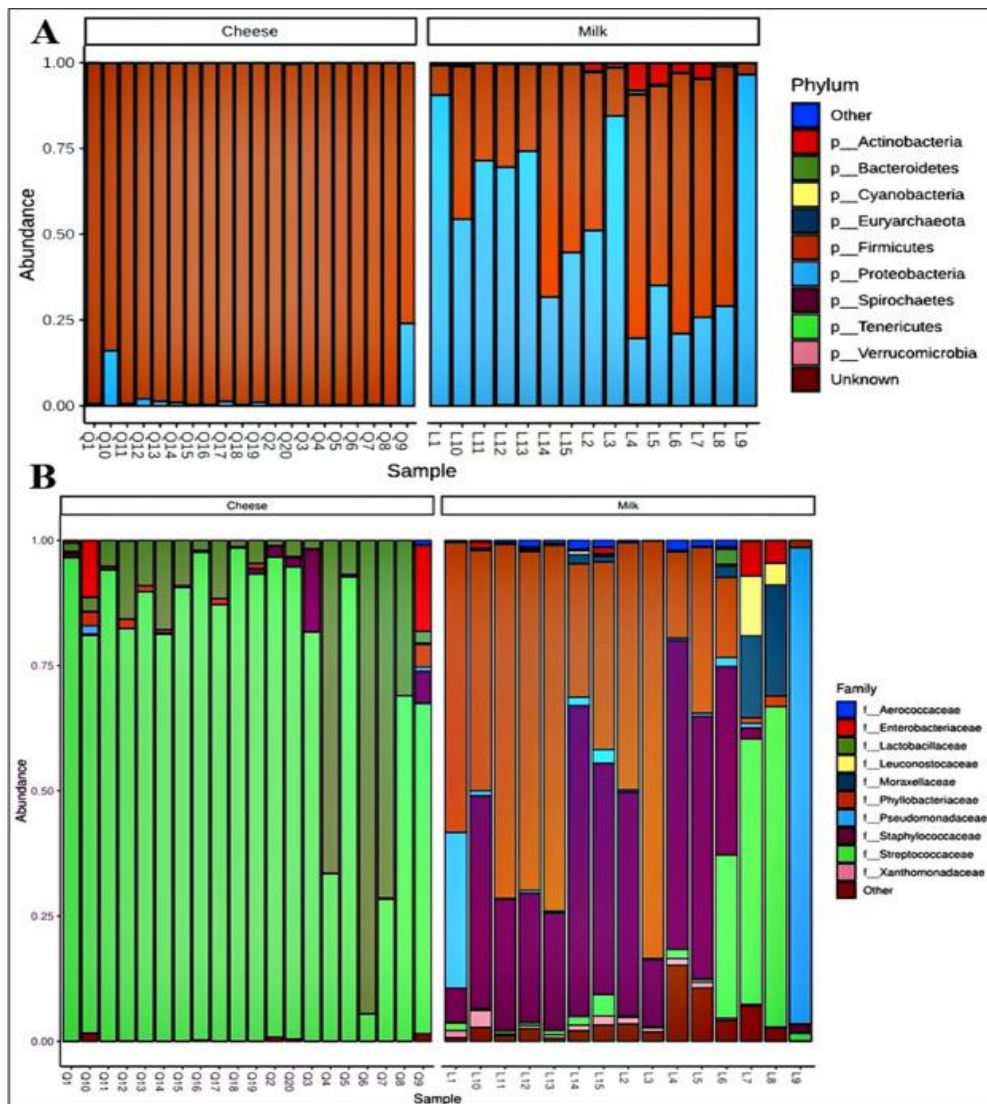


Figure S3. Representation of the relative abundance of bacterial taxa based on 16S rRNA gene sequencing at the class (A), order (B), and family (C) level for milk and cheese samples. Vertical bars indicate the average relative abundance of bacterial sequences present. Strings that could not be assigned are colored brown and labeled "Other".

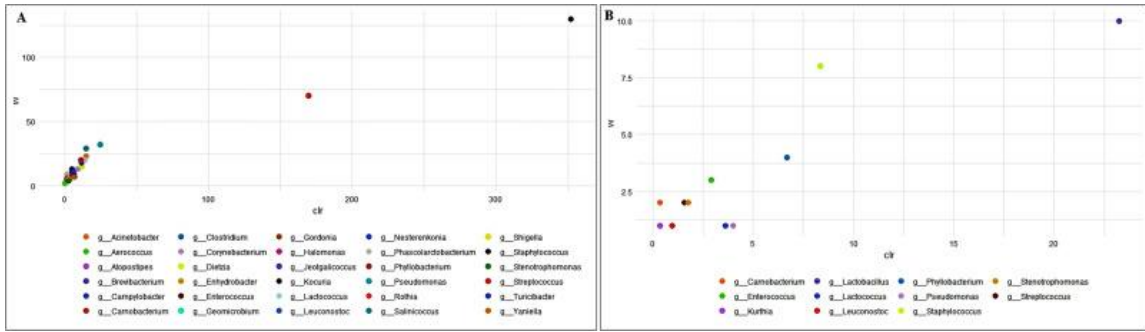


Figure S4. Differential abundance analysis of milk (A) and cheese (B) bacterial communities

Supplementary tables

Table S1. Location of collection of sheep milk and cheese samples

	Sample ID	Group	State of collection	Geographical coordinates
Milk samples	L1	Farm 1	Santa Catarina	-27.040.020/-52.651.795
	L2			
	L3			
	L4			
	L5			
	L6	Farm 2	Rio Grande do Sul	-29.175.771/-51.432.307
	L7			
	L8			
	L9			
	L10			
	L11	Farm 3	Santa Catarina	-26.857.761/-52.569.023
	L12			
	L13			
	L14			
	L15			
Cheese samples	Q1	Feta-type	Rio Grande do Sul	-29.175.771/-51.432.307
	Q2			
	Q3			
	Q9			
	Q10			
	Q4	Colonial	Santa Catarina	-27.040.020/-52.651.795
	Q5			
	Q6			
	Q7			
	Q8			
	Q11	Fresh	Santa Catarina	-26.857.761/-52.569.023
	Q12			
	Q13			
	Q14			
	Q15			
	Q16	Pecorino-type	Rio Grande do Sul	-29.175.771/-51.432.307
	Q17			
	Q18			
	Q19			
	Q20			

Table S2. Information of different types of cheese evaluated in the present study. Each group had 5 analyzed samples

Cheese type	Maturation days	Moisture (%)	Starter Cultures	Cheese production process
Feta-type	0	45.9	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> and <i>Lactobacillus casei</i>	Sheep milk is kept refrigerated at a temperature of 4 °C to 8 °C until it is ready to be processed. Initially the milk is standardized in terms of its fat content and after pasteurized at a temperature of 65 °C for 30 min. or 75 °C for 15 seg; then the coagulant, the calcium chloride to the culture are added, the coagulation is carried out at 35 °C for approximately 40 min. After curdling, the curd is cut into cubes 2 cm edge and left to rest for 10 min, after draining the serum. The curd (without ripening) is molded. The salting process for this type of cheese is usually dry (Katsiari et al., 2002 Katsiari et al., 1994).
Colonial	20	38.3	<i>Lactobacillus helveticus</i>	After the milk arrives at the dairy it is pasteurized using a plate pasteurizer at 75 °C for 15 sec or it can be pasteurized slowly at a higher temperature and shorter time, then the initial culture is added and a pre-maturation of approximately 30 min after adding calcium chloride and coagulant. Upon reaching the clotting point approximately 45 min, the curd is cut with the aid of horizontal and vertical liras. Then it is shaped, pressed and salted in brine at the 20% convent. The cheese is then dried, packaged and matured at a temperature of 6 °C for an average of 15 days (Mattiello et al., 2018).
Fresh	0	44.6	<i>Lactobacillus helveticus</i>	For the production of fresh cheese, milk is pasteurized; then, cooled to 37 °C, to add calcium chloride (50% solution), initial culture, microbial coagulant. The milk is kept at 37 °C for 40 min to coagulate. The curd is cut and placed in forms and salted, after being packaged and stored in a cold chamber at 5 °C

to 7 °C, the minas cheese is marketed after its manufacture not being ripened (Alves et al., 2011; Gomes et al., 2011).

Pecorino- type	45	35.9	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> and <i>Lactobacillus casei</i>
-------------------	----	------	---

Raw milk is pasteurized and then cooled to 38-40 °C, added to the starter culture, calcium chloride, coagulant and kept at a temperature of approximately 30-35 °C until coagulation occurs, on average, 30 min. After cutting the curd, resting the dough, cooking the dough and removing the whey, hanging and salting. Maturation takes place in chambers at 10-15 °C, varying according to the type of pecorino cheese (Azarias, 2017; Coda et al., 2006).

Table S3. Number of reads before and after DADA2 pre-processing

	Sample ID	Group	Number of raw reads	Number of reads after pre-processing
Milk samples	L1		110,195	40,299
	L2		94,357	37,670
	L3	Farm 1	122,753	57,389
	L4		106,900	44,046
	L5		124,400	47,421
	L6		75,048	29,083
	L7		104,339	19,276
	L8	Farm 2	90,478	15,617
	L9		102,038	56,728
	L10		107,033	47,690
	L11		89,477	45,701
	L12		94,825	42,395
	L13	Farm 3	134,160	56,516
	L14		82,726	31,980
	L15		129,067	61,075
Cheese samples	Q1		102,793	34,421
	Q2		94,822	31,402
	Q3	Feta-type	125,065	41,490
	Q9		130,975	37,038
	Q10		106,224	28,293
	Q4		89,395	33,136
	Q5		121,728	42,972
	Q6	Colonial	93,217	35,837
	Q7		105,441	49,278
	Q8		108,666	33,910
	Q11		53,314	16,969
	Q12		96,665	32,120
	Q13	Fresh	89,508	28,308
	Q14		83,171	29,688
	Q15		86,374	30,410
	Q16		77,320	25,951
	Q17		83,693	25,421
	Q18	Pecorino-type	78,060	27,346
	Q19		139,229	47,519
	Q20		82,729	27,783

Table S5. Alpha diversity analysis of evaluated samples. The p values are provided. Bold numbers show statistically

		Shannon	Chao1
Milk			
Farm 1	Farm 2	0.31	0.96
	Farm 3	0.63	0.68
Farm 2	Farm 3	0.60	0.58
Cheese			
Colonial	Feta-type	1.00	0.04
	Fresh	0.55	0.17
	Pecorino-type	0.22	0.14
Feta-type	Fresh	0.84	0.11
	Pecorino -type	0.22	0.29
Fresh	Pecorino-type	0.31	1.00

significant differences.

5. DISCUSSÃO

5.1 Segurança microbiológica das amostras

Este trabalho caracterizou 35 amostras de leite cru de ovelha da raça Lacaune e queijos produzidos na região Sul do Brasil. A segurança destes produtos é um ponto importante, pois a produção está crescendo no Brasil e pouco se conhece sobre leites de ovelha e seus derivados. A análise microbiológica de microrganismos aeróbicos mesófilos (MA), coliformes totais (CT), *E. coli* e *S. aureus* foi realizada pela técnica de petrifilm™ (3M Company, St, Paul, MN, EUA). Foi possível observar que as contagens de microrganismos variaram de acordo com a fazenda de coleta e que as amostras de leite apresentaram maiores contagens, o que já é esperado por ser leite cru, enquanto que os queijos são produzidos com o leite pasteurizado o que reduz a quantidade de microrganismos presentes.

O *S. aureus* que foi um dos microrganismos avaliados no estudo é o de maior preocupação devido às suas características patogênicas. Este microrganismo foi observado em amostras de leite cru de ovelha e de queijo. Nas 35 amostras de leite e queijos analisadas verificou-se que 20 (57,1%) continham a presença de *S. aureus*. A presença de *S. aureus* em amostras queijos tende a ser devido uma recontaminação que pode ter ocorrido durante a fabricação, em razão da presença de manipuladores de alimentos que são naturalmente potenciais reservatório e veículo de transmissão do microrganismo, muitas vezes de cepas virulentas e resistentes a antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 2022).

O *S. aureus* é um dos principais patógenos associados a surtos ocasionados por alimentos no Brasil. O *S. aureus* é conhecido por transmitir doenças por alimentos, consideradas como importante problema de saúde pública. Estima-se que 600 milhões de pessoas adoecem anualmente devido ao consumo de alimentos contaminados em todo o mundo e 66% desta contaminação é ocasionada por bactérias (ABEBE; GUGSA; AHMED, 2020).

A capacidade do microrganismo em adquirir resistência aos antimicrobianos é notória e já estabelecida pela literatura; *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é conhecido por sua resistência à meticilina, oxacilina e outros. Atualmente é observado MRSA em alimentos e animais produtores de alimentos no mundo todo, o que é um fator de preocupação pois representa uma grande ameaça à saúde humana em todo devido às inúmeras toxinas que pode produzir (DA SILVA; RODRIGUES; SILVA, 2020). Mesmo que as amostras positivas para MRSA no presente estudo sejam de leite cru de ovelha, continua sendo uma preocupação pois os genes de resistências e as enterotoxinas se mantêm no produto após o processamento.

Todas as apresentaram contagens significativas de bactérias mesófilas, *E. coli* e coliformes totais indicando uma diferença significativa entre as amostras, independentemente da fazenda de coleta.

As contagens de microrganismos foram superiores nas amostras de leite cru de ovelha do que do queijo, esse comportamento já foi descrito em outros estudos (PENNA; GIGANTE; TODOROV, 2021). De acordo com o autor, o processo de pasteurização influencia a segurança do produto, pois pode reduzir ou mesmo eliminar potenciais bactérias patogênicas e deteriorantes que possam estar presentes no leite cru. Além da pasteurização, o controle sanitário do rebanho, a padronização do processo de fabricação, a redução do pH, a retirada de água e a adição de sal na produção dos queijos são condições que favorecem segurança microbiológica desses produtos, conforme descreve o autor citado.

5.2 Enterotoxinas estafilocócicas

No mundo todo *S. aureus* é um dos principais causadores de doenças transmitidas por alimentos (SENGUN *et al.*, 2021). Algumas cepas desses microrganismos são responsáveis pela produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE) capazes de provocar intoxicações, a partir da ingestão da toxina pré-formada nos alimentos. Um ponto importante é que os microrganismos podem ser destruídos pelo calor, sob temperaturas não muito altas (65 °C) por 30 minutos, mas a toxina formada é termorresistente, podendo se manter no alimento após o seu processamento (LEHR; KLEINA; PEREIRA, 2022).

Das 20 amostras avaliadas neste trabalho, 1 amostra de leite cru de ovelha foi positiva para enterotoxina estafilocócicas (SE), nas amostras de queijos não foi detectado a presença. Cretenet; Even; Le Loir, (2011) discute em seu trabalho os parâmetros relacionados à fabricação de queijos que afetam a produção de SE. O queijo é um alimento complexo contendo diversos nutrientes que podem ser aproveitados pela SE como fontes de energia e carbono. Além de que o tipo de queijo, a composição do leite usado na fabricação e a concentração de nutrientes são fatores que afetam a sua produção também. Além do pH, a temperatura também contribui para a produção de SE. A temperatura ótima para a produção de SE é de cerca de 32 °C e a temperatura mais baixa que permite a produção de SE é de cerca de 20 °C, enquanto em 10 °C o crescimento de *S. aureus* ocorre de forma lenta e não é capaz de produzir enterotoxinas, bem como quando em contato com concentrações baixas de NaCl (Cloreto de sódio).

A contagem de células viáveis é utilizada para determinar se um alimento é seguro para consumo humano, porém se faz necessário a utilização de técnicas mais

sofisticadas para avaliar os níveis de enterotoxinas bem como investigar e identificar as condições que previnem ou estimulam a produção de enterotoxinas, a fim de garantir a qualidade dos alimentos e a saúde dos consumidores.

5.3 Microbiota dos leites e queijos

Descrevemos aqui a primeira caracterização detalhada da microbiota do leite de ovelhas leiteiras da região Sul do Brasil, usando o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S *rRNA*. Este estudo é baseado na análise da região hipervariável V4 do 16S *rRNA*, essa é uma técnica eficiente na captura de dados da comunidade bacteriana, ademais fornece uma descrição segura da diversidade bacteriana do leite de ovelha (ZHANG et al., 2018). Os filos, predominantes identificados em nosso estudo, foram Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria já descritos em leite, soro de queijo, queijo de vaca, queijo de ovelha (DA SILVA DUARTE et al., 2020; GIELLO et al., 2017; PASQUALE; CAGNO, 2019; RAMEZANI et al., 2017; TILOCCA et al., 2020; VERDIER-METZ et al., 2012).

Se compararmos da microbiota do leite cru de ovelha produzido em fazendas de diferentes regiões, bem como queijos de diferentes tipos com distintos períodos de maturação. As famílias Phyllobacteriaceae, Staphylococcaceae, Pseudomonadaceae, Streptococcaceae e Moraxellaceae foram predominantes nas amostras de leites, enquanto as amostras de queijos apresentaram em maior abundância as bactérias da família Streptococcaceae, Lactobacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae. A contaminação por microrganismos da família Staphylococcaceae, pode ser decorrente da falta de higienização durante a ordenha, mastite, manipulador (JÚNIOR, 2017).

Os gêneros *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* já foram descritos em leite de ovelha (ESTEBAN-BLANCO et al., 2019). No presente trabalho, os resultados mostraram que o gênero *Phyllobacterium* (42,59%), foi predominante assim como os gêneros *Staphylococcus* (29,20%), *Pseudomonas* (10,96%), *Lactococcus* (5,10%), *Acinetobacter* (1,38%), também apresentaram alta abundância nas amostras de leite cru coletados em diferentes fazendas. Os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, pertencentes ao grupo das bactérias Gram-negativas, são geralmente consideradas uma das principais causas de deterioração do leite e falta de higiene, porém alguns gêneros como *lactobacillus* e *lactococcus* podem desempenhar um papel positivo nas características sensoriais do leite e até apresentar fatores positivos na fabricação de queijos (HUANG et al., 2019).

A alta diversidade microbiana do leite cru é proporcionada pela característica composição deste alimento. O alto percentual de gordura, proteínas, vitaminas, entre

outros componentes favorecem o desenvolvimento dos microrganismos, assim como, pH e atividade de água (aw), que proporcionam características marcantes na produção de queijos, acarretando sabores e texturas de alto valor mercadológico (JUNIOR et al., 2015).

Os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, foram os mais abundantes nas amostras de queijos. A abundância de *Lactobacillus* spp. já foi relatada anteriormente em queijos, a sua abundância é comum, pois tem facilidade de se adaptar em condições altamente seletivas existentes no queijo, como baixo pH e altas concentrações de sal, isso explica a maior incidência de *Lactobacillus* em queijo colonial (KAMIMURA et al., 2019). A alta abundância dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, está associada ao uso de culturas iniciadoras no processo de fabricação de queijos, tendo em vista que esses são os principais microrganismos presentes nessas culturas conhecida como starters (MANGIA et al., 2011). Essas culturas apresentam interferência positiva na fabricação de queijos, influenciando as características organolépticas do produto.

Lactobacillus delbrueckii foi observado em maior abundância em queijos Coloniais e Frescal, essa característica pode estar associada a cultura iniciadora utilizada por ambas as fazendas de produção é a mesma. *Staphylococcus equorum* foi observado no queijo Frescal, essa espécie já foi observada em salsichas fermentadas, em ambientes de processamento de alimentos e na superfície de queijos, e podem estar associadas ao uso de culturas iniciadoras (IRLINGER et al., 2012).

A classificação taxonômica e a relação entre as amostras a nível de gênero, foram observadas pelo mapa de calor. Foi possível observar uma comunidade bacteriana conservada nas amostras dos diferentes tipos de queijos, quando comparado aos leites, isso pode ser atribuído ao tratamento térmico do leite durante a pasteurização (VAN HOORDE et al., 2010). Ainda, foi verificado que os gêneros *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. compreendem a microbiota nuclear dos queijos analisados, isso foi ocasionado pela utilização de culturas starters.

Esse resultado foi sustentado também pelo cluster hierárquico baseado na distância do UniFrac ponderado entre as amostras, pois foi observado um agrupamento entre as amostras de queijos. As amostras se agruparam em dois grandes clados, sendo um as amostras de queijos e três amostras de leite coletadas na Fazenda 2, possivelmente isso foi causado por um número reduzido de ASV's nessas amostras. O segundo clado foi composto pelas demais amostras de leites, resultado esse esperado devido à alta riqueza e abundância microbiana do leite cru.

Esses dados corroboram com os encontrados na literatura, estudos realizados usando o sequenciamento do gene *16S rRNA* revelaram comunidades microbianas

muito semelhantes em queijos mussarela, grana padano e parmigiano reggiano e também identificaram *Lactobacillus* spp. como o gênero predominante (MARINO et al., 2019). Da mesma forma, os gêneros *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. foram identificados como predominantes em diferentes tipos de queijos feitos com leite de vaca e de búfalo (LEROY; DE VUYST, 2004; MEDEIROS et al., 2016; PISANO et al., 2016). O gênero *Streptococcus* spp. foi descrito como dominante no queijo do Cerrado, enquanto os gêneros *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Leuconostoc* spp. também foram relatados no queijo Canastra (BONFIN; DA SILVA, 2017). Estudos mostram que o *Streptococcus* tem grande influência na textura, sabor e aroma dos produtos de queijo, além de produzir bacteriocinas que protegem o produto da deterioração microbiana (ZHONG et al., 2016).

Além de desempenhar um papel fundamental nas características organolépticas do queijo, alguns gêneros de microrganismos atuam de forma benéfica no organismo humano, apresentando características probióticas, como algumas espécies de *Lactobacillus*, descritas no presente estudo com maior abundância no queijo colonial. Os queijos possuem propriedades que favorecem o desenvolvimento e manutenção de culturas probióticas, como pH (4,8 - 5,4) e baixo teor de oxigênio dissolvido, garantindo a viabilidade dessas culturas. Além disso, os queijos costumam ter alto teor de gordura, o que atua como protetor das bactérias na passagem intestinal, ajudando a sua eficácia (SILVA, 2013). Os queijos estudados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* incluem cheddar, gouda, cottage, fresco, minas fresco e queijo de cabra (SOUZA, 2006). O desenvolvimento de queijos com propriedades probióticas é um tema atual de pesquisa, pois tem influências positivas na saúde e é uma importante direção de inovação no desenvolvimento de produtos.

A diversidade entre as amostras de leites e queijos também foi observada na análise de alfa diversidade, avaliada pelas métricas de Shannon e Chao1. Foi observado diferença pela métrica de Chao1, entre os queijos tipo Feta e Colonial, essa diferença ocorreu devido a maior diversidade no queijo tipo Feta. A menor diversidade em queijo colonial pode estar associada ao processo de maturação. Com as condições específicas nesse processo, ocorre a seleção das bactérias iniciadoras utilizadas, essas podem liberar bacteriocinas, que podem causar bacteriolise, induzindo por exemplo o processo de autolisinas, ou seja auto degradação da célula, ou até mesmo desregulando a ação enzimática devido à deficiência energética, o que resultará em degradação da parede celular e consequente lise celular, causando a morte do microrganismo (LEROY; DE VUYST, 2004).

Já na análise de diversidade beta, foi observado diferenças entre amostras de leite de diferentes fazendas e diferentes tipos de queijos, essas dissimilaridades entre

as amostras, confirmam que as condições de processamento, armazenamento e maturação são importantes para a microbiota do queijo (PISANO et al., 2016). A distância da diversidade beta é um critério importante para avaliar a diversidade de espécies entre diferentes amostras (PASTORE, 2016). Essa métrica leva em conta a abundância relativa de ASVs sequenciados no leite e queijo amostrados de três fazendas. O PCoA foi usado para analisar as diferenças na composição das comunidades bacterianas entre as amostras, usando as métricas de distância ponderada de Bray-Curtis e distância UniFrac.

As amostras de leite provenientes da fazenda 1 apresentaram diferença dos leites produzidos na Fazenda 2 e 3 a nível de gêneros, pela métrica de Bray-Curtis, essas diferenças podem estar associadas à alimentação das ovelhas, doenças das glândulas mamárias e práticas de ordenha empregadas (PELLEGRINI, 2012). A métrica Bray-Curtis, apontou diferenças entre os queijos frescal e tipo pecorino, já a métrica de Weighted UniFrac apontou diferenças entre os grupos do queijo colonial e tipo feta, isso pode ter ocorrido devido à baixa diversidade de ASV's no grupo dos coloniais, ademais pode estar associado à maior abundância dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, que podem influenciar o crescimento de outros microrganismos e até inibi-los. Assim, *Lactobacillus* e *Streptococcus* podem ser apontados como responsáveis pela “manutenção” da microbiota nos queijos avaliados. Outro ponto a ser mencionado é que estudos anteriores sobre microbiota de queijo mostraram maior biodiversidade em queijos feitos a partir de leite cru quando comparados aos pasteurizados. Portanto, esperava-se encontrar baixa diversidade nos queijos analisados no presente estudo, uma vez que foram produzidos a partir de leite pasteurizado (DELCENSERIE et al., 2014). Novos estudos são necessários para elucidar os possíveis efeitos benéficos dos microrganismos utilizados como culturas iniciadoras nos queijos em relação aos parâmetros sensoriais, físico-químicos e funcionais da comunidade microbiana.

5.4 Isolamento e identificação de *Staphylococcus*

O isolamento de *Staphylococcus* spp. foi realizado com o objetivo de identificar as espécies presentes no leite cru de ovelha e no queijo frescal, colonial, tipo-feta e tipo-pecorino. Os isolados foram identificados por meio da metodologia VITEK 2. A análise mostrou diversidade microbiana entre os isolados, obtendo-se diferentes espécies. Antes de ser identificado no VITEK, os isolados foram identificados por meio de métodos fenotípicos convencionais, como o estudo dos perfis de fermentação de açúcares ou de outras características bioquímicas, como catalase, coagulase e coloração de gram.

A qualidade do leite cru está relacionada principalmente às condições de higiene do sistema de ordenha, transporte e armazenamento, podendo também estar associada

doenças animais, como mastite e outras enfermidades, que podem ser responsáveis pela presença de bactérias patogênicas no leite. O gênero *Staphylococcus* compreende mais de 40 espécies e subespécies que são divididas em dois grupos: estafilococos coagulase-positivos (coPS) e estafilococos coagulase-negativos (coNS). O principal patógeno pertencente ao grupo dos coagulase positiva é o *S. aureus*, este é responsável por 4,1% a 18,0% das infecções bacterianas intramamárias, além de ser responsáveis por produzir toxinas que podem causar intoxicação alimentar estafilocócica e outros tipos de infecções em humanos (ROLA *et al.*, 2015).

A alta frequência de *Staphylococcus* spp. indica que a segurança microbiológica dos queijos está comprometida, além de que as práticas higiênico-sanitárias podem estar inadequadas na cadeia produtiva do leite de e seus derivados. As espécies de microrganismos envolvidos na contaminação das etapas de obtenção e elaboração deste tipo ainda não estão elucidadas no Brasil. Com a utilização do VITEK 2 detectamos a ocorrência de algumas espécies de como *S. sciuri*, *S. Simulans*, *S. aureus*, *S. lentus*, *S. warneri*, *S. pseudintermedius* e *S. chromogenes*.

O *S. sciuri* é descrito como um patógeno raro e oportunista em humanos. Esta espécie é pouco descrita em casos de surtos alimentares, e é destacada por ter resistência já conhecida em diversas classes de antimicrobianos (IRLINGER, 2008). *S. sciuri* foi a espécie de maior prevalência nas amostras de leite cru de ovelha neste estudo e foi possível observar que a maioria das cepas isoladas apresentaram perfil de resistência e até multirresistência, o que corrobora com os dados apresentados na literatura.

O *S. simulans* é um estafilococo coagulase negativo, esse é um patógeno animal e responsável por causar mastite acometendo vacas, ovelhas, cabras e cavalos. Ocasionalmente, pode colonizar a pele humana, sendo raramente relatadas infecções em humanos (LAL *et al.*, 2018).

Soares *et al.*, (2011) isolou *S. equorum* (41 isolados, 39,0%), *S. saprophyticus* (28 isolados, 26,7%) e *S. epidermidis* (15 isolados, 14,3%) de amostras de queijos produzidos com leite cru de ovelha em um laticínio de Portugal. Nenhuma dessas espécies foi identificada no presente estudo.

5.5 Susceptibilidade antimicrobiana e genes de resistência

O teste de resistência antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em disco descrito nas diretrizes do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Os antimicrobianos testados por este método foram ampicilina (AMP) (10 µg), linezolid (LNZ) (30 µg), rifampicina (RIF) (5 µg), sulfazotrim (SUT) (25 µg). Além dessa metodologia foi utilizado os cartões AST do VITEK 2, com essa técnica foi determinado

a susceptibilidade antimicrobiana dos seguinte antimicrobianos: benzilpenicilina (BENPEN), oxacilina (OXA), cefalotina (CFL), cefovecina (CVN), ceftiofur (CEF), enrofloxacina (ENR), marbofloxacina (MRB), pradofloxacina (PRA), amoxicilina/ácido clavulânico (AUG), canamicina (K), gentamicina (GEN), neomicina (N), eritromicina (ERI), clidamicina (CLI), tetraciclina (TET), doxiciclina (DXT), cloranfenicol (CLO), nitrofurantoínas (F) e trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

A avaliação foi realizada para todos os 39 isolados independentemente da espécie de *Estafilococos*. No Brasil vários estudos são realizados todos os anos, a fim de avaliar o perfil de resistência de cepas de estafilococos presentes em produtos lácteos. No Estado de São Paulo Rodrigues *et al.*, (2017), avaliaram o perfil de resistência de 100 isolados de *S. aureus* provenientes de plantas de produção de queijos do tipo minas, os autores encontraram diferença significativa entre os queijos produzidos com leite pasteurizado e leite cru, obtendo maior isolamento nas amostras de leite cru. Além disso, os autores encontraram diversas cepas de *S. aureus* resistentes a diversos antimicrobianos, porém com maior resistência penicilina.

Neste estudo, a penicilina que apresentou o maior número de cepas resistentes foi a oxacilina, sendo superada somente pelo β -lactâmico cefovecina que apresentou resistência em 79,2% das cepas avaliadas. Já as cepas isoladas das amostras de queijos apresentaram maior resistência ao antimicrobiano rifampicina. Dois mecanismos de resistência diferentes são responsáveis principalmente pela A resistência a β -lactâmicos em estafilococos é definida por dois mecanismos, inativação enzimática pela β -lactamase codificada por *blaZ* que confere resistência às penicilinas, exceto isoxazolil-penicilinas, e o segundo é pela substituição do sítio alvo pelos produtos gênicos do genes *mecA* ou *mecC*, ambos os genes *mec* codificam proteínas alternativas de ligação à penicilina com afinidade reduzida para praticamente todos os antimicrobianos β -lactâmicos, além de que a cepa que expressar o gene *mecA* devem ser considerados resistentes à todos os antimicrobianos β -lactâmicos (WENDLANDT *et al.*, 2013).

A discussão dos dados encontrados no presente estudo fica dificultada pela escassez dos estudos em relação a leite de ovelha e seus derivados na literatura. Os resultados indicam a necessidade de controle e normas para produtos dessa origem que estão em ascensão no Brasil.

6. CONCLUSÕES

As amostras de leites apresentaram maior diversidade no microbioma quando comparados aos queijos. As comunidades bacterianas nos queijos frescal, tipo feta, colonial e tipo pecorino são altamente influenciadas pelas comunidades bacterianas da

cultura starter. No entanto, também foi observada variação entre alguns grupos de queijos, sugerindo que as condições de processamento, armazenamento e maturação são fatores importantes para a microbiota do queijo. Os gêneros *Phyllobacterium* spp. e *Staphylococcus* spp dominaram a composição microbiana do leite enquanto a microbiota nuclear dos queijos foi composta por *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., relacionados às culturas iniciadoras utilizadas no processo de fabricação de queijos.

Os resultados indicam que apesar da baixa qualidade microbiológica das amostras de leite cru, os resultados obtidos nas amostras de queijos foram satisfatórios, o que possivelmente está relacionado ao processo de pasteurização, que é capaz de reduzir tanto os microrganismos patogênicos quanto a microbiota inicial do leite. Assim, a maioria dos queijos produzidos são seguros para consumo.

A presença de enteroxinas e a resistência antimicrobiana são problemas de saúde pública. O uso indiscriminado de antimicrobianos em animais contribui para a resistência. Para reduzir este problema, é necessário intensificar a fiscalização sobre a produção, distribuição e uso de antimicrobianos. Além disso, é necessário apoiar os produtores no uso correto e racional desses antimicrobianos, indicando novas formas de combater as infecções.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, E.; GUGSA, G.; AHMED, M. Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, [s. l.], v. 2020, 2020.
- ABOLGHAIT, S.K.; FATHI, A.G.; YOUSSEF, F.M.; ALGAMMAL, A.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and giblets often produces staphylococcal enterotoxin B (SEB) in non-refrigerated raw chicken livers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 328, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108669>
- AGUIAR, R.A.C. et al. Graduate Student Literature Review: Enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses. *Journal of Dairy Science*, v. 105, Issue 7, p. 5685-5699, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21634>
- ALMEIDA, T. et al. The complex microbiota of artisanal cheeses interferes in the performance of enumeration protocols for lactic acid bacteria and staphylococci. *International Dairy Journal*, [s. l.], v. 109, p. 104791, 2020.
- AL-TARAZI, Y.; ALBETAR, M.; ALABOUDI, A. Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International*.v. 42, p. 374-379, 2009

- AMARAL, S. M. B. et al. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218*, 2(11), 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i11.935>
- ANGELIDIS, A.S. et al. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from milk of dairy goats under low-input farm management in Greece. *Veterinary Microbiology*, v. 247, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108749>
- ARGUDÍN, M.A; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*, v. 2 (2010), p. 1751-1773, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- ASSUMPÇÃO, E. G. et al. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 366–370, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352003000300019&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 24 jul. 2020.
- AZEREDO, H. M. C. D.; ET AL. Fundamentos de estabilidade de alimentos. [S. l.: s. n.], 2012-. ISSN 0031-9023. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/259054710>. Acesso em: 17 jun. 2022.
- BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BARREIRA, A. Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beira Baixa com base em contagem de células somáticas. 2008. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA FACULDADE, [s. l.], 2008.
- BARROS, G. S. de C. China-Brazil partnership on agriculture and food security. [S. l.]: Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2020.
- BHATIA, A.; ZAHOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 1, p. 188-197, 2007.
- BIANCHI, A. E. Caracterização dos sistemas produtivos de ovinos de leite no Brasil. Paraná: [s. n.], 2017. Disponível em: [https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-. .](https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-.)
- BIOMÉRIEUX – Vitek® 2 compact, 2022. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/vitekr-2-compact>
- BIOMÉRIEUX, S. A. VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2) bula do kit. Marcy-l’Etoile, 2008.
- BLAHA, T. The use of antimicrobial substances in food animals: the pig picture. 2011.
- BLEICHER, A.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Vibrio casei* sp. nov., isolated from the surfaces of two French red smear soft cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 60, n. 8, p. 1745–1749, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19749036/>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- BONFIN, J.; DA SILVA, R. Caracterização físico-química de queijo maturado por culturas

- autóctones. 2017. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.
- BOONSIRI, T. et al. Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. *Scientifical Reports*, 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73796-5>
- BORA, N. et al. *Agrococcus casei* sp. nov., isolated from the surfaces of smear-ripened cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 92–97, 2007. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ij.s.0.64270-0>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. De. Microbiota e conservação do leite. *Microbiota and coservation of milk*, [s. l.], p. 76–89, 2014.
- BRASIL. Decreto Nº 9.013 de 29 de Março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). 2017. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D30691impresao.htm#regulamento. Acesso em: 24 jul. 2022.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 27 dez. 2021.
- BRASIL. Portaria Nº 146, DE 07 DE MARÇO DE 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. 1996. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>. Acesso em: 24 jul. 2022.
- BRASIL. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITE CRU REFRIGERADO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2018. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN 76. Acesso em: 7 jul. 2022.
- CÂMARA, Fernando Portela. Variabilidade e adaptação: as bases genéticas da teoria da evolução. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Rio de Janeiro: UFRJ, 2011. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufrj.br/component/k2/item/232-epidemiologia-de-doen%C3%A7as-infecciosas>
- CARFORA, V. et al. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *International Dairy Journal*, v. 42, p. 12 e 15, 2015.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 12th Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CONNEL, S.R.; TRACZ, D.M.; NIERHAUS, K.H.; TAYLOR, D.E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3675-3681, 2003.
- CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: A review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science and Technology*, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 127–150, 2011.
- DA SILVA DUARTE, V. et al. Comparative evaluation of cheese whey microbial composition from four Italian cheese factories by viable counts and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *International Dairy Journal*, [s. l.], v. 104, p. 104656, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694620300261>>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- DA SILVA, A. C.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N. C. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 347–356, 2020.
- DA SILVA, C. C. Estudo da oferta de queijos de leite de ovelha e adequação da rotulagem dos produtos com a legislação vigente. 2013. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/80508>. Acesso em: 19 out. 2020.
- DALMASSO, A. et al. Caracterização da microbiota em queijo Plaisentif por sequenciamento de alto rendimento. *LWT - Food Science and Technology*, [s. l.], v. 69, p. 1–21, 2018.
- DELCENSERIE, V. et al. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese , Herve cheese , using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science*, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 6046–6056, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8225>>
- DIDIENNE, R. et al. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology*, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 91–101, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22483401/>>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*, v. 46, p. 11-21, 2008.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014, v. 12, 312 pp., 2014.
- ESTEBAN-BLANCO, C. et al. Microbiota characterization of sheep milk and its association with somatic cell count using 16s rRNA gene sequencing. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 73–83, 2019.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health

- significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. The EFSA Journal, 993, 1–73, 2009.
- FAION, A. Elaboração e caracterização de queijo tipo amanteigado de leite ovino concentrado por ultrafiltração. 2015. Universidade Regional Integrada Do Alto Uruguai E Missões - URI, [s. l.], 2015.
- FEITOSA, A.C. et al. *Staphylococcus aureus* em alimentos. Revista Desafios, v. 04, n. 04, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15>.
- FERREIRA, L. R. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO, MINAS GERAIS, POR MÉTODOS CULTURA DEPENDENTE E INDEPENDENTE. 2021.
- FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews, v. 14, p. 836-871, 2001.
- FOX, E.M.; JIANG, Y.; TINOCO, M.B. *Staphylococcus aureus* – Dairy. Encyclopedia of Dairy Sciences (3rd ed.). Academic Press, p. 522-529, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22986-7>
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.
- GIELLO, M. et al. Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. Food Microbiology, [s. l.], v. 63, p. 170–177, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.016>
- GÓMEZ, C.; PINAL, L.; FRANCO, J.; CARRILLO, J.M.; RAMÍREZ, J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in México. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 117, p. 249–253, 2007.
- GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. Guia de Antimicrobianos em Veterinária, Porto Alegre: Artmed, 2010.
- GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. Ciência e Agrotecnologia, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 216–222, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542005000100027&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 24 jul. 2022.
- GUILLAUME, G.; LEDENT, V.; MOENS, W.; COLLARD, J.M. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. Microbial Drug Resistance, v. 10, p. 11-26, 2004.
- GUIMARÃES, V. P. et al. The future of small ruminants in Brazil: Lessons from the recent period and scenarios for the next decade. Small Ruminant Research, [s. l.], v. 209, n. February, 2022.
- HALMENSCHLAGER, S. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REFRIGERAÇÃO E DO CONGELAMENTO DO LEITE DE OVELHA NAS CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TIPO GOUDA. 2020. 1–83 f. - Universidade do Vale do Taquari-INIVATES, Lageado, 2020.

- HENNEKINNE, J.A.; BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, v.36, n.4, p. 815-836, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- HU, D.L.; NAKANE, A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *European Journal of Pharmacology*, 722, p. 95-107, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.050>
- HUANG, F. et al. High-throughput sequencing analysis of bacterial diversity in raw and pasteurized goat milk. *bioRxiv*, [s. l.], p. 751149, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/751149>. Acesso em: 29 jul. 2022.
- HUGHES, D. Selection and Evolution of Resistance to Antimicrobial Drugs. *IUBMB Life*, v. 66, 8, p.521-529, 2014.
- In: 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Clinical and Physical Hazards in Pigs and Pork, Maastricht, Anais, v. 1, p.131-133, 2011.
- IRLINGER, F. et al. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 457–462, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653918/>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- IRLINGER, F. et al. Genome Sequence of *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* Mu2, Isolated from a French Smear-Ripened Cheese. *Journals ASM org*, [s. l.], v. 194, p. 5141–5142, 2012. Disponível em: <http://jb.asm.org/>
- IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 302–310, 2008.
- JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. v. 61, p. 220-228, 2010.
- JÚNIOR, F. J. T. M. da S. PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM QUEIJOS TIPO COALHO PRODUZIDOS COM LEITE CRU E COMERCIALIZADOS EM TRÊS MUNICÍPIOS DO AGRESTE PARAIBANO. 2017. Universidade Federal da Paraíba, [s. l.], 2017.
- JUNIOR, I. et al. Ovinocultura leiteira no brasil: aspectos e fatores relacionados à composição, ao consumo e à legislação. *Colloquium Agrariae*, [s. l.], v. 11, p. 38–53, 2015.
- KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiology*, [s. l.], v. 80, p. 40–49, 2019.
- KOCH, A. C. da C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de ovelha e atividade antagonista de sua microbiota láctica. 2014. Universidade de Brasília, [s. l.], 2014. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/18312>. Acesso em: 24 jul. 2022.
- KONEMAN, E. et al. Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido. Sexta edição. Rio de janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.
- KOVAROVIC, V. et al. *Staphylococcus rattii* sp. nov. Isolated from a Lab Rat. *Pathogens*, 11:0, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens11010051>

- LAL, A. et al. First Case of Pleural Empyema Caused by *Staphylococcus simulans*: Review of the Literature. *Case Reports in Infectious Diseases*, [s. l.], v. 2018, p. 1–5, 2018.
- LE LOIR, Y.; HENNEKINNE, J.A. *Staphylococcus*. Detection of staphylococcal enterotoxins. *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed.), Elsevier, p. 494-500, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00319-0>
- LEHR, D. E. S.; KLEINA, D. da R.; PEREIRA, M. G. Incidência De *Staphylococcus Aureus* E Enterotoxina Estafilocócica Em Carne Moída De Bovino Comercializada No Município De Chapecó (Sc). *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 6*, [s. l.], p. 264–274, 2022.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, [s. l.], v. 15, p. 67–78, 2004.
- LEROY, S.; LEBERT, I.; ANDANT, C.; TALON, R. Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 326 (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108653>
- LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, v.10, p. S122-S129, 2004.
- Li, L., Renye, J. A., Feng, L., Zeng, Q., Tang, Y., Huang, L., Ren, D., & Yang, P. (2016). Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7016–7024. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11041>.
- MA, F. et al. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health*, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 32–38, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>.
- MACHADO, R. C. F. Efeito das características físico-químicas no comportamento reológico dos queijos paiva. 2018. [s. l.], 2018.
- MAGALHAES, K. A. et al. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. *CIM - Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos*, [s. l.], v. 11, n. Tabela 1, 2020. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1128480>.
- MANGIA, N. P. et al. Microbiological and physicochemical properties of pecorino Romano cheese produced using a selected starter culture. *Journal of Agricultural Science and Technology*, [s. l.], 2011.
- MARINO, M. et al. Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, [s. l.], v. 79, n. December 2018, p. 123–131, 2019.
- MAUS, D. et al. Avaliação físico-química de queijo maturado produzido a partir de leite de ovelha Crioula e leite misto. *7o Simpósio de Segurança Alimentar*, [s. l.], n. 55, p. 1–4, 2020.
- MCDERMOTT, J. J. et al. Sustaining intensification of smallholder livestock systems in the tropics. *Livestock Science*, [s. l.], v. 130, n. 1–3, p. 95–109, 2010.
- MEDEIROS, R. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. *CyTA-Journal of Food*, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 613–620, 2016. Disponível em:

- <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tcyt20>>
- MEDINA, R. B. et al. Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. *Small Ruminant Research*, [s. l.], v. 101, n. 1–3, p. 84–91, 2011.
- MEDVEDOVÁ, A.; VALÍK, U. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. *Structure and Function of Food Engineering*, InTech, p. 71-102, Chapter: 4, 2012.
- MELO, F.D. et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. isolates recovered from raw milk and artisanal cheese. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(3): e20180925, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180925>
- MOGLAD, E.H. et al. Antibiogram, prevalence of methicillin-resistant and multi-drug resistant *Staphylococcus* spp. in different clinical samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 29, 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103432>.
- MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil. 2021. 1–31 f. - Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.econstor.eu/handle/10419/240854>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- MONTEL, M. C. et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. [S. l.]: Elsevier B.V., 2014.
- MORRISON, L.; ZEMBOWER, T.R. Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, v. 30(4), p. 619-635, 2020. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.giec.2020.06.004>
- MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, [s. l.], v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- NEIHARDT, F. *Bacterial genetics. Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases*. 4ª ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, p. 53-74, 2004.
- NESPOLO, C. R.; BIANCHI, A. E.; QUEIRÓS, A. A.; FATINATTI, L. H. E. A produção de leite ovino e seus derivados no oeste catarinense: uma alternativa para o produtor e para o consumidor. *Simpósio De Segurança Alimentar*, [s. l.], 2012.
- NETO, A.C.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22 (3), p. 263-271, 2002.
- OIKONOMOU, G. et al. Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About?. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 27 jul. 2022.
- OLAIMAT, A.N. et al. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat Mediterranean vegetable salads: Impact of storage temperature and food matrix. *International Journal of Food Microbiology*, v. 346, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109149>
- OLIVEIRA, M. E. G. De et al. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola*, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 370–379, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

- 90162012000600005&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 4 mar. 2022.
- Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI). Padrões de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana, documento M100-S28. 2018.
- PASQUALE, I. De; CAGNO, R. Di. Spatial Distribution of the Metabolically Active Microbiota within Italian PDO Ewes ' Milk Cheeses. [s. l.], p. 1–14, 2019.
- PASTORE, R. A. A. “ Diversidade Taxonômica e Biodegradação de Lignina em Comunidade Bacteriana do Solo da Caatinga ”. 2016. Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2016.
- PELLEGRINI, L. G. De. Caracterização do leite ovino em função do período de lactação. [s. l.], 2012.
- PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1562, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1562, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1562/htm>. Acesso em: 3 dez. 2021.
- PENNA, C. Produção e parâmetros de qualidade de leite e queijos de ovelhas lacaune santa inês e suas mestiças submetidas a dietas elaboradas com soja ou linhaça. 2011. 2–154 f. - Federal University of Minas Gerais, [s. l.], 2011. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-8MEFPT>.
- PEREIRA, G. do N. et al. Characterization of the virulence, agr typing and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 26, n. 5, 2022.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; PEREIRA, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(2), p. 171-175, 2001.
- PIECHOTA, M. et al. Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with- and without mastitis and the cowshed environment. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 17, p. 407-11, 2014.
- PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, v. 2, p. 2177-2197, 2010.
- PINTO, U. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Deterioração microbiana dos alimentos. *Microbiologia e Higiene de Alimentos*, [s. l.], p. 17, 2019.
- PISANO, B. et al. Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *FOOD CHEMISTRY*, [s. l.], v. 192, p. 618–624, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.061>>
- PORCELLATO, D. et al. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International Journal of Food Microbiology*, [s. l.], v. 266, p. 21–30, 2018.
- QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. [S. l.: s. n.], 2013.
- RAMEZANI, M. et al. Molecular investigation of bacterial communities during the manufacturing and ripening of semi-hard Iranian Liqvan cheese. *Food Microbiology*, [s. l.], v. 66, p. 64–71, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.019>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

- RANDAZZO, C. L. et al. Diversity , Dynamics , and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis †. [s. l.], v. 68, n. 4, p. 1882–1892, 2002.
- RIBEIRO, L. C. et al. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 438–444, 2007.
- RICE, L.B.; BONOMO, R.A. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5ª ed. Nova Iorque: Victor Lorian, M. D., p. 441-476, 2005.
- ROBERTS, M.C.; SCHWARZ, S. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *Journal of Environment Quality*, v. 45(2), p. 576-92, 2016. Disponível em: [https://doi:10.2134/jeq2015.04.0207](https://doi.org/10.2134/jeq2015.04.0207)
- RODRIGUES, M. X. et al. The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 2536–2552, 2017.
- ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos | Rohenkohl | Indicadores Econômicos FEE. *Revista Indicadores Econômicos*, [s. l.], v. 39, p. 97–114, 2011. Disponível em: <<https://revistas.fee.tche.br/index.php/indicadores/article/view/2510>>. Acesso em: 24 jul. 2022.
- ROLA, J. G. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk. *Small Ruminant Research*, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 124–128, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.11.010>.
- SALAZAR, L. N. Quantos são e quais as diferenças entre os Serviços de Inspeção para Produtos de Origem Animal existentes no Brasil . [S. l.], 2018. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/quantos-sao-e-quais-as-diferencas-entre-os-servicos-de-inspecao-para-produtos-de-origem-animal-existent-no-brasil/>. Acesso em: 11 fev. 2021.
- SANTANA, E.H.W. et al. Estafilococos em Alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77(3), p. 545-554, 2010.
- SANTOS, F. F. Sistema agroindustrial do leite de ovelha no Brasil : proposta metodológica para estudo de cadeias curtas Pirassununga Pirassununga. [s. l.], p. 140, 2016.
- SENGUN, I. Y.; TURP, G. Y.; CICEK, S. N.; AVCI, T.; OZTURK, B.; KILIC, G. Assessment of the effect of marination with organic fruit vinegars on safety and quality of beef. *International Journal of Food Microbiology*, v. 336, p. 1-9, 2021.
- SERWECIŃSKA, L. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health. *Water* 2020, Vol. 12, Page 3313, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 3313, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/12/3313/htm>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- SILVA, A. P. S. P. et al. Ovinocultura do Rio Grande do Sul: Descrição do sistema produtivo e dos principais aspectos sanitários e reprodutivos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 1453–1458, 2013. Disponível em:

- <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013001200010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- SILVA, M. Caracterização do leite e do queijo de ovelhas da raça bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.). 2014. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, [s. l.], 2014.
- SILVA, M.P. et al. Presence and growth prediction of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese, a soft fresh cheese produced in Brazil. *Journal of Dairy Science*, v. 104, Issue 12, p. 12312-12320, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20633>
- SOARES, J. C. et al. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, [s. l.], v. 146, n. 2, p. 123–129, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.008>.
- SOUZA, C. H. B. De. Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico. 2006. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2006.
- TANAKA, I. ANÁLISE ESPECTRAL COMPARATIVA DE BACTÉRIAS MULTISSENSÍVEIS E MULTIRRESISTENTES DO GÊNERO *KLEBSIELLA* SP COM APLICAÇÃO DO AUMENTO DA ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO POR EFEITO DE SUPERF. 2017. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://biblioteca.univap.br/dados/000033/0000339a.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- TILOCCA, B. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, [s. l.], v. 210, p. 103534, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391919303069#f0025>. Acesso em: 7 fev. 2022.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu. 760 pag, 2008.
- TRIBST, A. A. L. et al. Manufacture of a fermented dairy product using whey from sheep's milk cheese: An alternative to using the main by-product of sheep's milk cheese production in small farms. *International Dairy Journal*, [s. l.], v. 111, p. 104833, 2022.
- UPADHAYAY, A. et al. Resistance-proof antimicrobial drug discovery to combat global antimicrobial resistance threat. *Drug Resistance Updates*, [s. l.], v. 66, n. November 2022, p. 100890, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2022.100890>.
- VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. Production of *Staphylococcal* enterotoxin C in milk. *International Dairy Journal*, v. 30, p. 103–107, 2013.
- VAN HOORDE, K. et al. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 425–433, 2010.
- VERDIER-METZ, I. et al. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 326–333, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22081572/>>. Acesso em: 24 jul.

2020.

- VERNOZY-ROZAND, C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 30, Issue 3, p. 271-280, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00952-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00952-X)
- WENDLANDT, S. et al. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *International Journal of Medical Microbiology*, [s. l.], v. 303, n. 6–7, p. 338–349, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.006>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Organization for Animal Health. Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance: framework and recommended indicators, 2019.
- YOUNG, W. et al. Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*, [s. l.], v. 3, n. 2015, p. e888, 2015.
- ZARZECKA, U. et al. High pressure processing, acidic and osmotic stress increased resistance to aminoglycosides and tetracyclines and the frequency of gene transfer among strains from commercial starter and protective cultures. *Food Microbiology*, [s. l.], v. 107, n. July, 2022.
- ZHANG, J. et al. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of the Total Environment*, [s. l.], v. 618, p. 1254–1267, 2018.
- ZHONG, Z. et al. Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. *American Dairy Science Association*, [s. l.], p. 7832–7841, 2016.
- ZIUZINA, D.; LOS, A.; BOURKE, P. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in foods by thermal and nonthermal control strategies. *Staphylococcus aureus*. Academic Press, p. 235-255, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00012-7>