

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

JÚLIA SILVA VIEIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAIS QUE ABASTECEM
QUEIJARIAS REPRESENTATIVAS DA SERRA DA CANASTRA – MG**

**BAMBUÍ-MG
2025**

JÚLIA SILVA VIEIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAIS QUE ABASTECEM
QUEIJARIAS REPRESENTATIVAS DA SERRA DA CANASTRA – MG**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – *Campus* Bambuí como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte
Coorientador: Prof. Dr. Raphael Steinberg da Silva

Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - *Campus Bambuí*

S729c Souza, Júlia Silva Vieira de.

Caracterização da diversidade genética de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água de mananciais que abastecem queijarias representativas da Serra da Canastra – MG. / Júlia Silva Vieira de Souza. – Bambuí, 2025.

85 f.: il.; color.

Orientador: Dr. Gustavo Augusto Lacorte.

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

1. Rio. 2. *Escherichia coli*. 3. Serra da Canastra. I. Lacorte, Gustavo Augusto. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, MG. III. Título.

CDD 576.1929

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

JÚLIA SILVA VIEIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAIS QUE ABASTECEM
QUEIJARIAS REPRESENTATIVAS DA SERRA DA CANASTRA – MG**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – *Campus Bambuí* como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Steinberg da Silva

Aprovado em ____ / ____ / ____

Prof.

Prof.

Prof

**BAMBUÍ-MG
2025**

AGRADECIMENTOS

Com quantas mãos se escreve um Trabalho de Conclusão de Curso? Embora este documento carregue meu nome, este trabalho foi tecido por muitas mãos, me certificando que não alcançamos nossos desígnios sozinhos.

Agradeço, primeiramente, ao Espírito Santo, que me sustentou desde o início da minha matrícula até o último passo dado para a colação de grau; soprou alento quando eu não tinha forças. Por Ele, não meço agradecimentos. Aos meus pais, Andreza e Ronaldo, que não tiveram essa oportunidade, mas fizeram de tudo para que eu pudesse tê-la. Orgulhavam-se ao me chamar de “estudante de Biologia” e, em breve, poderão me chamar de licenciada. Esse espaço é de vocês, que lutaram, sonharam e esperaram comigo. Aos meus familiares, que acompanharam e torceram por mim, meu sincero agradecimento.

Aos professores do Núcleo de Biologia, por cada ensinamento e portas abertas para conversar e ser ouvida. Em especial, aos que caminharam comigo nos projetos e pesquisas. Ao meu orientador, professor Gustavo, pelo convite para integrar o Laboratório de Biologia Molecular, e ao coorientador, professor Raphael, que sempre acreditou no meu processo. À professora Ludimilla, que se tornou amiga, conselheira e abrigo. Obrigada por me ouvir e apoiar tantas vezes.

Às amigas e colegas de curso, que tornaram a jornada leve. Aos companheiros de laboratório, que dividiram horas de bancada. À Lívia, técnica do laboratório, pelos conselhos dados na “cadeira do choro”; suas palavras foram um alívio. Aos amigos que torceram por mim e à minha república, que virou família, minha gratidão.

À minha psicóloga, Nádia, por sua sensibilidade e profissionalismo. Você segurou minha mão desde o início e, no final, não a soltou por nada.

Ao João Paulo, meu fiel motivador. Obrigada por me lembrar que o TCC não podia me vencer e que eu era mais forte do que acreditava. Seu apoio foi colo, e sua presença, a esperança silenciosa de que eu conseguiria.

Por fim, à Júlia menina que chegou na graduação: guerreira, dedicada e cheia de fé. Carrego sua doçura e determinação e prometo realizar nossos anseios.

“Tudo posso Naquele que me fortalece”.
(FILIPENSES, 4;13)

RESUMO

DE SOUZA, Júlia Silva Vieira. **Caracterização da diversidade genética de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água de mananciais que abastecem queijarias representativas da Serra da Canastra – MG.** Bambuí: IFMG - *Campus Bambuí*, 2025.

A região da Serra da Canastra é reconhecida por ser um berço de suma importância para a produção do Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC), cuja cadeia produtiva está inteiramente ligada com os recursos naturais locais. O manejo do agroecossistema influencia diretamente a qualidade dos mananciais que suprem as propriedades rurais e as queijarias, considerando que a água é amplamente utilizada nas etapas de higienização dos equipamentos e das instalações que entram em contato com o leite cru. A presença de contaminantes, sobretudo de fonte microbiológica, pode comprometer tanto a qualidade do produto final quanto a saúde dos consumidores. Dentre os agentes bacterianos indicativos de contaminação fecal, a espécie *Escherichia coli* habita naturalmente no intestino de humanos e outros animais de sangue quente, sobressaindo pela sua relevância epidemiológica e por ser excelente bioindicadora de condições higiênico-sanitárias em água e alimentos, tendo seu isolamento e caracterização molecular como ferramentas essenciais para avaliar a variedade de perfis genéticos no cenário dos agroecossistemas da região. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de isolados de *E. coli* oriundos de amostras de água de rios da Serra da Canastra que abastecem propriedades queijeiras representativas desta região. Foram analisadas amostras de água coletadas em 12 rios localizados no entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra, durante o período de estação seca de 2022, distribuídas em três campanhas semanais distintas, em pontos próximos às captações utilizadas na produção de Queijo Canastra, com até dez pontos de amostragem por manancial. O isolamento presuntivo de *Escherichia coli* foi realizado em meio cromogênico específico, seguido de confirmação em Ágar MacConkey. Uma quantidade de 184 isolados com coloração rosa, indicativa de fermentação de lactose, morfologia de bastonetes gram-negativos e crescimento adequado com *E. coli* foi considerada confirmada e selecionada para a etapa de caracterização molecular. O DNA genômico dos isolados foi extraído por protocolo de precipitação salina e, logo em seguida, quantificado. Os isolados, para cada um dos doze rios, foram submetidos à técnica de *fingerprinting* molecular rep-PCR (GTG)₅, com a finalidade de identificar linhagens clonais. Foram excluídos 64 isolados (34,78%) através da avaliação dos perfis moleculares, considerados clones de outros isolados dentro de um mesmo rio, sendo mantido apenas um representante de cada perfil por manancial para análises posteriores. O Rio 4 apresentou baixa diversidade, com 100% dos isolados pertencentes ao mesmo perfil genético. Por outro lado, o Rio 10 exibiu a maior diversidade clonal, com cada perfil dominante representando apenas 8% dos isolados. Os resultados obtidos nesta pesquisa contribuem para uma melhor compreensão da diversidade de *E. coli* no ecossistema estudado e para o desenvolvimento posterior de análises do potencial de virulência e resistência desse grupo bacteriano contaminante de água que abastece a linha de produção da mercadoria final, que é o Queijo Canastra.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Rio. Queijo Minas Artesanal Canastra. Diversidade genética.

ABSTRACT

DE SOUZA, Júlia Silva Vieira. **Genetic diversity characterization of *Escherichia coli* isolated from water samples of springs supplying representative cheese factories in Serra da Canastra – MG.** Bambuí: IFMG - *Campus Bambuí*, 2025.

The Serra da Canastra region is recognized as a highly important cradle for the production of Canastra Artisanal Minas Cheese (QMAC), whose production chain is linked to local natural resources. The management of the agroecosystem directly influences the quality of the water sources that supply rural properties and cheese factories, given that water is widely used in the sanitation stages of equipment and facilities that come into contact with raw milk. The presence of contaminants, especially of microbiological origin, can compromise both the quality of the final product and the health of consumers. Among the bacterial agents indicative of fecal contamination, the species *Escherichia coli* naturally inhabits the intestines of humans and other warm-blooded animals, standing out for its epidemiological relevance and for being an excellent marker of hygienic-sanitary conditions in water and food, and its isolation and molecular characterization are essential tools for evaluating the variety of genetic profiles in the scenario of the region's agroecosystems. The objectives of this study were to characterize the genetic diversity of *E. coli* isolates from water samples from rivers in Serra da Canastra that supply cheese factories representative of the region. Water samples were collected from 12 rivers located around Serra da Canastra National Park during the 2022 drought period, distributed in three different weekly campaigns, at points close to the intakes used in the production of Queijo Canastra, with up to ten collection points per source. The presumptive isolation of *E. coli* was performed on a specific chromogenic medium, followed by confirmation on MacConkey Agar. A number of 184 isolates with pink coloration indicative of lactose fermentation, gram-negative rod morphology and adequate growth with *E. coli* were considered confirmed and selected for the molecular characterization stage. The genomic DNA of the isolates was extracted using a saline occurrence protocol and then quantified. The isolates from each of the twelve rivers were subjected to the rep-PCR (GTG)₅ molecular fingerprinting technique to identify clonal lineages. The evaluation of the molecular profiles allowed the exclusion of 64 isolates (34.78%) considered clones of other isolates within the same river, with only one representative of each profile being maintained for subsequent analyses. River 4 showed low diversity, with 100% of the isolates belonging to the same genetic profile. On the other hand, river 10 exhibited the highest clonal diversity, with each dominant profile representing only 8% of the isolates. The results obtained in this research are presented to better understand the diversity of *E. coli* in the studied ecosystem and for the subsequent development of analyses of the virulence and resistance potential of this bacterial group that contaminates the water that supplies the production line of the final product, Canastra Cheese.

Keywords: *Escherichia coli*. River. Minas Artisanal Canastra Cheese. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1 - Regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra.....</u>	17
<u>Figura 2 - Interior de uma propriedade empreendedora de queijo.</u>	26
<u>Figura 3 - Esquema das etapas de preparação do Queijo Minas Artesanal Canastra.</u>	27
<u>Figura 4 - Mapa dos rios amostrados.</u>	35
<u>Figura 5 - Realização do processo de coleta de amostras de água.</u>	35
<u>Figura 6 - Processamento das amostras de água.....</u>	36
<u>Figura 7 - Realização das técnicas de Biologia Molecular.</u>	39
<u>Figura 8 - Esquema ilustrativo das etapas metodológicas da pesquisa.</u>	40
<u>Figura 9 - Colônias presuntivas para Coliformes totais e <i>E. coli</i> crescidas em meio Chromocult®.</u>	42
<u>Figura 10 - Placa de MacConkey com crescimento bacteriano de coloração branca.....</u>	47
<u>Figura 11 - Placa de MacConkey com crescimento bacteriano de <i>Escherichia coli</i>.....</u>	48
<u>Figura 12 - Imagem de Coloração de Gram da bactéria <i>E. coli</i>.</u>	52
<u>Figura 13 - Número de isolados de <i>E. coli</i> nos doze rios estudados comprovados em meio ágar MacConkey.</u>	53
<u>Figura 14 - Perfis de <i>fingerprinting</i> rep-PCR (GTG)₅ de isolados de <i>E. coli</i> alcançados através da resolução dos amplicons em eletroforese em gel de agarose 2%.</u>	61
<u>Figura 15 - Quantidade de perfis genéticos diferentes de <i>E. coli</i> por rio analisado.</u>	67
<u>Figura 16 - Percentual de isolados de <i>E. coli</i> com perfis genéticos distintos e semelhantes em cada rio analisado.</u>	69

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1 - Monitoramento com as etapas do processo de preparo do Queijo Minas Artesanal Canastra.</u>	29
<u>Tabela 2 - Contagem de Colônias (UFC/mL) de Coliformes e <i>E. coli</i>.</u>	43
<u>Tabela 3 - Valor médio de contagem de coliformes totais e <i>E.coli</i>.</u>	46
<u>Tabela 4 - Número de isolados azuis (Chromocult) e número de confirmados como <i>E. coli</i> (MacConkey - rosa).</u>	49
<u>Tabela 5 - Quantificação do DNA extraído dos isolados de <i>E. coli</i>.</u>	55
<u>Tabela 6 - Identificação de clones distintos com seus correspondentes códigos genéticos.</u>	62
<u>Tabela 7 - Dominância clonal e interpretação de diversidade de isolados pertencentes aos 12 rios avaliados.</u>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APROCAN – Associação dos Produtores do Queijo Canastra

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

IFMG – Instituto Federal de Minas Gerais

LaPeM – Laboratório de Pesquisa Multiusuário do Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus*

Bambuí

mL – Mililitros

QMAC – Queijo Minas Artesanal Canastra

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

<u>1.</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	13
<u>2.</u>	<u>OBJETIVOS</u>	15
<u>2.1.</u>	<u>Objetivo geral</u>	15
<u>2.2.</u>	<u>Objetivos específicos</u>	15
<u>3.</u>	<u>REFERENCIAL TEÓRICO</u>	16
<u>3.1.</u>	<u>Serra da Canastra e Queijo Minas Artesanal Canastra</u>	16
<u>3.2.</u>	<u>Agroecossistemas</u>	18
<u>3.2.1.</u>	<u>Definição e aspectos agroecológicos</u>	18
<u>3.2.2.</u>	<u>Influência das atividades no manancial</u>	20
<u>3.2.3.</u>	<u>Contaminações microbianas e atividade pecuária</u>	22
<u>3.2.4.</u>	<u>Agroecossistema de produção de queijo Canastra: modo de produção</u>	25
<u>3.3.</u>	<u>Coliforme e <i>Escherichia coli</i> em água (definição e origem)</u>	30
<u>3.3.1.</u>	<u>Riscos à saúde animal e humana</u>	31
<u>3.4.</u>	<u>PCR Fingerprinting rep-PCR (GTG)₅</u>	32
<u>4.</u>	<u>METODOLOGIA</u>	34
<u>4.1.</u>	<u>Área de Estudo</u>	34
<u>4.2.</u>	<u>Coletas de amostras de água</u>	34
<u>4.3.</u>	<u>Isolamento de <i>Escherichia coli</i> a partir de amostras de água</u>	36
<u>4.4.</u>	<u>Caracterização da diversidade molecular de <i>Escherichia coli</i></u>	37
<u>4.4.1.</u>	<u>Fingerprinting rep-PCR (GTG)₅</u>	38
<u>4.4.2.</u>	<u>Análise de dados</u>	41
<u>5.</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	42
<u>6.</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	73
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	74

1. INTRODUÇÃO

A região da Serra da Canastra é conhecida por ser o berço da fabricação do Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC). Sua localização privilegiada em recursos naturais atesta a influência das características e fatores únicos determinantes em sua cadeia de produção. Esta cadeia é considerada por todo o processo operacional, ocorrendo desde o campo, com a extração da matéria-prima, até o produto final, que ocasiona sua comercialização. Esta confecção artesanal, dentro de um marco cultural local, é seguida de geração em geração e se constitui como a maior fonte de empregabilidade para os produtores rurais desta região. Além disso, esta área comporta a bacia hidrográfica onde nasce o rio São Francisco, de extrema relevância para o contexto econômico do país e para diversas atividades que sustentam o agroecossistema da região, incluindo a mão de obra familiar. Parte desse recurso hídrico é formada por mananciais que passam dentro de propriedades dessa área, dos quais a água é destinada ao abastecimento de todo o empreendimento do Queijo Canastra. A utilização desta água serve para a higiene e limpeza das instalações, para as salas de ordenha e para os equipamentos e utensílios das queijarias, que também estão situadas dentro de cada um desses empreendimentos.

O manejo do agroecossistema, que inclui as atividades da agricultura familiar, a pecuária leiteira e os sistemas de produção do queijo, está inteiramente associado à gestão dos efluentes, que, por muitas vezes, se constituem como encarregados de causarem poluição da água, devido ao excesso de sedimentos e nutrientes, pesticidas e produtos químicos que escoam para os cursos d'água e, desse modo, acabam contaminando-os com metais pesados e matéria orgânica. Outra ameaça significativa de contaminação da água é a de origem microbiológica, desencadeada pelo acesso desimpedido, não controlado e sem proteção, propiciando que os animais entrem nas áreas às margens dos mananciais. Os agentes microbianos contaminantes da água são oriundos do trato intestinal de animais domésticos ou silvestres localizados nas áreas das propriedades, quando estes alcançam os reservatórios de água e defecam, introduzindo, assim, microorganismos no ambiente hídrico, tornando a água um vetor direto de transmissão de infecções gastrointestinais em seres humanos.

A utilização de água contaminada compromete o ambiente e toda a cadeia de produção do Queijo Canastra, especialmente por este ser produzido e elaborado a partir de leite cru, sem o processo de pasteurização. A qualidade da água é fundamental para garantir a integridade do leite e de seus derivados lácteos, apresentando papel crucial na limpeza dos instrumentos e lavagem das ferramentas, pois a água é manuseada em diversas etapas do

procedimento, perpassando tanto pelo espaço da ordenha quanto pelas tetas e pela sala de produção, o que engloba vestimenta, talheres, forma, bancada, balde, tanques refrigeradores, entre outros. As falhas na lavagem dos equipamentos, isto é, as dificuldades no controle de limpeza por presença de resíduos e impurezas, podem levar à contaminação do produto final, colocando em risco a saúde do consumidor. O leite é a matéria-prima fundamental do Queijo Canastra, e os microrganismos presentes nele estão associados às áreas contaminadas, com as quais ele entra em contato no decorrer do manuseio e processamento, consequência, principalmente, de má higienização e ausência de segurança microbiológica.

Dentre as contaminações bacteriológicas indicadoras de condições higiênico-sanitárias que podem afetar a qualidade do Queijo Canastra, ressaltam-se microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, com foco no grupo dos Coliformes totais e termotolerantes. Esses grupos são formados por populações de bactérias gram-negativas, com destaque para as cepas de *Escherichia coli*, devido ao seu potencial enterotoxigênico. *Escherichia coli* é uma bactéria naturalmente presente no trato gastrointestinal de seres humanos e animais. Ela está associada à veiculação de água contaminada e de alimentos expostos a fezes. Além disso, a bactéria pode ser detectada em leite cru, assinalando uma eventual contaminação fecal (LANDGRAF *et al.*, 1996; OKURA, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2019).

A proposta desta pesquisa foi isolar e identificar molecularmente isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras de água de mananciais que suprem os empreendimentos produtores das cadeias fornecedoras do Queijo Canastra, com o propósito de determinar a diversidade genética bacteriana desta espécie presente no cenário aquífero que compõe esses agroecossistemas. A aplicação de técnicas moleculares na caracterização de *E. coli* se torna relevante para se conhecer a diversidade e para contribuir para o desenvolvimento posterior de análises do potencial de virulência e resistência desse grupo bacteriano contaminante de água que abastece a linha de produção da mercadoria acabada, que é o Queijo Canastra.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar molecularmente a diversidade de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água coletadas em mananciais da Serra da Canastra-MG que abastecem queijarias representativas da região.

2.2 Objetivos específicos

- Obter uma coleção de amostras de águas superficiais dos mananciais circunvizinhos aos locais de captação de água para utilização na produção do Queijo Canastra que seja representativa do cenário local atual;
- Isolar *Escherichia coli* em amostras de água de mananciais que abastecem a cadeia produtora do Queijo Minas Artesanal Canastra;
- Identificar o padrão de diversidade genética dos isolados de *E. coli* por meio da técnica visual do perfil de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)₅;
- Comparar os padrões de diversidade de isolados de *Escherichia coli* obtidos dentro e entre os mananciais amostrados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

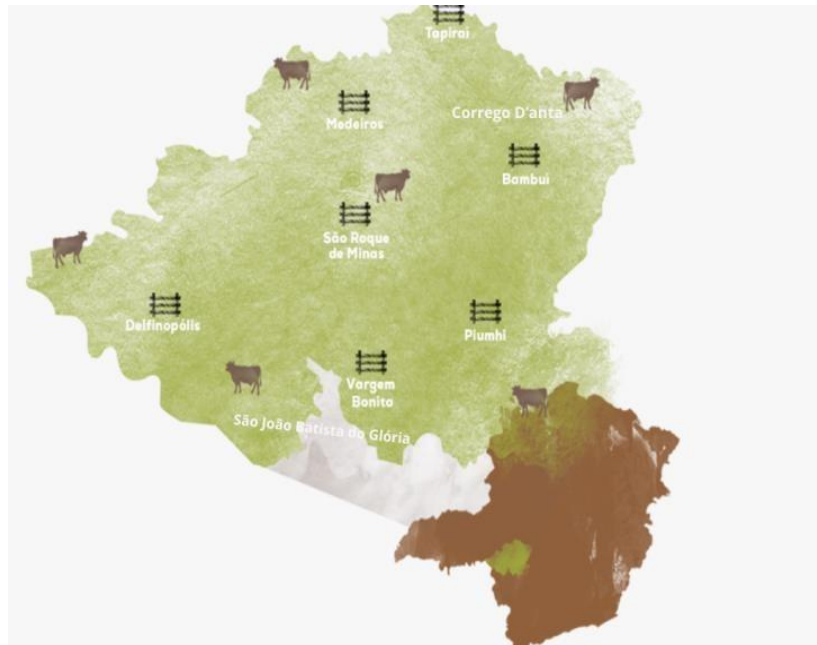
3.1 Serra da Canastra e Queijo Minas Artesanal Canastra

A região da Canastra está localizada no sudoeste do estado de Minas Gerais e é reconhecida por acolher o Parque Nacional da Serra da Canastra, criado em 3 de abril de 1972 pelo decreto-lei n.º 70.355, com o intuito de preservar e servir como proteção à nascente histórica de uma das bacias hidrográficas mais relevantes no contexto econômico do país, a bacia do rio São Francisco (ROMERO; NAKAJIMA, 1999; MESSIAS; FERREIRA 2019). Essa microrregião também é marcada por sua tradicional produção de queijo artesanal, o queijo Canastra, posto que as particularidades pedológicas da localidade concederam aspectos para o desenvolvimento de um produto com atributos sensoriais representativos, tornando-o apreciável entre seus consumidores (EMATER, 2004; NÓBREGA *et al.*, 2008).

De acordo com a caracterização realizada pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG), em 2002, e a Portaria do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) n.º 1810, de 24 de abril de 2018, nove municípios estão contidos na região produtora do Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC): Bambuí, Córrego D'anta, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São João Batista do Glória, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita, delimitando uma área geográfica para a Indicação de Procedência “CANASTRA” (APROCAN, 2011; IMA, 2018) (Figura 1). Tal nomeação é certificada pelo registro no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), que, por sua vez, expande o reconhecimento dos queijos artesanais como uma iguaria nacional, estimulando a produção e, conseqüentemente, melhorando sua qualidade (EMBRAPA, 2019).

A produção na Serra da Canastra envolve nove municípios, constituindo cerca de 793 propriedades, sendo a maioria de, no máximo, 100 ha. São fabricados, diariamente, 16.500 kg de queijo, a partir de 135 mil litros de leite, valor equivalente a uma média de 20 unidades por produtor. A cidade de São Roque de Minas responde por 48,5% do volume total (EMBRAPA, 2019). Com base nisso, percebe-se que é um produto popular de imenso apelo comercial, cujo modo de produção é cultural e social, passado de geração a geração (PINEDA, 2022).

Figura 1 - Regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra.



Fonte: Adaptado de QUEIJO DA CANASTRA (2025).

Legenda: Localização dos nove municípios produtores do Queijo Minas Artesanal Canastra, cidades que formam a área delimitada pela Indicação de Procedência Canastra: São Roque de Minas, Medeiros, Vargem Bonita, Tapiraí, Delfinópolis, Bambuí, Piumhi, Córrego Danta e São João Batista do Glória.

O QMAC é uma das variações do Queijo Minas Artesanal (QMA), que é definido como um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, e sua fabricação é considerada uma das estratégias mais eficazes de faturamento e geração de renda de um grande número de agricultores e pequenos produtores rurais de Minas Gerais (DAS DORES; FERREIRA, 2012; BEMFEITO, 2016). Segundo o IMA, sua produção centenária é caracterizada pela mão de obra familiar, de baixa escala, a partir de leite cru, recém-ordenhado, filtrado e beneficiado na queijaria da propriedade de origem, com a adição de um fermento contendo uma cultura láctea natural denominada “pingo”, sem a utilização de quaisquer técnicas industriais, submetido, posteriormente, à maturação. Deste modo, essa prática introduz ao produto uma microbiota diversificada e peculiar da região em que é elaborado, atribuindo ao queijo qualidades sensoriais endêmicas e singularizadas. Além disso, a qualidade da matéria-prima utilizada e as condições ambientais e de fabricação são fatores fundamentais que interferem na qualidade do produto final (DAS DORES; FERREIRA, 2012; EMBRAPA, 2019; KAMIMURA *et al.*, 2019).

Aspectos geoclimáticos de cada região podem influenciar diretamente os atributos dos queijos (MENESES, 2006). A Serra da Canastra é uma região que dispõe do *terroir* ideal

para a produção do queijo. O *terroir* é a junção das condições físico-ambientais convenientes à fabricação desse produto (BERNARDES; MARAJÓ, 2021; PINEDA, 2022). Ademais, ele é somente feito na localidade onde se convergem, de maneira singular, características do solo, pastagem, clima, altitude e água específica (RESENDE *et al.*, 2011).

O clima caracterizado na região da Serra da Canastra é classificado como tropical de altitude, típico do cerrado, possuindo temperatura média anual em torno de 22,2 °C, sendo a média mínima de 16,7 °C, e a máxima, 27,6 °C. O índice pluviométrico médio fica em torno de 1390 mm anuais, com chuvas ofertadas entre os meses de outubro a março. A altitude varia de 637 a 1.485 m, apresentando um relevo com cerca de 25% de área plana, 40% de área ondulada e 35% de área montanhosa. Com o inverno seco e o verão úmido, a umidade do ar é própria de cerrado; os ventos e a umidade originados a leste da região entram por um erro na cadeia das serras que contornam a zona produtora. O microclima é criado através dessas serras, que formam uma espécie de bolsão no entorno, barrando as correntes (APROCAN, 2011).

A bacia do Rio São Francisco possui uma área de 645.000 km², e seu curso principal, uma extensão de aproximadamente 2.700 km, possuindo as cabeceiras na Serra da Canastra, município de São Roque de Minas. A Bacia abrange três biomas, sendo o Cerrado, em Minas Gerais, com o clima úmido e subúmido, influenciada por diversas massas de ar e diferentes altitudes e relevos que marcam sua nascente e boa parte do seu curso inicial (DA SILVA; CLARKE, 2004).

3.2 Agroecossistemas

3.2.1 Definição e aspectos agroecológicos

Os agroecossistemas são complexos, sendo um sistema de água, ar, microrganismos, solo, plantas, animais e, ainda, tudo o que estiver presente no espaço alterado pela ação do ser humano para intento de produção agrícola. Seu tamanho pode ser intrínseco, mas também pode ser um campo, uma propriedade, uma região ou um aproveitamento agrícola familiar (MARTEN, 1988).

A produção em um agroecossistema é decorrente de cada região, logo, do equilíbrio entre solo, nutrientes, clima e umidade e também das relações econômicas e sociais (ALTIERI, 1999). Um agroecossistema é um espaço modificado para o cultivo agrícola, definido de maneira semelhante a um ecossistema, que é compreendido como um agrupamento de relações mútuas entre flora e fauna, em comunicação com fatores atmosféricos, meteorológicos e

geológicos, com o acréscimo do efeito das atividades de intervenção humana, que modificam e condicionam esses processos naturais. Por conseguinte, os agroecossistemas, reconhecidos como sistemas agrícolas produtivos, também são conhecidos por serem ecossistemas alterados pela ação do homem. O prefixo “agro”, do termo “agroecossistema”, corresponde à intervenção antrópica, manifestando a relação humana com os recursos naturais e os elementos da biosfera no contexto das áreas onde se realizam atividades de agropecuária (DENARDIN *et al.*, 2012).

Portanto, um agroecossistema é a transformação de um ecossistema natural pelo homem para a produção de bens necessários à sua sobrevivência. Nele, os mecanismos e controles originados das tradições culturais passam por constantes alterações, seguindo uma lógica específica de cada comunidade. Sua organização se dá por meio de um conjunto de explorações e de atividades efetuadas por um agricultor com um sistema de gestão próprio, procurando direcionar a produção primária do ecossistema a produtos de necessidade básica (FEIDEN, 2005). É um sistema aberto, que, por meio do desenvolvimento de um sistema alimentar sustentável, se relaciona com a natureza e com a sociedade, trabalhando pela eficiência do processo de modificação dos recursos naturais ao alimento presente na mesa da sociedade (HOLANDA, 2003).

Algumas unidades produtivas vivem apenas da geração de renda alcançada pelas práticas agropastoris, isto é, propriedades que se baseiam na pecuária leiteira e na atividade agrícola direcionadas à subsistência. Mas também há aquelas que, além da produção agropastoril, adquirem sua fonte de sustento complementar através de atividades não agrícolas que envolvem, por exemplo, o turismo na propriedade, ou por meio da prestação de serviços por assalariamento nas residências e pousadas (BARBOSA, 2007). No estado de Minas Gerais, a produção de Queijo Minas Artesanal é uma atividade tradicional instituída por vários municípios, além de ser a primordial na obtenção de renda, integrando a identidade sociocultural da população mineira (FURTADO, 1980).

Na região da Canastra, as condições acerca do agroecossistema permanecem e se sobressaem conforme o equilíbrio e a disponibilidade dos elementos em razão do tamanho da propriedade, do auxílio na mão de obra, da geração de renda e dos recursos que são ali acessíveis. Diante disso, a partir de algumas propriedades, podem ser destacados elementos que são definidores da sua condição enquanto unidade de produção camponesa, para fins de apropriação de alimento e subsistência: a exemplo de força de trabalho de base familiar, sem divisões significativas nas tarefas agropecuárias, renda predominantemente vinda de atividades agrícolas e a utilização de técnicas de baixo custo (BARBOSA, 2007).

A cadeia produtiva do Queijo Canastra é constituída por centenas de pequenas propriedades que praticam a pecuária leiteira de pequeno porte. Essas propriedades suprem a produção do queijo em pequenas queijarias que, situadas no próprio empreendimento, fazem uso especialmente da mão de obra familiar (FAEMG, 2013). Segundo Lucas e seus colaboradores (2014), na microrregião da Serra da Canastra, percebe-se que a maioria das fazendas que produzem o Queijo Canastra apresentam uma baixa escala de produção e contam com a utilização de nascentes como fontes principais de água para o abastecimento dos empreendimentos do setor queijeiro. Entretanto, essas áreas dos mananciais não são devidamente protegidas, conservadas e apresentam elevado grau de contaminação, quando se tornam também pontos de acesso de animais, como bebedouros naturais para o gado. Essa água, em seguida, é utilizada nas fases de limpeza das salas de ordenha e também no toalete dos queijos.

Portanto, várias unidades produtivas, por exemplo, se sustentam por meio de atividades sobretudo agropastoris. Na região da Canastra, sabe-se que a principal fonte de renda e de serviço é proveniente do QMAC, sendo este produto fundamental na organização social das famílias rurais e gerador de emprego e renda para grande parte da população local (BRASIL, 2008; BORGES *et al.*, 2018). A intensificação da agricultura em agroecossistemas, no entanto, pode acabar por ocasionar prejuízos, isto é, impactos negativos ao ecossistema, como escoamento de sedimentos e nutrientes para cursos d'água, perda de habitat e envenenamento de espécies não alvo por pesticida (ZHANG *et al.*, 2007).

3.2.2 Influência das atividades no manancial

As mais importantes fontes de poluição antrópica nos cursos de água em áreas urbanas e zona rural estão relacionadas com a utilização excessiva de agrotóxicos e substâncias orgânicas, bem como com o lançamento e arremesso de metais pesados e despejos incorretos de esgotos residenciais, domésticos e industriais, ricos em matéria orgânica, incluindo altas concentrações de nitrogênio e fósforo, nos cursos d'água, por meio do processo de lixiviação (ÁGRAR, 2004; CORRIVEAU *et al.*, 2010; SOARES, 2017). Entretanto, as principais práticas responsáveis por provocar poluição em recursos hídricos são as atividades agrícolas. Desse modo, sedimentos erodidos das terras rurais são os fatores mais comuns de contaminação, juntamente com pesticidas e fertilizantes. Além disso, a atividade pecuária colabora consideravelmente com aportes de matéria orgânica, por meio da inserção de bactérias, resíduos

de animais e de efluentes gerados pelo processamento de alimentos (MILLER; SPOOLMAN, 2021).

Quando introduzidas no meio aquático, as substâncias provenientes do manejo agrícola podem se relacionar com os seres vivos, resultando em uma série de mudanças que podem provocar desequilíbrios ecológicos significativos, considerando a extensão da contaminação e a duração da exposição (ARIAS *et al.*, 2007). Nesse sentido, essas atividades de intervenção humana apresentam-se como fatores responsáveis pela minimização da qualidade da água, dado que o crescimento da urbanização rural fornece, também, entre outros impactos ambientais, a eutrofização dos rios (BRAGA *et al.*, 2005).

A eutrofização das águas significa seu enriquecimento por nutrientes, principalmente das plantas, como nitratos e fosfatos, levando ao crescimento excessivo de vegetação aquática e consequente desequilíbrio do ecossistema aquático, que acaba por ocasionar a progressiva degeneração da qualidade da água dos corpos lânticos. Uma das maiores adversidades referentes à eutrofização pode ser atribuída à proliferação de cianobactérias em detrimento de outras espécies aquáticas (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2007).

Em muitos cursos de água, a elevação do aporte de nitrogênio e fósforo não somente favorece o desenvolvimento de cianobactérias e microalgas, mas também pode agilizar o processo de biodegradação de produtos petroquímicos, pesticidas e compostos aromáticos. Isso acontece em razão do crescimento da biomassa bacteriana, devido à expansão deste estado trófico. Por conseguinte, ocorre aumento da diversidade de substratos orgânicos, os quais as bactérias são capazes de metabolizar, isto é, decompor e utilizar como fonte de energia. Para isso, as atividades de eliminação de resíduos biológicos, como a aplicação de esterco em terras agrícolas, podem aumentar, simultaneamente, a carga de fósforo, nitrogênio e bactérias, como as coliformes, que podem ser potencialmente perigosas nas águas superficiais (SMITH; SCHINDLER, 2009).

O esterco bovino é um método amplamente escolhido para o suprimento de nutrientes, sendo o mais viável para manter os níveis de fertilidade do solo em pequenos sistemas de produção. Esse material é rico, principalmente, em N e P, mas também em K, S e Ca, além de possuir grande quantidade de matéria orgânica, nitrogênio amoniacal e outros compostos voláteis, considerados elementos cruciais para a sustentabilidade de sistemas agrícolas familiares (SABOURIN *et al.*, 2000, MENEZES; SALCEDO, 2007; SANTOS *et al.*, 2010). Esse resíduo proveniente dos animais tem grande potencial para ser utilizado, de forma consciente, como adubo orgânico na propriedade. Todavia, é fundamental destacar que, sem um controle correto, estes dejetos podem causar superfertilização da água de nascentes e

mananciais, em razão do excesso de nutrientes e também da contaminação dessa água por nitrato ou por bactérias de origem fecal, como a *E. coli* (RESENDE, 2002).

A produção de queijo, derivada da atividade pecuária tradicional, também pode impactar os mananciais locais a partir dos efluentes sólidos gerados nas queijarias. Esses resíduos podem ser: embalagens plásticas, de papelão e de produtos químicos, aparas e restos de queijos. Ainda assim, geralmente, os efluentes das queijarias são oriundos do processo de higienização, ou seja, água de lavagem, uma vez que o soro surtido da confecção é, quase sempre, destinado à alimentação de porcos. Outro tipo de efluente identificado e que é misturado ao das queijarias é aquele resultante da criação de suínos. Os excrementos dessa atividade têm fomentado um grande problema ambiental, configurando-se como uma prática de alto potencial poluidor e de degradação ambiental (SARAIVA, 2012). Além disso, conforme Da Silva e seus colaboradores (2010), o fator preponderante que colabora para a deterioração da qualidade hídrica na bacia hidrográfica do rio São Francisco inclui a constante expansão das áreas agrícolas, especialmente nas margens do rio e de seus afluentes, em virtude do desmatamento das matas ciliares e da falta de conscientização do ser humano em relação à sustentabilidade dos recursos naturais.

Em vista dessas considerações, o fornecimento de água sem tratamento para o consumo humano ou beneficiamento de produtos a serem utilizados na alimentação humana apresenta grande potencial de contaminação por fezes de animais, tanto silvestres quanto domésticos, decorrente do mau desempenho de tanques sépticos, escoamento de sedimentos pela água da chuva para cursos hídricos e falhas em estações de sistemas de esgoto (AHMED *et al.*, 2005).

3.2.3 Contaminações microbianas e atividade pecuária

A reduzida qualidade da água e a presença de microrganismos patogênicos podem ocasionar infecções nos animais e nos seres humanos, ao mesmo tempo em que interferem na vida útil dos equipamentos e nas instalações das queijarias, prejudicando a qualidade do leite, pois minimizam a eficiência dos métodos de limpeza e desinfecção do ferramentário de ordenha (GUERRA *et al.*, 2011). Assim, a inadequada condição microbiológica e físico-química da água pode resultar em contaminação cruzada, falhas e dificuldades na higienização e em formação de biofilmes em superfícies associadas ao processo de transporte do leite (RESENDE, 2014).

Os microrganismos encontrados no leite estão associados à microbiota presente tanto nas superfícies que entram em contato direto com o produto quanto em fontes indiretas, sendo influenciados pelas propriedades inerentes, como a abundância de nutrientes, pH propício, temperatura de armazenamento e a elevada atividade de água (VANETTI; PINTO, 2013). As fontes diretas incluem teto do animal, tanques de refrigeração, transporte e equipamento do laticínio. A alimentação animal, a água utilizada na higiene dos equipamentos e o material fecal encontrado na sala de ordenha são considerados fontes indiretas de contaminação (MONTEL *et al.*, 2014). Para assegurar uma produção adequada do leite e do queijo, é imprescindível que a água seja de qualidade potável, transparente, livre de microrganismos e não corrosiva (SILVA *et al.*, 2016).

O passo que antecede a produção do queijo é a ordenha do leite, o qual deve ser obtido de vacas clinicamente saudáveis, com bom estado de saúde das glândulas mamárias, higienização dos tetos e dos úberes, antes (*Pré-Dipping*) e após (*Pós-Dipping*) a coleta do leite, assim como dos utensílios e equipamentos das salas, ocorrendo também a lavagem prévia das mãos do ordenhador (TORRES, 2014). Por ser utilizado na produção do QMAC, no leite cru (não pasteurizado), nesta matéria-prima, é encontrada uma microbiota complexa (QUIGLEY *et al.*, 2013), apresentando microrganismos patogênicos não desejáveis e outros importantes, como algumas linhagens de bactérias ácido-láticas (BAL), sendo estas últimas capazes de inibir o crescimento de outras, por exemplo, patógenos causadores de infecções intramamárias (McMULLEN; STILES, 1996; STEINBERG *et al.*, 2022a).

O emprego de condições sanitárias corretas no decorrer do procedimento de ordenha e em todos os seus componentes, como a água, as ferramentas e tanques refrigeradores, contribui para a presença, no leite, dos microrganismos mais prevalentes, que são as bactérias lácticas. Não obstante, se as condições mínimas de higiene não estiverem em conformidade, esse leite recém-extraído, que possui, geralmente, uma população bacteriana por volta de 10^3 UFC/mL, por exemplo, pode passar a apresentar uma carga bacteriana superior a 10^6 UFC/mL (ORDOÑEZ, 2005). *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* são exemplos de bactérias presentes nesta carga microbiana aumentada relacionada às condições sanitárias inadequadas ou estado patológico das vacas (SANTOS, 2010; STEINBERG *et al.*, 2022b).

A exposição aos patógenos ambientais pode acontecer entre as ordenhas, no pasto, na área de descanso dos animais, por meio do contato com água contaminada, com o solo e outros meios. Contaminações por coliformes, a exemplo da *E. coli*, estão vinculadas a

ambientes infectados com fezes de animais, enquanto *Klebsiella* pode estar relacionada com a serragem utilizada para a forragem da cama dos animais ou nos solos (JONES; BAILEY, 2009).

A ausência de desinfecção correta pode ocasionar a incidência de mastite, doença infecciosa conhecida por causar inflamação das glândulas mamárias e do epitélio glandular, que resulta em variações na secreção do leite (GUERREIRO *et al.*, 2005). São exemplos de bactérias causadoras da mastite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* (RADOSTITS *et al.*, 1994; MENEZES *et al.*, 2014). São gêneros representantes desta família: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Morganella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e as bactérias do grupo coliforme, inclusive *E. coli* (BRENNER; FARMER III, 2005).

O risco de contaminação em queijos pode estar na matéria-prima, considerando-se que, em algumas áreas, o leite ainda é ordenhado sob condições higiênico-sanitárias deficientes. Em decorrência disso, surge um expressivo número de microrganismos, desencadeando riscos à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico. Desse modo, procedimentos higiênico-sanitários iniciados na ordenha até a obtenção do QMAC devem ser adotados (CATÃO; CEBALLOS, 2001). A higienização precária na atividade pecuária, que inclui o momento da ordenha, o armazenamento incorreto do leite e a intensa manipulação, é considerada a principal fonte de contaminação do leite e de seus subprodutos (BASTOS *et al.*, 2001).

O leite cru utilizado na obtenção do Queijo Canastra exibe uma ampla diversidade de bactérias, fungos e leveduras. Entre as bactérias patogênicas que podem estar presentes em queijos artesanais elaborados a partir de leite cru, sobressaem-se a *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, linhagens patogênicas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, resultantes de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (JAY, 2005; ANDRADE, 2009; VANETTI; PINTO, 2013; MONTEL *et al.*, 2014).

E. coli é, geralmente, encontrada nos intestinos de humanos e também de animais. Os animais ruminantes são reservatórios importantes, e a defecação durante a ordenha é um evento significativo para a contaminação do leite (TORRES, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2019). A existência de *E. coli* em queijos de leite cru pode indicar contaminação de origem fecal do leite ou infecções mamárias causadas por este importante patógeno de mastite (COSTANZO *et al.*, 2020).

Nesse sentido, a qualidade da água na área de produção desse queijo pode ser assegurada pela determinação de uma simbiose entre a atividade agropecuária e a preservação

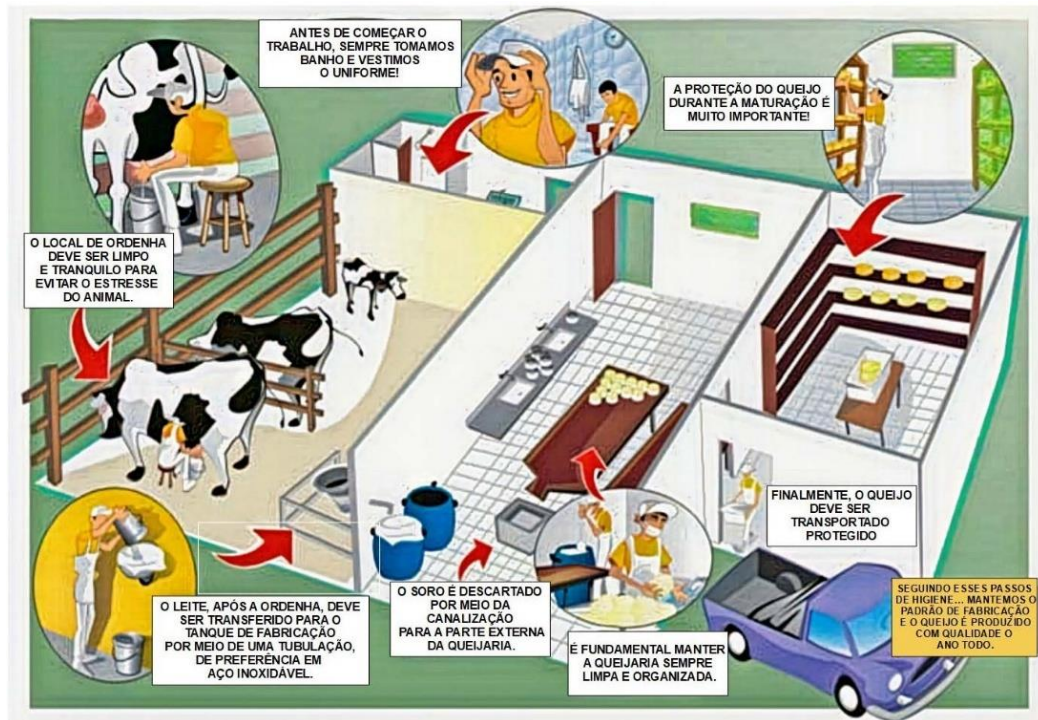
das nascentes, indicando que a ação dos produtores de queijo exerce um papel essencial na procura por essa harmonização (FERREIRA, 2019).

3.2.4 Agroecossistema de produção de queijo Canastra: modo de produção

No decurso das etapas de produção do QMA, cada queijaria adota suas peculiaridades; as técnicas são passadas às gerações que são encarregadas pelas propriedades únicas de cada produto (MENESES, 2006). Na tentativa de padronização do queijo e na melhora da sua qualidade, os produtores rurais se associam e se organizam em cooperativas. No entanto, cada um desses trabalhadores possui sua forma de confeccionar os queijos, o que resulta em variações no gerenciamento da produção e da comercialização. Essas diferenças incluem as técnicas de fabricação, como o tempo de maturação, o manejo sanitário e alimentar, o tipo de animais na propriedade e o tipo de pastagem presente. Além disso, fatores ambientais, como a altitude da fazenda, também são aspectos que interferem nessas diferenciações. Portanto, de um produtor para o outro, o queijo Canastra pode se apresentar com algumas distinções, sejam elas físicas, sensoriais ou microbiológicas, intervindo nas características do produto final (MACHADO *et al.*, 2004; LIMA; DOULA, 2012; KAMIMURA *et al.*, 2019) (Figura 2).

As matérias-primas empregadas na fabricação do QMA, com procedência “CANASTRA”, são: leite de vaca cru, integral, recém-ordenhado e proveniente de vacas sadias da propriedade de origem; o “pingo”, ou fermento lácteo, obtido do soro no final da dessoragem da produção do dia anterior; o coalho industrializado e sal comum. A água deverá ser clorada levando-se em conta os critérios dispostos na legislação pertinente, sendo analisada anualmente. O leite, por sua vez, deverá atender aos aspectos de qualidade, microbiológicos e de características físico-químicas, requeridos também pela legislação, bem como o coalho industrializado, que deverá possuir, obrigatoriamente, registro sanitário no Serviço de Inspeção Estadual ou Federal (APROCAN, 2011).

Figura 2 - Interior de uma propriedade empreendedora de queijo.



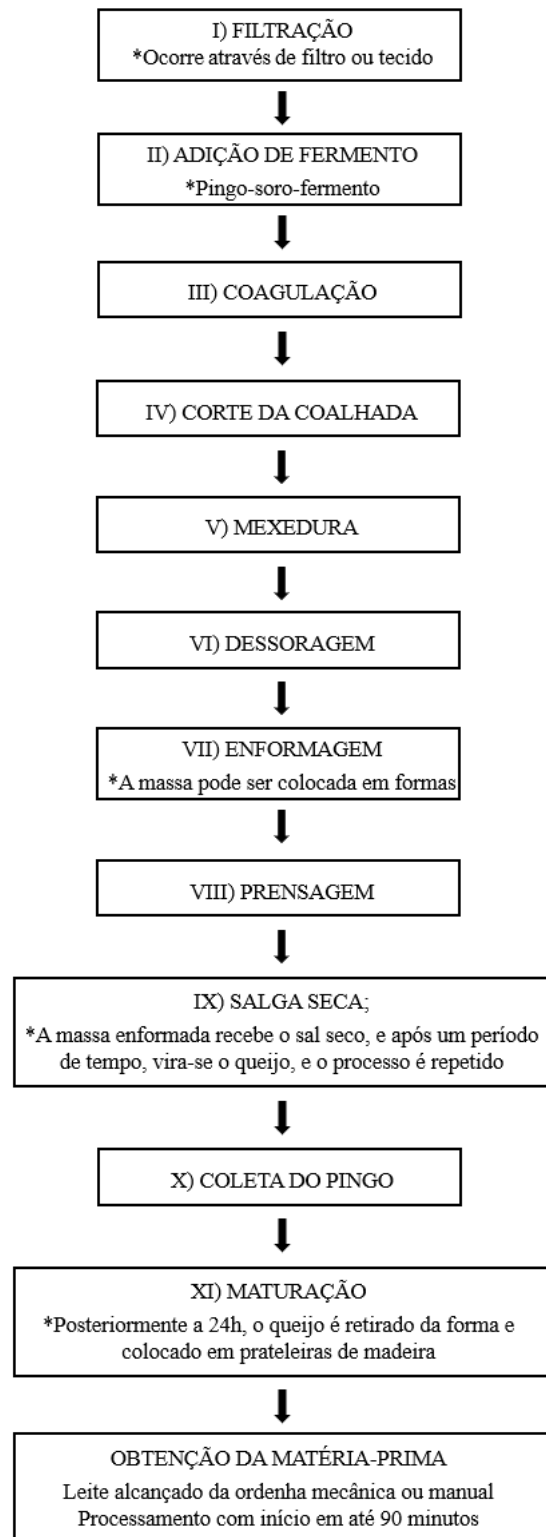
Fonte: Adaptado de FERREIRA e MARTINS (2006) *apud* EMATER (2009).

Legenda: Dinâmica da cadeia produtiva do QMAC no interior da propriedade.

A água empregada em propriedades rurais produtoras do QMAC está diretamente relacionada com as etapas de sua produção, influenciando tanto a qualidade final do produto quanto a saúde do consumidor (FERREIRA, 2019). As etapas do processo de produção do QMAC envolvem: filtração do leite, coagulação, adição de cultura láctea (pingo) e coalho, corte da massa, mexedura, separação do soro, enformagem, prensagem, adição do sal e maturação (MINAS GERAIS, 2012) (Figura 3).

A fabricação do queijo Canastra deve ocorrer em até 90 minutos após a ordenha do leite, momento no qual se inicia a etapa de filtragem, que tem como objetivo retirar partículas macroscópicas em suspensão no leite. Nessa fase, alguns produtores podem adicionar sal ao leite na medida de 100 a 500 g para 100 litros de leite. Depois, adiciona-se o fermento natural obtido do dia anterior, o "pingo", além do coalho. O coalho pode ser em pó, ou líquido de renina de bezerro. A quantidade de pingo adicionado pode variar de 100 a 500 ml para 100 litros de leite, de acordo com a estação do ano, temperatura ambiente e a maneira de produção de cada produtor (MINAS GERAIS, 2004; MINAS GERAIS, 2012).

Figura 3 - Esquema das etapas de preparação do Queijo Minas Artesanal Canastra.



Fonte: Portaria do IMA n.º 1969, de 26 de março de 2020 (MINAS GERAIS, 2020).

Legenda: Esquematização com as fases correspondentes de preparo do Queijo Minas Artesanal Canastra: 1. Filtração; 2. Adição de Fermento; 3. Coagulação; 4. Corte da Coalhada; 5. Mexedura; 6. Dessoragem; 7. Enformagem; 8. Prensagem; 9. Salga seca; 10. Coleta do Pingo; 11. Maturação; 12. Obtenção da matéria-prima.

O fermento endógeno, localmente chamado de “pingo”, é usado na fermentação durante a fabricação do QMAC, responsável por iniciar o processo fermentativo e direcionar a maturação do queijo a partir da microbiota indígena de cada propriedade. Altas contagens de BAL presentes no pingo podem desempenhar um papel protetor intrínseco contra os microrganismos indesejáveis, além de contribuir para o perfil sensorial do queijo de cada produtor. No fermento, prevalecem as BAL pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, sendo as espécies *L. plantarum* e *L. casei* as mais abundantes nos queijos produzidos na região da Canastra (NÓBREGA, 2007; DAS DORES; FERREIRA, 2012; CASTRO, 2016).

A coagulação é a etapa caracterizada pela formação de massa e acontece no tanque de fabricação. Após a combinação do coalho com o leite, é necessário deixá-lo em repouso até que a massa atinja o ponto de coagulação almejado. Essa etapa tem uma duração média de 40 a 90 minutos para o QMAC, variando de acordo com diferentes fatores, tais como a quantidade de coalho utilizada, a composição do leite e a estação do ano, entre outros elementos (EMBRAPA, 2018).

Posteriormente ao processo de coagulação, acontece o corte da massa, com a finalidade de obtenção de tamanhos menores, com tamanho sempre inferior a 1 cm. A mexedura varia entre 1 e 5 minutos, de acordo com a elaboração de cada produtor, separando-se o soro da massa, e a dessoragem retira o excesso de soro da massa (MINAS GERAIS, 2012; CAMPOS, 2019).

Na etapa da enformagem, a massa é colocada sobre um tecido sintético adequado e, depois, alocada dentro de formas de plástico circulares, sendo que, no processo manual de prensagem da massa, são utilizadas as duas mãos. Realizado o processo manual de espremedura, ocorre a primeira salga com sal grosso ou triturado (de 40 a 120 g/kg de massa); oito horas depois, o queijo é virado, e o processo é repetido, efetuando-se a segunda salga (MENESES, 2006; EMBRAPA, 2018).

A fase final da produção do queijo Minas Artesanal Canastra é a da maturação. A lavagem do queijo, que antecede esse passo, retrata um ponto de controle, posto que pode ocorrer a recontaminação por patógenos oriundos da água usada na lavagem. Nesse procedimento, há o risco de perigos biológicos, que podem ser oriundos do controle do tempo, temperatura e umidade, mas também de higienizações incorretas das prateleiras e do ambiente (VEZALLI *et al.*, 2022).

O queijo pode ser retirado da forma após 24 horas, colocado em prateleiras de madeira e lavado e enxuto conforme o estado de maturação e saber fazer tradicional, por um

tempo de 22 dias, determinado pela legislação (MINAS GERAIS, 2020). Por corresponder à fase de diversas transformações bioquímicas, a maturação é uma etapa crucial para o desenvolvimento da cor, sabor, aroma e textura do produto, e também para que o queijo atinja os limites de segurança microbiológica indicados no Anexo III da Instrução Normativa N.º 60, de 23 de dezembro de 2019, uma vez que o processo reduz a carga de microrganismos potencialmente patogênicos (MARTINS, 2006; SILVA *et al.*, 2006; DORES, 2007; DAS DORES; FERREIRA, 2012).

O produto final do QMAC é caracterizado por apresentar um formato cilíndrico, plano ou relativamente abaulado nas laterais, com uma crosta fina e de cor amarelada, a qual vai escurecendo com a maturação. Quando maturado, é possível perceber a presença de manchas e leveduras. O aroma da casca é suave, lembrando o cheiro da gordura do leite. A consistência da massa é semidura, macia e homogênea, podendo manifestar olhaduras mecânicas ou de fermentação, sendo redondas e brilhantes, espalhadas no queijo. O gosto e o sabor são agradáveis, levemente ácido e não picante (APROCAN, 2011). Na Tabela 1, é possível visualizar tipos de perigos, justificativas e medidas precaucionárias implementadas nas etapas ao longo da produção do Queijo Minas Artesanal Canastra.

Tabela 1 - Monitoramento com as etapas do processo de preparo do Queijo Minas Artesanal Canastra.

Etapas do processo	Tipos de perigo	Justificativa	Medidas Precautórias
Ordenha	(F) Perigo Físico (porções sólidas, substâncias indesejadas, como detritos, poeira, cabelos, pelos e fezes). (Q) Perigo Químico (resíduos de produtos de higienização).	Contaminação desencadeada pelo manipulador, ambiente, animais, ferramentas e instalações. Procedimento de higienização (enxágue) incorreto.	Implementar as boas práticas de fabricação e assumir um sistema de filtragem do leite posteriormente à ordenha. Minimizar o tempo de exposição do leite. Atender aos procedimentos operacionais padrão (POP) de limpeza e higienização da ordenhadeira.
Transporte de leite cru	(B) Perigo Biológico (microrganismos patógenos). (F) Perigo Físico (resíduos no tanque).	Microrganismos contaminantes presentes no leite cru. Condição de armazenamento. Resíduos aderidos nos tanques de leite.	Propor tempo de manipulação do leite após ordenha (inferior a 90 minutos). Satisfazer os procedimentos operacionais padrão (POP) de limpeza e desinfecção dos tanques.
Recebimento do leite cru	(B) Perigo Biológico (microrganismos patógenos). (Q) Perigo Químico (fragmentos de produtos de limpeza). (F) Perigo Físico (impurezas e vetores).	Microrganismos contaminantes presentes no leite cru. Procedimento de higienização (enxágue) inapropriado. Contaminação pelos equipamentos e instalações.	Definir tempo de manipulação do leite após ordenha (inferior a 90 minutos). Realizar os procedimentos operacionais padrão (POP) de limpeza e higienização da queijaria. Checagem do desempenho correto da cortina de ar e boa condição das telas protetoras.

Adição do coalho	Perigo Biológico (presença de patógenos).	Microrganismos contaminantes presentes no coalho e leite cru.	Dosagem correta do coalho, avaliando o lote alcançado e realizando o controle da qualidade, bem como de seu armazenamento.
Salga	(B) Perigo Biológico (recontaminação microbiana por patógenos).	Recontaminação provocada através do ambiente, manipulação, armazenamento mal vedado ou exposto, materiais e infraestrutura da queijaria.	Ajustar tempo de manipulação do leite posteriormente à ordenha.
Lavagem	(B) Perigo Biológico (recontaminação microbiana por patógenos).	Recontaminação ocasionada por superfícies, manipulador (mão não limpa) e água contaminada (podendo ser desde a sua origem ou não).	Qualidade assegurada da água (livre de contaminante), realizando-se a verificação do teor de cloro e as boas condições da água oriunda do poço artesiano ou rio.
Adição do fermento endógeno (pingo)	(B) Perigo Biológico (contaminação por microrganismos patogênicos).	Multiplicação de microrganismos patogênicos e suas toxinas.	Controlar a temperatura e a acidez do leite, além de monitorar o controle, a qualidade e a higiene. Observar o tempo de manipulação e processamento.
Manipulação da massa	(B) Perigo Biológico (contaminação por microrganismos patogênicos).	Recontaminação do leite.	Higiene dos manipuladores e das superfícies anterior e posteriormente à etapa.
Maturação	(B) Perigo Biológico.	Multiplicação de patógenos. Crescimento de agentes patogênicos na câmara de maturação.	Monitorar o tempo, umidade e temperatura com termômetro. Garantir a ventilação adequada da sala.

Fonte: Adaptado de VEZALLI *et al.* (2022).

Legenda: Identificação dos perigos vigentes durante as etapas de produção do Queijo Minas Artesanal Canastra, desenvolvido em novembro de 2020 em queijaria estudada em São Roque de Minas – MG.

3.3 Coliforme e *Escherichia coli* em água (definição e origem)

As fontes de mananciais de água se caracterizam como grandes reservatórios de microrganismos, especificamente bactérias da família *Enterobacteriaceae* (coliformes), que podem causar uma diversidade de enfermidades, principalmente infecções intestinais (MARA; NORAN, 2003).

O termo coliforme faz menção a um amplo grupo de bactérias aeróbias ou facultativas em forma de bastonetes que são encontradas no trato digestivo de vertebrados, descritas morfológicamente como gram-negativas, não produtoras de esporos e aptas a fermentar lactose produzindo gases como (CO₂) e H₂ e ácidos como o lático e o acético em determinadas temperaturas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; DOS SANTOS; PEDROSA, 2012). Os Coliformes Totais podem ser classificados em dois grupos distintos: coliformes a 35°C e coliformes a 45°C. A principal diferença entre ambos está associada à temperatura ideal para a fermentação: coliformes a 35°C exercem a fermentação a 35°C, enquanto os coliformes

a 45°C, também chamados de termotolerantes, podem fermentar a lactose em temperaturas entre 44,5°C e 45,5°C (HITCHINS *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2006).

De acordo com esse conceito, coliformes envolvem os gêneros bacterianos *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*; portanto, manifestam essas características podendo se dividir no subgrupo de coliformes termotolerantes, que suportam altas temperaturas. Apesar disso, somente a presença de *Escherichia coli* é considerada indicadora de contaminação exclusivamente fecal, por ser encontrada em grande quantidade no trato gastrointestinal do homem e de animais, não sendo isolada, normalmente, em outros nichos. A presença desses gêneros na cadeia produtiva do leite e do QMAC está associada com a contaminação fecal a partir de água contaminada e má higienização dos utensílios e dos equipamentos manuseados no laticínio (PARDI, 1995; BRASIL, 2006; SILVA *et al.*, 2006; OKURA, 2010).

3.3.1 Riscos à saúde animal e humana

O desconhecimento da população acerca dos problemas e causas associados à contaminação e à falta de monitoramento das diferentes fontes de água concorre para a elevada prevalência de doenças de veiculação hídrica em comunidades rurais (CAVALCANTE, 2014). Vários microrganismos encontrados na água que abastece as propriedades podem provocar infecções gastrointestinais em humanos (RIBEIRO *et al.*, 2000). A água, quando contaminada com microrganismos, provoca não somente riscos diretos à saúde das famílias, mas também pode desencadear prejuízos econômicos para os produtores. Essa água utilizada no ambiente de ordenha atua como canal de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos para os animais, reduzindo a qualidade do leite, bem como a sanidade do rebanho (RIBEIRO *et al.*, 2000).

E. coli é uma enterobactéria patogênica ao ser humano, sendo que, dentre as enterobactérias, esta espécie bacteriana é o grupo mais notado por estar associado a um elevado número de casos de doenças infecciosas intestinais. Algumas cepas, ao serem ingeridas por meio da água e/ou do próprio alimento, se desenvolvem no intestino e produzem toxinas que estimulam uma hipersecreção no intestino delgado, provocando hipermotilidade e diarreia, que podem persistir de um a três dias (KUHNERT *et al.*, 2000; LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

As cepas patogênicas de *E. coli* estão agrupadas, conforme os sintomas clínicos e os mecanismos da patogenicidade, em diversos grupos que podem manifestar alterações em suas fases de incubação e ciclos da enfermidade, além de uma considerável variação na

virulência (FORSYTHE, 2013). Grande parte das cepas de *E. coli* vive como comensais do trato intestinal humano; no entanto, algumas cepas carregam uma combinação de genes de virulência (VGs) que lhes confere a capacidade de produzir infecções intestinais com quadros clínicos que podem ser leves, como colite e diarreia, até casos graves, como de colonização extraintestinal, ocasionando meningites, síndrome urêmica hemolítica e sepse nosocomial (FALAGAS; GORBACH, 1995; JOHNSON; STELL, 2000).

Tem sido apresentado por estudos que a habilidade de cepas de *E. coli* se tornarem virulentas deriva de combinações específicas de VGs (GILMORE; FERRETTI, 2003). Forsythe (2013) argumenta que os seis grupos reconhecidos como patogênicos são os seguintes: *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), que causa diarreia sangüinolenta, colite hemorrágica, púrpura trombótica trombocitopênica e síndrome hemolítica urêmica (HUS); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), frequentemente apontada como causadora da diarreia dos viajantes, provoca diarreia aquosa, produzindo febres baixas; *E. coli* enteropatogênica (EPEC), que causa diarreia aquosa infantil, desencadeando febre, vômitos e diarreia aquosa contendo muco, mas não sangue; *E. coli* enteroagregativa (EA_ggEC), que provoca diarreia aquosa persistente, principalmente em crianças com mais de 14 dias; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), que ocasiona diarreias profusas contendo muco e sangue, além de febre alta; e *E. coli* difusamente aderente (DAEC), que está relacionada à diarreia infantil, caracterizando-se por adesão difusa às células intestinais e sintomas leves a moderados, como diarreia aquosa.

A utilização abundante de antibióticos pela população humana e, conseqüentemente, a mesma prática na medicina veterinária, nas últimas décadas, têm exercido um grande impacto na evolução de bactérias patogênicas intestinais (ZHANG *et al.*, 2009). O uso indiscriminado dos antibióticos impulsionou o aparecimento e a propagação de mecanismos de resistência às drogas antimicrobianas, determinados por genes de resistência aos antibióticos (ARGs) (KEMPER, 2008).

3.4 PCR *Fingerprinting* rep-PCR (GTG)₅

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) realiza o aumento do número de cópias de um fragmento específico de DNA cuja região a ser amplificada é previamente definida pelo par de *primers* ou iniciadores, que são pequenas sequências de DNA fita simples, desenvolvidas sinteticamente, correspondentes e específicas a regiões diferentes no DNA de interesse. Desse modo, são segmentos de DNA que pareiam suas bases com a fita-molde,

operando como um iniciador, servindo como ponto de partida para as cópias de DNA a serem formadas, uma vez que eles se conectam à fita-molde (BEJ, 2004).

A técnica (GTG)₅-PCR é uma variação da rep-PCR, amparada em sequências palindrômicas extragênicas repetitivas, que possui como foco regiões envolvendo a repetição da sequência (GTG)₅, dispersas em distintas zonas do genoma bacteriano. A aplicação desta técnica é uma ferramenta eficaz na identificação e diferenciação intraespecífica de genomas bacterianos, possibilitando caracterizar isolados bacterianos desconhecidos e colaborar na análise da identidade de espécies. Os resultados satisfatórios gerados com a utilização da técnica evidenciam a aplicabilidade no rastreamento da diversidade clonal de isolados bacterianos em diferentes locais de amostragem (KATHLEEN *et al.*, 2014).

A técnica (GTG)₅-PCR recorre a um *primer* composto por cinco repetições da sequência GTG (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'). Esse método evidenciou sua importância na geração de padrões de bandas diferentes, garantindo a discriminação dos isolados de acordo com sua procedência genética. O *primer* (GTG)₅, a DNA polimerase, o mix de reagentes e o DNA genômico se destacam como componentes específicos essenciais para a técnica. Comumente, uma etapa inicial de desnaturação, seguida por ciclos com temperaturas específicas de desnaturação, anelamento e extensão, estão integrados no protocolo de amplificação, e os produtos formados são visualizados sob luz UV, migrados e separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com o composto Brometo de Etídeo, obtendo-se perfis genômicos que podem ser avaliados com o auxílio de programas personalizados ou manualmente (MOHAPATRA *et al.*, 2008).

Em razão de seu elevado controle discriminatório, custo reduzido e eficiência, a técnica (GTG)₅-PCR é conhecida como uma ferramenta produtiva em análises genômicas comparativas aplicadas em cenários laboratoriais múltiplos, e é por este motivo que seu emprego, além da caracterização de *E. coli*, é proeminente na avaliação da diversidade genética, em análises microbiológicas e na identificação de isolados de outros gêneros de cepas bacterianas na diferenciação de seus clones. Portanto, é colocada em prática como um recurso adicional na caracterização molecular em pesquisas abrangendo cepas ambientais e, sobretudo, para localizar fontes difusas de contaminação fecal, sendo esse o motivo principal do emprego desta abordagem nesta pesquisa (GEVERS *et al.*, 2001; MOHAPATRA *et al.*, 2008; PPALEXANDRATOU *et al.*, 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em uma área escolhida próxima ao Parque Nacional da Serra da Canastra, no município de São Roque de Minas – MG, atribuída como uma das microrregiões produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra, estabelecida pela Portaria IMA N.º 694, DE 17 DE NOVEMBRO DE 2004 (MINAS GERAIS, 2004). Os critérios de seleção desta área fundamentaram-se na imensa concentração de propriedades rurais que se destacam pela produção regular do QMAC e seguem o modelo de agroecossistemas típicos da agricultura familiar, com empreendimentos que utilizam água oriunda de mananciais para o abastecimento dos sistemas de produção do Queijo Canastra, a qual se caracteriza como atividade produtiva proeminente.

4.2 Coletas de amostras de água

As coletas de amostras de água foram realizadas durante os meses de julho e agosto de 2022, no período de estação seca, levando-se em consideração as condições climáticas predominantes, assim como a sazonalidade da área. As coletas foram divididas e conduzidas em três campanhas semanais distintas, sendo que cada uma incluiu a amostragem em quatro rios, totalizando doze mananciais representativos no decorrer do estudo.

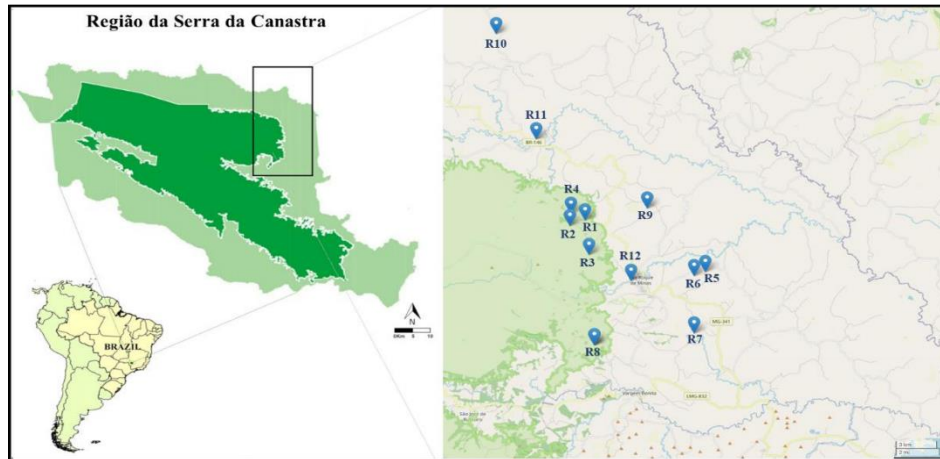
Os 12 mananciais selecionados (Figura 3), considerados de pequeno porte, são utilizados como fontes de abastecimento de água para empreendimentos rurais dos produtores do Queijo Canastra.

Em cada um dos mananciais, o local de coleta das amostras de água foi escolhido próximo ao ponto de captação de água utilizada nas instalações do sistema de produção, tornando-se a referência central e realizando-se a coleta a partir dele, quando possível, cinco pontos adicionais a jusante e cinco pontos adicionais a montante, totalizando 10 pontos de amostragem em cada manancial/rio.

Em cada um dos pontos amostrados, as amostras de águas foram coletadas em triplicata e armazenadas em três tubos Falcon estéreis de 50 mL vazios (Figuras 4 e 5), imediatamente alocados em caixas térmicas contendo gelo artificial, na faixa de 10 e 15 °C, garantindo a manutenção da temperatura apropriada ao longo do transporte. Na sequência, as

amostras foram enviadas para o Laboratório de Pesquisa Multiusuário (LaPeM) do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus Bambuí*, para processamento e isolamento de *E. coli*.

Figura 4 - Mapa dos rios amostrados.



Fonte: DIAMANTE (2023).

Legenda: Localização dos pontos de coleta correspondentes aos doze rios amostrais da região da Serra da Canastra-MG.

Figura 5 - Realização do processo de coleta de amostras de água.



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Coleta de amostras de água em triplicata e armazenadas em tubos Falcon estéreis para serem processadas em Laboratório.

4.3 Isolamento de *Escherichia coli* a partir de amostras de água

O isolamento bacteriano foi realizado a partir de amostras de água, empregando, em capela de fluxo laminar, a técnica de plaqueamento de *spread plate* em meio de cultura cromogênico específico para coliformes e *E. coli*, Chromocult® Coliform Agar (Merck, Germany), por meio de diluições seriadas utilizando-se solução salina estéril 0,85%.

Inicialmente, tubos Falcon de 50 mL contendo amostras de água em triplicata foram centrifugados a 3.000 rpm por vinte minutos, para concentração das populações bacterianas. Após a centrifugação das amostras, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e 1 mL de solução salina estéril foi adicionado aos tubos para ressuspender o concentrado de células bacterianas de cada tubo Falcon individualmente. No decorrer deste processo de ressuspensão, o conteúdo do primeiro tubo Falcon foi transferido para o próximo, sucessivamente, até o terceiro tubo Falcon, todos pertencentes ao mesmo ponto amostral.

Posteriormente, o conteúdo do último tubo foi movido para microtubos de 1,5 mL, representando a diluição D0, correspondente à diluição inicial. A partir disso, foi realizada a diluição seriada das amostras em solução salina a 0,85%, alcançando-se as diluições: D-1, D-2 e D-3 (Figura 6).

Figura 6 - Processamento das amostras de água.



Fonte: A autora, 2024.

Legenda: Manipulação de amostras para a aplicação da técnica de diluição seriada, conduzida no Laboratório de Pesquisa Multiusuário (LaPeM) – IFMG - *Campus* Bambuí.

As amostras diluídas foram plaqueadas em duplicatas usando-se a técnica de *spread plate* em placa de petri contendo o meio Chromocult® Coliform Agar, incubadas em aerobiose por 24-48 horas a 37°C em estufa incubadora (*MyLabor*, São Paulo, Brasil). Foram selecionadas como *Escherichia coli* aquelas colônias que, crescidas em Chromocult® Coliform Agar, apresentassem coloração azul-escuro (BYAMUKAMA *et al.*, 2000). O delineamento experimental previa a seleção de até seis colônias azuis isoladas por ponto de coleta, sempre que havia crescimento e quando tecnicamente possível. Ao final da etapa de isolamento neste meio, foi obtido um total correspondente a aproximadamente 63,45% das colônias azuis previstas no planejamento inicial, considerando-se os pontos com crescimento que geraram os isolados contabilizados na segunda coluna da Tabela 4 de resultados. Essas colônias foram submetidas à técnica de estria de esgotamento em meio Ágar MacConkey (Merck, Alemanha), seletivo para bactérias gram-negativas, e, posteriormente, incubadas em aerobiose em estufa microbiológica, novamente a 37°C, por um período de 24-48 horas.

Os isolados que exibiram colônias de tonalidade branca em Ágar MacConkey foram descartados do experimento, e aqueles que revelaram coloração rosa foram considerados como presuntivos de *E. coli*. Esses isolados foram inoculados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), incubados por um período de 18h-24h, a 37°C, em aerobiose, e, logo após o crescimento, foram criopreservados em duplicata por meio da adição de Glicerol 20% v/v em criotubos de 2 mL e armazenados a -80 °C.

4.4 Caracterização da diversidade molecular de *Escherichia coli*

Para a caracterização genética, os isolados armazenados a -80°C foram reativados utilizando-se um inóculo de 2% v/v do criopreservado e cultivados em caldo BHI, sendo mantidos em estufa microbiológica em aerobiose por 24h a 37° C. Os isolados crescidos foram direcionados para a fase de extração de DNA genômico por meio de um protocolo de extração de DNA total adaptado, empregando-se precipitação salina a partir do método descrito por (MADANI *et al.*, 2022).

As culturas de isolados de *E. coli* foram reativadas em 5 mL de caldo BHI e centrifugadas por quinze minutos a 3.000 rpm, para o descarte do meio de cultura e sedimentação das bactérias. O *pellet* foi lavado com água MiliQ autoclavada, e, após a centrifugação a 3.000 rpm, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em 450 µl de Tampão de Lise e, posteriormente, transferido para um microtubo de 1,5 mL.

Na sequência, 2 uL de Proteinase K (*Thermo Fisher Scientific* Waltham, MA, EUA) (20ng/μl) foram adicionados ao *pellet* e homogeneizados por meio de vórtex. As amostras foram incubadas a 40°C por vinte minutos, com homogeneizações rápidas, em intervalos de cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 300 μl de NaCl (5M) nos microtubos, os quais foram misturados por inversão e, posteriormente, centrifugados por vinte minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, previamente identificado, com adição de 600 μl de Etanol absoluto e 30 μl de acetato de sódio (3M), e as amostras foram incubadas a -20°C *overnight*.

Dando prosseguimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Depois, 500 μl de Etanol 70% foram adicionados ao *pellet*, que, novamente, foi centrifugado para lavagem. Depois de descartado o sobrenadante, secou-se o *pellet* em estufa microbiológica a 70°C por trinta minutos. Por fim, o DNA extraído foi ressuspendido em 100 uL de T.E. pH 8,0 autoclavado, sendo homogeneizado após incubação em banho-maria por quinze minutos.

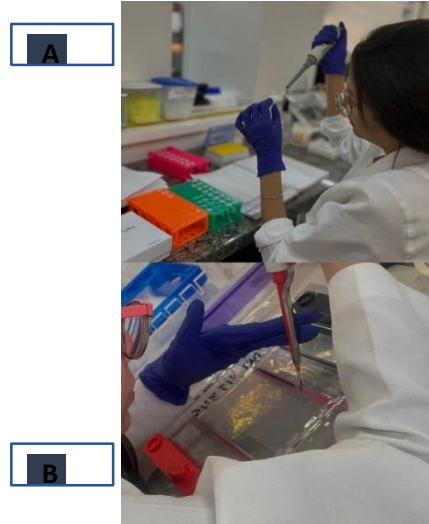
Depois da extração do DNA genômico, o material genético de cada uma das amostras foi submetido a análises para avaliação da quantificação de ácido nucleico e da pureza, por meio do uso do NanoDrop™ One^e (*Thermo Fisher Scientific* Waltham, MA, EUA). Após a quantificação, o DNA de todos os isolados foi diluído para concentração de uso de 50 ng/μl usando-se água ultrapura.

4.4.1 *Fingerprinting rep-PCR (GTG)₅*

O DNA extraído foi submetido a *fingerprinting rep-PCR (GTG)₅*. Esta técnica de reação em cadeia da polimerase (REP-PCR) possibilita registrar perfis genéticos em linhagens bacterianas por meio da formação de um padrão de bandas, produzidas pela utilização de *primer* degenerado seguido da resolução dos *amplicons* em eletroforese em gel. Os procedimentos para as condições de reações foram seguidos conforme a metodologia estabelecida por Gever e seus colaboradores (2001), através do uso de 1μM do iniciador de sequência GTG₅: 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3' e mix de reagentes, constituído por: Master mix (Cellco); gelatina 0,0008%; água ultrapura e 100 ng de DNA genômico individual, em um volume total de 25 μL. O termociclador utilizado foi o BIO-RAD T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), configurado com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial com 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (sendo cada ciclo composto por desnaturação a 94°C por 1 minuto,

anelamento a 40°C por 1 minuto, polimerização a 65°C por 8 minutos), terminando com a polimerização final a 65°C por 16 minutos. Os produtos amplificados gerados foram resolvidos em eletroforese (Figura 7) em gel de agarose 2% (LGC Biotecnologia) corado com Brometo de Etídeo, tendo os fragmentos visualizados em transluminador de UV (NOVA EC-020) com fotodocumentação pela câmera.

Figura 7 - Realização das técnicas de Biologia Molecular.

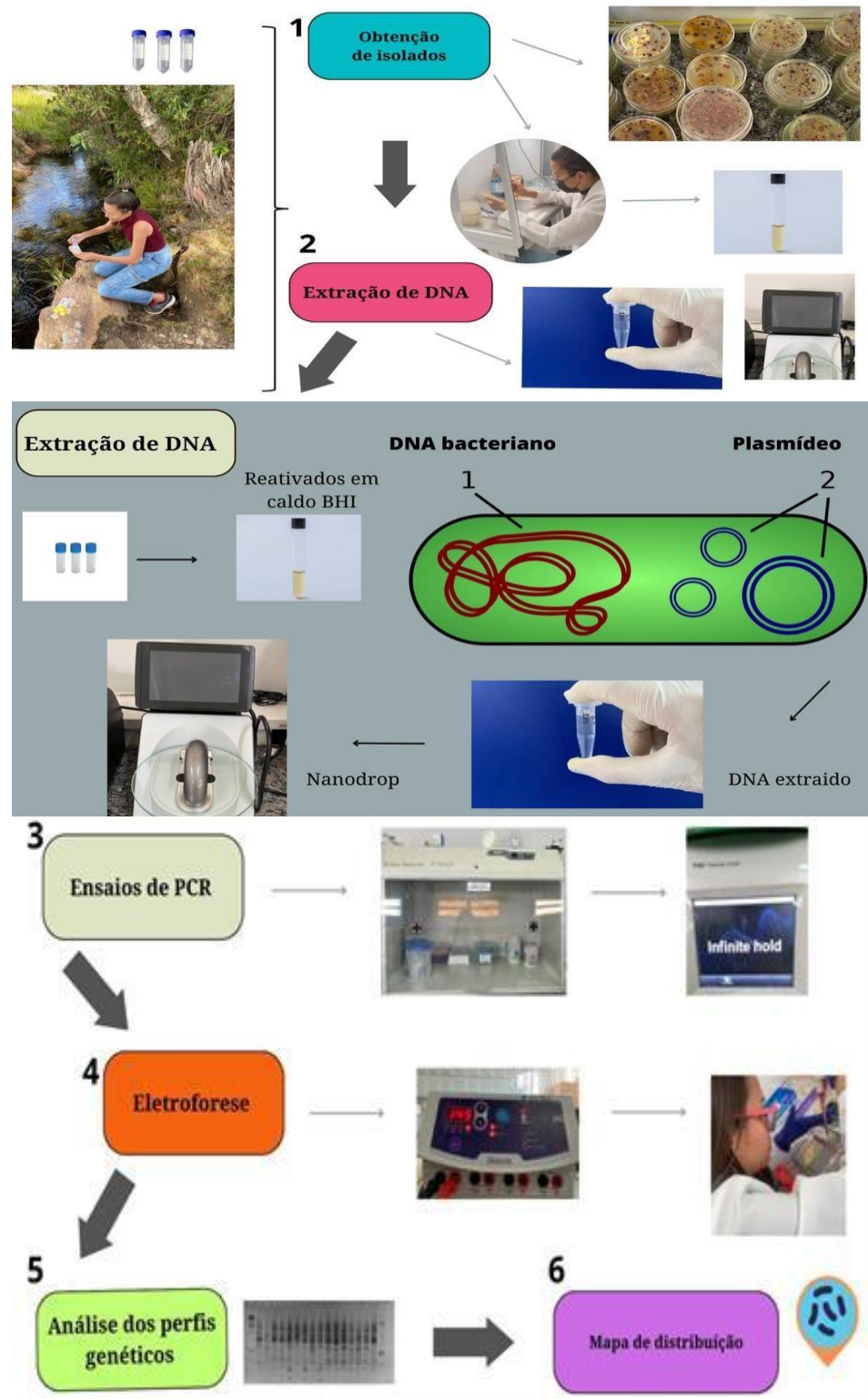


Fonte: Autora (2024).

Legenda: Execução da técnica de PCR para amplificação do DNA (imagem A) e aplicação de amostras na cuba utilizando a técnica de eletroforese em gel, para separação das moléculas de DNA e visualização dos padrões de bandas (Imagem B).

Na Figura 8, temos uma esquematização de toda a metodologia empregada neste trabalho.

Figura 8 - Esquema ilustrativo das etapas metodológicas da pesquisa.



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Esquema da metodologia aplicada, representando a etapa inicial, desde a coleta das amostras até a fase final molecular. 1. Processamento das amostras; 2. Extração do DNA; 3. PCR; 4. Técnica de Eletroforese; 5. Visualização dos perfis genéticos; 5. Mapa de distribuição.

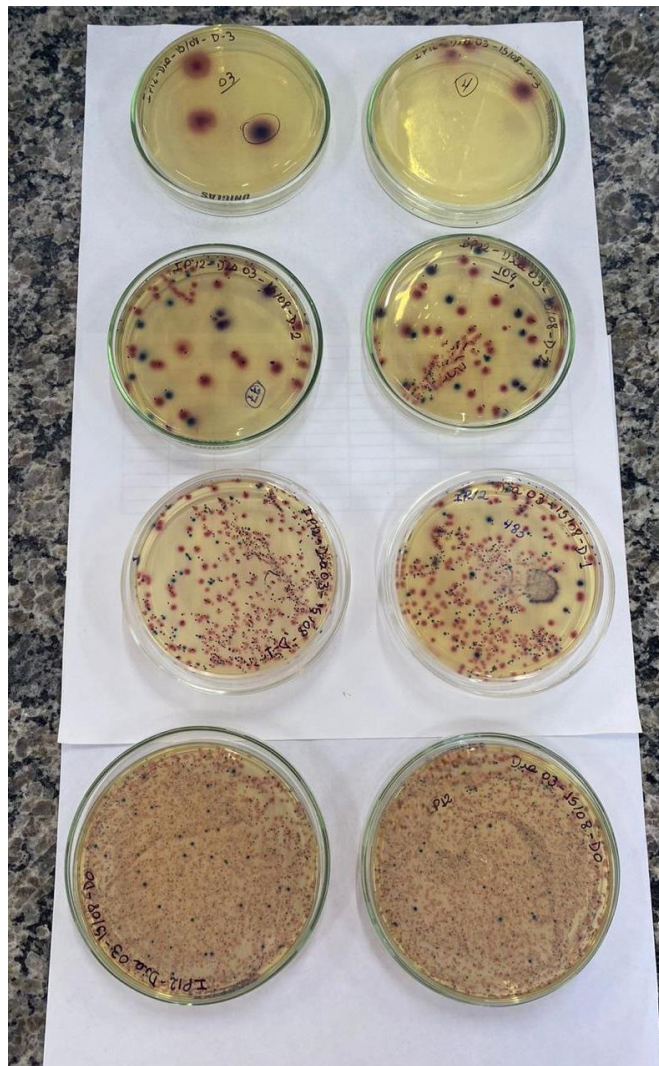
4.4.2 *Análise de dados*

Os géis foram analisados por meio da observação direta, gerando uma matriz de fragmentos a partir da qual foi avaliada visualmente a variabilidade nos padrões de bandas obtidos por PCR-GTG₅. Os padrões de bandas foram comparados entre isolados obtidos em um mesmo manancial, com o objetivo de identificar padrões de bandas semelhantes, indicativos de isolados que pertencem à mesma linhagem bacteriana e padrões diferentes, indicativos de linhagens bacterianas distintas. Os resultados dessa análise foram plotados em uma tabela. Pretendeu-se realizar uma análise preliminar dos resultados para identificar possíveis padrões genéticos distintos entre as amostras coletadas de diferentes mananciais que abastecem as queijarias da Serra da Canastra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos isolados de *Escherichia coli* a partir de 101 amostras de água coletadas em pontos distribuídos ao longo de 12 rios que abastecem queijarias na região da Serra da Canastra. O delineamento experimental previa a coleta de até dez pontos por rio, número que variou conforme a viabilidade de acesso e as condições ambientais de cada manancial. Três tubos Falcons de 50 ml foram registrados em cada um desses pontos. Essas amostras foram processadas e usadas para isolamento inicial de *E. coli*; por exemplo, a Figura 9, que apresenta uma placa de meio Chromocult®, em que as colônias de tonalidade azul e roxo destacam o aspecto característico das colônias selecionadas como presuntivas de *E. coli* nesse meio.

Figura 9 - Colônias presuntivas para Coliformes totais e *E. coli* crescidas em meio Chromocult®.



Fonte: Autora (2025).

Legenda: Crescimento de colônias presuntivas de coliformes totais e *Escherichia coli* em meio Chromocult®. A distinção morfológica das colônias pode ser amparada na coloração específica: Colônias Presuntivas de Coliformes Totais revelam coloração rosa neste meio; por outro lado, Colônias Presuntivas de *Escherichia coli* demonstram coloração em tonalidades de roxo escuro e azul-marinho.

Na imagem acima, a diferenciação visual entre os dois grupos bacterianos analisados, coliformes totais e *Escherichia coli*, cultivados em meio Chromocult®, torna-se aparente. Identificam-se replicatas técnicas em que, de forma geral, as placas apresentaram expressivo crescimento bacteriano, predominantemente de coliformes totais, observado pela coloração rosa, característica do grupo. As colônias que exibem uma coloração mais escura, com tonalidades que variam do roxo intenso ao azul-marinho, são presuntivas para *E. coli*. Os resultados da enumeração destes dois grupos bacterianos nos diferentes pontos amostrais estão sumarizados na Tabela 2, revelando as contagens de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de coliformes totais e *E. coli*.

Tabela 2 - Contagem de Colônias (UFC/mL) de Coliformes e *E. coli*.

PONTOS AMOSTRAIS	CONTAGEM COLIFORMES TOTAIS (UFC/mL)	CONTAGEM <i>E. COLI</i> (UFC/mL)
R1P1	$9,67 \times 10^{-1}$	$3,33 \times 10^{-1}$
R1P2	$4,13 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-2}$
R1P3	$1,30 \times 10^1$	$2,33 \times 10^{-1}$
R1P4	$3,67 \times 10^0$	$1,33 \times 10^{-1}$
R1P5	$1,93 \times 10^1$	$2,33 \times 10^{-1}$
R1P6	$2,43 \times 10^0$	$1,33 \times 10^{-1}$
R1P7	$7,00 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-2}$
R1P8	$1,80 \times 10^1$	$2,00 \times 10^{-1}$
R1P9	$2,67 \times 10^0$	Ausência de crescimento
R1P10	$1,20 \times 10^1$	$1,00 \times 10^{-1}$
R2P1	$1,50 \times 10^1$	Ausência de crescimento
R2P2	$1,83 \times 10^1$	$7,33 \times 10^{-1}$
R2P3	$7,33 \times 10^{-1}$	Ausência de crescimento
R2P6	$2,37 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-2}$
R2P7	$4,43 \times 10^0$	$6,67 \times 10^{-2}$
R2P8	$4,33 \times 10^{-1}$	$3,33 \times 10^{-2}$
R2P9	$4,67 \times 10^0$	$2,67 \times 10^{-1}$
R2P10	$4,33 \times 10^{-1}$	$6,67 \times 10^{-2}$
R3P1	$6,67 \times 10^0$	$1,27 \times 10^0$
R3P2	$6,03 \times 10^1$	$3,00 \times 10^{-1}$
R3P3	$2,43 \times 10^0$	$3,00 \times 10^{-1}$

R3P4	$1,53 \times 10^2$	$7,67 \times 10^{-1}$
R3P5	$1,40 \times 10^1$	$2,67 \times 10^{-1}$
R3P6	$3,67 \times 10^1$	$1,67 \times 10^{-1}$
R3P7	$1,73 \times 10^2$	$8,00 \times 10^{-1}$
R3P8	$5,97 \times 10^1$	$2,00 \times 10^{-1}$
R3P9	$1,60 \times 10^2$	$4,67 \times 10^{-1}$
R3P10	$2,13 \times 10^1$	$5,67 \times 10^{-1}$
R4P1	$7,33 \times 10^0$	Ausência de crescimento
R4P2	$4,27 \times 10^0$	$2,00 \times 10^{-1}$
R4P3	$3,33 \times 10^1$	$2,67 \times 10^{-1}$
R4P4	$2,63 \times 10^1$	Ausência de crescimento
R4P5	$2,87 \times 10^1$	Ausência de crescimento
R5P1	$8,80 \times 10^2$	$1,40 \times 10^2$
R5P2	$4,47 \times 10^2$	$8,00 \times 10^0$
R5P3	$5,00 \times 10^0$	$2,90 \times 10^0$
R5P4	$9,00 \times 10^0$	$6,30 \times 10^{-1}$
R5P5	$1,53 \times 10^1$	$1,70 \times 10^{-1}$
R5P6	Incontável	$1,70 \times 10^{-1}$
R6P1	$2,37 \times 10^1$	$1,80 \times 10^0$
R6P2	$4,80 \times 10^1$	$1,30 \times 10^{-1}$
R6P3	$1,17 \times 10^1$	$3,33 \times 10^{-1}$
R6P4	$2,43 \times 10^1$	$9,33 \times 10^{-1}$
R6P5	$2,87 \times 10^1$	$4,30 \times 10^0$
R6P6	$4,00 \times 10^0$	$2,03 \times 10^0$
R7P1	$5,00 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-2}$
R7P2	$5,23 \times 10^0$	$2,00 \times 10^{-1}$
R7P3	$3,90 \times 10^0$	$7,00 \times 10^{-2}$
R7P4	$1,60 \times 10^0$	Ausência de crescimento
R7P5	$6,00 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-2}$
R7P6	$5,27 \times 10^0$	$2,70 \times 10^{-1}$
R7P7	$4,03 \times 10^0$	$1,00 \times 10^{-1}$
R7P8	$1,43 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-2}$
R7P9	$2,47 \times 10^0$	$1,00 \times 10^{-1}$
R7P10	$2,20 \times 10^1$	$3,33 \times 10^{-2}$
R8P2	$1,03 \times 10^1$	$1,33 \times 10^{-1}$
R8P3	$3,73 \times 10^0$	$1,00 \times 10^{-1}$
R8P4	$2,57 \times 10^0$	$4,00 \times 10^{-1}$
R8P5	$1,83 \times 10^1$	$4,33 \times 10^{-1}$
R8P6	$2,47 \times 10^1$	$3,80 \times 10^0$
R8P7	$1,30 \times 10^1$	$9,70 \times 10^{-1}$
R8P8	$6,00 \times 10^0$	$3,33 \times 10^{-1}$
R8P9	$4,30 \times 10^0$	$2,00 \times 10^{-1}$
R8P10	$6,57 \times 10^0$	$2,00 \times 10^{-1}$
R9P1	$3,97 \times 10^1$	$2,00 \times 10^{-1}$

R9P2	1,57×10 ¹	2,00×10 ⁻¹
R9P3	1,60×10 ⁰	7,00×10 ⁻²
R9P4	3,17×10 ¹	1,20×10 ⁰
R9P5	2,67×10 ¹	2,00×10 ⁻¹
R9P6	5,27×10 ⁰	1,00×10 ⁻¹
R9P7	1,93×10 ¹	4,00×10 ⁻¹
R9P8	5,00×10 ⁰	Ausência de crescimento
R9P9	9,67×10 ¹	3,00×10 ⁻¹
R910	1,40×10 ¹	1,70×10 ⁻¹
R10P1	3,467×10 ²	8,70×10 ⁻¹
R10P2	4,80×10 ¹	3,70×10 ⁻¹
R10P3	2,20×10 ²	8,00×10 ⁻¹
R10P4	1,30×10 ²	1,70×10 ⁰
R10P5	7,00×10 ⁻²	Ausência de crescimento
R10P6	4,90×10 ¹	2,73×10 ⁰
R10P7	6,00×10 ¹	3,70×10 ⁻¹
R10P8	6,67×10 ¹	5,00×10 ⁻¹
R10P9	6,13×10 ¹	2,00×10 ⁻¹
R10P10	8,00×10 ¹	6,70×10 ⁻¹
R11P2	4,00×10 ⁰	7,00×10 ⁻²
R11P3	2,00×10 ⁰	Ausência de crescimento
R11P4	5,53×10 ⁰	3,00×10 ⁻²
R11P5	5,10×10 ⁰	1,70×10 ⁻¹
R11P6	4,80×10 ⁰	1,30×10 ⁻¹
R11P8	1,67×10 ⁰	1,00×10 ⁻¹
R11P9	4,73×10 ⁰	1,00×10 ⁻¹
R11P10	9,00×10 ⁰	5,70×10 ⁻¹
R12P1	3,5×10 ⁰	3,00×10 ⁻²
R12P2	3,83×10 ⁰	1,00×10 ⁻¹
R12P3	1,97×10 ¹	3,00×10 ⁻¹
R12P5	2,97×10 ¹	3,70×10 ⁻¹
R12P6	5,47×10 ¹	1,30×10 ⁻¹
R12P7	4,20×10 ¹	3,00×10 ⁻¹
R12P8	3,47×10 ¹	1,30×10 ⁻¹
R12P9	7,33×10 ⁰	1,00×10 ⁻¹
R12P10	1,00×10 ¹	2,00×10 ⁻¹

Fonte: Autora (2025).

Legenda: Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* presentes em amostras de água coletadas de doze rios pertencentes à área da Serra da Canastra. Os produtos do plaqueamento podem ser manifestados em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Células da tabela com valores indicados como "Ausência de crescimento" indicam inexistência de bactéria para aquele ponto. A letra "R" aponta o rio, o primeiro número representa o número do rio amostrado, a letra "P" se refere ao ponto de coleta dentro do rio e o segundo número indica o ponto específico. Exemplo: o código "R1P1"

corresponde ao primeiro ponto do primeiro rio. Quando possível, foram coletados até 10 pontos em cada rio.

As contagens microbiológicas efetuadas para pontos amostrais coletados dos doze rios apresentam variações significativas na média das contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* (Tabela 3).

Tabela 3 - Valor médio de contagem de coliformes totais e *E. coli*.

Rio	Média de coliformes totais (UFC/ mL)	Média de <i>E. coli</i> (UFC/mL)
1	8,32	0,16
2	5,80	0,20
3	68,71	0,51
4	19,98	0,23
5	271,26	25,31
6	23,40	1,59
7	5,69	0,10
8	9,94	0,73
9	25,57	0,32
10	106,18	0,91
11	4,60	0,17
12	22,82	0,18

Fonte: Autora (2025).

Legenda: Valores médios das contagens de coliformes totais e *E. coli* (UFC/mL) obtidos nas amostras analisadas. A partir dos resultados, foi possível identificar as maiores e menores médias para os grupos.

A menor média de coliformes totais foi encontrada no Rio 11 (4,60 UFC/mL), enquanto o Rio 5 apresentou o valor mais elevado, com 271,26 UFC/mL, sugerindo abundância superior na população desses microrganismos perante os outros rios analisados. No que se refere à contagem de *E. coli*, o Rio 5 demonstrou também o maior valor médio (25,31 UFC/mL), o que evidencia provavelmente um grau alto de contaminação fecal. Com média de (0,10 UFC/mL), o Rio 7 manifestou a menor contaminação por *E. coli* na amostragem. As avaliações realizadas apontam o Rio 5 como o mais contaminado em termos de qualidade microbiológica da água, sendo o rio com contagem maior nas análises, referentes a coliformes e também enumeração de *E. coli*.

Em seguida à identificação, contagem e isolamento das colônias azuis presuntivas de *Escherichia coli*, por meio do plaqueamento em meio Chromocult®, foi realizada uma

triagem desses isolados em ágar MacConkey com a finalidade de confirmar fenotipicamente o crescimento característico deste grupo bacteriano. Foi identificado que nem todas as colônias azuis e roxas isoladas em Chromocult® apresentaram crescimento ou coloração compatível com o perfil esperado para *E. coli* no meio MacConkey, percebendo que algumas não cresceram, e outras apresentaram colônias brancas, características de não fermentadores de lactose (Figura 10), sendo todos estes isolados descartados do experimento. A Figura 11 evidencia que os isolados que demonstram coloração rosa, indicativa de fermentação da lactose, foram, portanto, mantidos para as próximas etapas do experimento e foram considerados como *E. coli*. Dados como este reforçam o impacto de efetuar um segundo teste de verificação, como o meio de cultura utilizado para a confirmação da presença de *E. coli*, em razão de garantir a confiabilidade dos resultados, certificando que, por meio do Chromocult®, por exemplo, foi possível visualizar o crescimento de outras bactérias que também apresentam coloração azul e que não foram confirmadas como *E. coli*.

Figura 10 - Placa de MacConkey com crescimento bacteriano de coloração branca.



Fonte: Autora (2025).

Legenda: Placa de MacConkey revelando desenvolvimento bacteriano com coloração branca, representativo de microrganismos não fermentadores de lactose. Isolados com esta característica foram desconsiderados como *Escherichia coli*, dado que essa espécie exibe crescimento com coloração rosa nesse meio, em função de fermentar lactose.

Figura 11 - Placa de MacConkey com crescimento bacteriano de *Escherichia coli*.



Fonte: Autora (2025).

Legenda: Técnica de inoculação em placa de MacConkey com crescimento de coloração rosa: etapa confirmatória que possibilitou verificar bactérias fermentadoras de lactose, como a *Escherichia coli*, que acidifica o meio e forma isolados rosados.

O Chromocult® Coliform Agar é um meio cromogênico seletivo e discriminatório, elaborado para a detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli*, sendo um meio referência para a identificação destes microrganismos em alimentos e água potável. Sua seletividade é assegurada pela presença de inibidores como o natriumheptadecil sulfato, que anula o crescimento de bactérias Gram-positivas sem influenciar os coliformes-alvo (MERCK, 2013). A distinção acontece por meio de dois substratos cromogênicos: Salmon-GAL, hidrolisado pela enzima β -D-galactosidase, presente em coliformes, gerando colônias de cor vermelho-rosado, e X-glucurônico, hidrolisado pela enzima β -D-glucuronidase, específica de *E. coli*, produzindo colônias de cor azul a violeta (MERCK, 2014).

Finney e colaboradores (2003), em seus estudos, analisaram que uma porcentagem de 11,25% das colônias, a princípio identificadas como *E. coli*, nesse meio, eram, entretanto, falsos positivos para a atividade da enzima β -D-glucuronidase. Cepas de *Citrobacter* e *Enterobacter* exibiram essa atividade enzimática, apresentando colônias com coloração violeta e azuladas visualmente similares às de *E. coli*, evidenciando a possibilidade de interferência de outras bactérias na identificação precisa de *E. coli* em meios cromogênicos. Portanto, observaram que, apesar de o meio Chromocult® Coliform Agar ser consideravelmente conhecido e utilizado pelo seu desempenho na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli*, suas análises apontaram que pode existir insuficiências quanto à sua especificidade.

Uma revisão atual reapresenta que o uso clínico do MacConkey é diferencial e seletivo, sendo, portanto, crucial para triagem de bacilos Gram-negativos e também na determinação de agentes patogênicos como *E. coli*. Este estudo confirma que seu componente seletivo impede o crescimento de bactérias Gram-positivas, e seu caráter diferencial garante discriminar microrganismos de acordo com seu potencial de fermentar lactose. Desse modo, devido à acidificação do meio e consequente mudança no indicador de pH, bactérias fermentadoras de lactose, como *E. coli*, produzem colônias de coloração rosa a vermelho. Em oposição, colônias esbranquiçadas e opacas são formadas quando crescem bactérias não fermentadoras de lactose, possibilitando uma distinção visual concisa entre os grupos (JUNG; HOILAT, 2025)

Na Tabela 4, temos um copilado do número de isolados presuntivos de *E. coli* recuperados nas placas de cada ponto amostral em placas de Chromocult e o número de isolados comprovados como *E. coli* confirmados em MacConkey.

Tabela 4 - Número de isolados azuis (Chromocult) e número de confirmados como *E. coli* (MacConkey - rosa).

Ponto amostral	N.º isolados azuis (Chromocult)	N.º confirmados (MacConkey)
R1P1	1	1
R1P2	1	0
R1P3	5	0
R1P4	4	3
R1P5	6	4
R1P6	0	0
R1P7	1	1
R1P8	6	3
R1P9	0	0
R1P10	4	3
R2P1	0	0
R2P2	6	1
R2P3	0	0
R2P6	1	1
R2P7	3	0
R2P8	1	0
R2P9	4	1
R2P10	2	0
R3P1	6	1
R3P2	4	1
R3P3	2	0
R3P4	4	0

R3P5	3	0
R3P6	5	0
R3P7	6	2
R3P8	3	2
R3P9	6	1
R3P10	6	0
R4P1	0	0
R4P2	5	1
R4P3	7	1
R4P4	0	0
R4P5	0	0
R5P1	5	3
R5P2	5	3
R5P3	5	3
R5P4	5	4
R5P5	2	1
R5P6	0	0
R6P1	5	5
R6P2	2	2
R6P3	3	3
R6P4	5	5
R6P5	5	4
R6P6	5	3
R7P1	1	0
R7P2	4	0
R7P3	2	0
R7P4	0	0
R7P5	0	0
R7P6	5	1
R7P7	2	1
R7P8	1	0
R7P9	2	1
R7P10	1	1
R8P2	3	3
R8P3	3	2
R8P4	4	4
R8P5	5	2
R8P6	5	2
R8P7	5	4
R8P8	5	1
R8P9	5	2
R8P10	5	2
R9P1	5	5
R9P2	5	5

R9P3	2	1
R9P4	5	3
R9P5	2	2
R9P6	3	3
R9P7	5	5
R9P8	0	0
R9P9	6	5
R9P10	4	3
R10P1	4	2
R10P2	6	2
R10P3	6	5
R10P4	6	2
R10P5	0	0
R10P6	4	1
R10P7	4	3
R10P8	4	2
R10P9	3	3
R10P10	4	2
R11P2	0	0
R11P3	0	0
R11P4	1	0
R11P5	2	2
R11P6	2	0
R11P8	2	2
R11P9	2	1
R11P10	6	3
R12P1	1	1
R12P2	1	1
R12P3	5	4
R12P5	5	2
R12P6	4	3
R12P7	6	3
R12P8	4	3
R12P9	2	2
R12P10	5	3

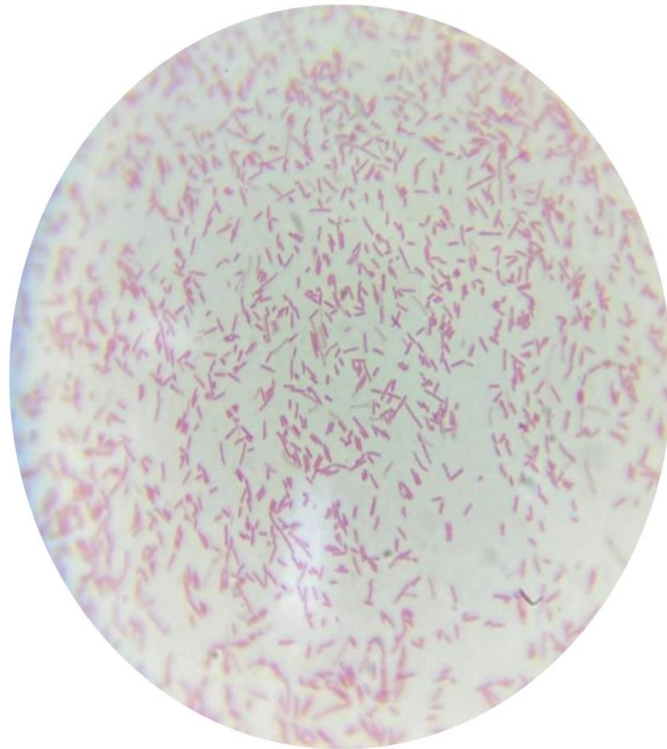
Fonte: Autora (2025).

Legenda: Número de isolados azuis presuntivos de *Escherichia coli* plaqueados em meio Chromocult e quantidade de amostras confirmadas em MacConkey com crescimento de colônias rosa, indicativas de fermentação da lactose (característica de *E. coli*) por ponto amostral em distintos rios da região da Serra da Canastra-MG.

Ao término da triagem fenotípica em meio MacConkey, foram descartados os isolados que manifestaram a cor branca. Seguindo este critério, foram considerados confirmados e selecionados para a fase de caracterização molecular 184 isolados que expressaram coloração rosa, indicativa de fermentação de lactose, e, analisados na coloração de Gram, demonstraram perfil morfológico típico de bastonetes gram-negativos (Figura 12), reforçando sua classificação como *E. coli*. Além dos isolados dos rios, incluíram-se, também, amostras de torneira com essas mesmas características.

Estes isolados comprovados foram regularmente armazenados e expostos à caracterização molecular, fase referente à confirmação genotípica, a qual utiliza a técnica de PCR para a avaliação da diversidade genética da espécie em questão.

Figura 12 - Imagem de Coloração de Gram da bactéria *E. coli*.

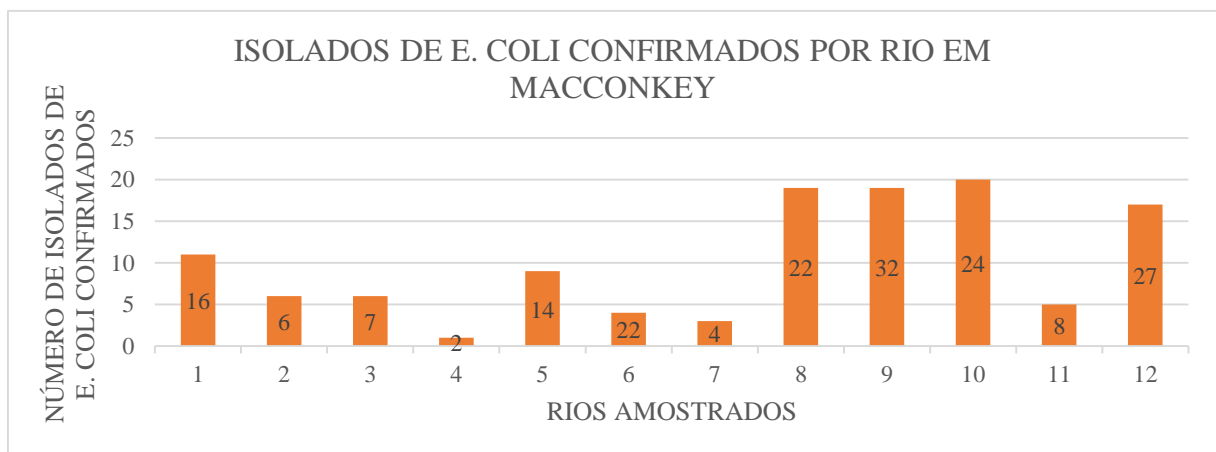


Fonte: Autora (2025).

Legenda: A detecção pela técnica de coloração de Gram possui a finalidade de distinguir grupos bacterianos em função da composição química de suas paredes celulares através da ação do álcool e de corantes como o Cristal Violeta e a Safranina. A imagem mostra a análise microscópica da técnica de coloração de Gram de um isolado crescido em meio MacConkey com coloração rosa. A coloração evidencia como resultado a manifestação de bacilos Gram-negativos, coerente com a morfologia de *Escherichia coli*.

O gráfico 1 (Figura 13) apresenta os doze rios estudados, cada um com suas respectivas quantidades de isolados comprovados de *E. coli* em meio ágar MacConkey. Nota-se que as maiores quantidades de isolados foram identificadas nos rios 9, 10 e 12, com 32, 24 e 27, respectivamente. Por sua vez, o rio 4, que apresentou 2 isolados, e o rio 7, que apresentou 4 isolados, registraram os menores valores de *E. coli*. Com quantidades intermediárias de isolados, entre esses extremos, os rios 6 e 8 mostraram-se empatados, apresentando 22 isolados cada. O rio 1 apontou 16 isolados e, consecutivamente, o rio 5 contabilizou 14. O rio 11 registrou 8 isolados, e o rio 3, em seguida, 7 isolados; por fim, o rio 2 apresentou 6 isolados no total. Essa leitura da quantidade de isolados confirmados como *E. coli* expõe que, embora dois rios tivessem a mesma quantidade de isolados, existe uma diversidade significativa de isolados de rio para rio.

Figura 13 - Número de isolados de *E. coli* nos doze rios estudados comprovados em meio ágar MacConkey.



Fonte: A, autora (2025)

Legenda: Gráfico de barras exemplificando número de isolados de *Escherichia coli* confirmados em meio MacConkey para cada rio amostrado na região da Serra da Canastra.

Os rios 9 e 10 são próximos e possuem seus pontos de captação em níveis mais baixos em relação aos locais de produção das propriedades rurais. Essa distinção de altitude pode esclarecer a maior contaminação fecal identificada nesses rios, destacada pelo maior número de isolados de *Escherichia coli* confirmados. Rios localizados em áreas de menor altitude estão mais vulneráveis, o que leva a supor que a concentração de contaminantes ao longo de seu percurso é mais elevada. A inclinação do terreno em direção ao manancial pode possibilitar a acumulação de poluentes microbiológicos nessas áreas.

Estes resultados estão em concordância com os encontrados por Zhang e colaboradores (2023), que discutem o impacto do padrão paisagístico na qualidade da água, notadamente em áreas com distintos relevos topográficos, isto é, diferentes altitudes e formas de terreno. Ainda, o estudo defende que as atividades humanas (como pecuária, agricultura e urbanização, por exemplo) mudam o padrão da paisagem, e isso altera a forma como a natureza funciona ao redor dos rios. Essas mudanças no uso da terra afetam processos naturais importantes, como: a erosão do solo, o ciclo hidrológico, a migração e a transformação de nutrientes. Dessa forma, é crucial entender como o padrão e as mudanças na paisagem influenciam a qualidade da água dos rios, pois compreender essa relação auxilia a gerenciar e proteger, de maneira eficiente, os recursos ambientais ecológicos e recursos hídricos. Assim, considerar pequenas modificações realizadas na propriedade pode ter impacto positivo na qualidade da água. Outro fator importante e característico detectado no rio 10 foi a grande presença de javalis em seu entorno. Esses animais silvestres, comuns na região da Serra da Canastra, podem transitar pelas áreas de entorno dos mananciais, colaborando para o aumento da carga microbiológica através da eliminação de dejetos nas proximidades dos mananciais. Estudos semelhantes mostram que o javali (*Sus scrofa*) representa um risco imediato. Seu impacto, além de ser econômico, interferindo diretamente no predatismo às lavouras, tornou-se também uma ameaça em condições sanitárias, visto que prejudica o bem-estar de outros animais, como o gado, e também seres humanos. Portanto, o dano ambiental que esta espécie causa, competindo por recursos com animais silvestres, polui e assoreia cursos d'água, predando fauna e flora (LOBO, 2022).

Por meio do cálculo da variância, tornou-se viável observar a homogeneidade e heterogeneidade da disposição do número de isolados bacterianos entre os pontos de coleta em cada um dos doze rios pesquisados. O rio que se manifestou com maior quantidade de números similares de isolados entre seus diferentes pontos de coleta foi avaliado como o mais homogêneo, de mesma forma que aquele que se revelou com maior diversidade de isolados entre os pontos foi considerado o mais heterogêneo. No conjunto dos rios analisados, foi possível perceber que o rio que demonstrou a dispersão mais homogênea de isolados foi o rio 7, sem variação na quantidade de isolados, sendo que seus pontos registraram 1 isolado cada; enquanto isso, o rio 9 foi o mais heterogêneo, variando entre 1 e 5 no número de isolados, indicando grande variação entre os pontos.

A comparação entre os rios 4, 7 e 9 retrata, de maneira muito significativa, como os traços da paisagem e da ocupação do entorno estão associados à diversidade de isolados de *E. coli*. Os rios 4 e 7, cujos mananciais estão localizados acima da área de produção, recebem

menor intervenção humana direta, o que pode indicar que a contaminação está distribuída de forma constante ao longo do curso dos rios. Em contraste, o rio 9 possui seus pontos de captação abaixo da área produtiva e margens mais diversificadas, incluindo uma estrutura produtiva rural demonstrando maior heterogeneidade genética, podendo sugerir que há fontes pontuais de contaminação fecal, isto é, em um ponto específico, entra mais *E. coli*. Uma pesquisa implica a presença de distribuição heterogênea de bactérias conforme o local de coleta examinando a concentração de *E. coli* em sedimentos ao longo de um córrego, assim como seus efeitos para a amostragem, percebendo alta variabilidade espacial entre os pontos de coleta e revelando que um único ponto pode não representar satisfatoriamente toda a seção do riacho (SALAM *et al.*, 2021). Em outra perspectiva, a visão de um estudo demonstrou que, em um córrego menor, as concentrações de *E. coli* se mantêm uniformes e em diferentes profundidades na coluna d'água, sem variação expressiva entre pontos de amostragem próximos, o que caracteriza claramente a distribuição homogênea, expondo que um único ponto pode ser representativo do trecho (BUCKALEW *et al.*, 2015).

Um total de 184 isolados foi indicado e submetido mais tarde à extração de DNA genômico para obtenção do material genético para análises moleculares subsequentes. Na Tabela 5, são esclarecidos os registros de quantificação do DNA extraído dos isolados de *E. coli*, envolvendo as concentrações (ng/μL), razões de pureza A260/A280 e A260/A230 e seus referentes códigos de identificação das amostras de DNA. Cada um dos isolados recebeu um código de reconhecimento que pode ser definido pelo seguinte padrão: (Número do Rio), (Número do Ponto de Coleta do Rio), (Letra "I", indicando Isolado), (Número Ordenado do Isolado), (Letra "S", referente à estação seca), a exemplo do código "1.1 I 1 S", que faz menção ao primeiro isolado de *E. coli* alcançado no ponto 1 de coleta do rio 1.

Tabela 5 - Quantificação do DNA extraído dos isolados de *E. coli*.

Amostras (Códigos)	Concentração de DNA (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
1.1 I 1 S	726.3	2.13	2.46
1.4 I 1 S	828.2	2.14	2.50
1.4 I 3 S	858.1	2.10	2.37
1.4 I 4 S	573.5	2.13	2.46
1.5 I 3 S	527.5	2.13	2.45
1.5 I 4 S	682.9	2.11	2.45
1.5 I 5 S	706.6	2.12	2.48
1.5 I 6 S	613.1	2.12	2.58
1.7 I 1 S	423.9	2.11	2.44
1.8 I 2 S	749.1	2.11	2.42

1.8 I 3 S	345.6	2.12	2.48
1.8 I 5 S	292.3	2.03	1.64
1.10 I 2 S	350.3	1.95	1.20
1.10 I 3 S	699.1	1.97	1.44
1.10 I 4 S	215.2	1.65	0.71
1.11 I 1 S	792.6	2.11	1.62
2.2 I 5 S	356.0	2.18	3.19
2.6 I 1 S	985.6	2.07	2.22
2.9 I 2 S	124.9	2.11	2.02
2.11 I 1 S	8.8	1.29	0.37
2.12 I 1 S	173.9	1.99	1.54
2.12 I 3 S	100.1	1.91	1.55
3.1 I 1 S	4587.9	2.03	2.07
3.2 I 1 S	297.8	1.73	0.70
3.7 I 1 S	894.7	1.85	1.02
3.7 I 3 S	270.4	1.71	0.92
3.8 I 1 S	1512.2	1.84	1.10
3.8 I 2 S	659.1	1.94	1.48
3.9 I 3 S	526.3	1.25	0.45
4.2 I 5 S	1044.0	1.72	0.82
4.3 I 1 S	1051.2	1.77	0.88
5.1 I 2 S	795.4	1.90	1.12
5.1 I 3 S	557.9	1.95	1.86
5.1 I 4 S	1056.8	1.98	1.37
5.2 I 1 S	1234.7	2.11	2.17
5.2 I 2 S	121.4	1.65	1.38
5.2 I 4 S	123.1	1.41	0.99
5.3 I 2 S	872.4	1.94	1.65
5.3 I 3 S	1070.4	1.94	1.60
5.3 I 5 S	606.9	1.96	1.39
5.4 I 1 S	987.0	1.89	1.20
5.4 I 2 S	2616.4	1.95	1.46
5.4 I 3 S	393.3	1.22	1.83
5.4 I 4 S	854.8	1.85	1.14
5.5 I 1 S	932.9	1.82	0.94
6.1 I 1 S	867	1.99	1.39
6.1 I 2 S	1947.7	1.96	1.38
6.1 I 3 S	794.3	1.98	1.34
6.1 I 4 S	1560.4	1.96	1.26
6.1 I 5 S	1192.0	2.0	1.46
6.2 I 1 S	325.3	4.30	0.49
6.2 I 2 S	915.3	1.96	1.27
6.3 I 1 S	23.0	1.99	2.01
6.3 I 2 S	1852.8	2.10	1.91

6.3 I 3 S	1263.1	2.4	1.56
6.4 I 1 S	1026.4	2.3	1.50
6.4 I 2 S	1308.2	2.7	1.61
6.4 I 3 S	627.2	2.02	1.69
6.4 I 4 S	1770.0	2.01	1.43
6.4 I 5 S	712.0	1.97	1.43
6.5 I 1 S	912.8	1.98	1.36
6.5 I 2 S	713.4	1.77	1.25
6.5 I 4 S	539.1	2.02	1.55
6.5 I 5 S	504.4	1.96	1.41
6.6 I 1 S	209.1	1.78	0.99
6.6 I 2 S	1024.9	1.99	1.48
6.6 I 5 S	312.0	2.06	1.90
7.6 I 5 S	1039.5	1.98	1.66
7.7 I 1 S	1047.0	1.98	1.66
7.9 I 3 S	1338.3	1.96	1.38
7.10 I 1 S	829.0	1.99	1.52
8.10 I 4 S	857.9	1.97	1.61
8.2 I 1 S	575.4	1.95	1.22
8.2 I 2 S	439.4	1.94	1.26
8.2 I 3 S	1492.7	2.00	1.37
8.3 I 2 S	190.7	1.72	0.72
8.3 I 3 S	477.10	1.97	1.33
8.4 I 1 S	782.2	2.03	1.52
8.4 I 2 S	136.5	1.99	1.51
8.4 I 3 S	413.1	1.59	0.63
8.4 I 4 S	675.1	1.71	0.79
8.5 I 2 S	947.8	1.53	0.54
8.5 I 5 S	1759.3	1.73	0.77
8.6 I 2 S	481.6	1.76	0.84
8.6 I 5 S	982.5	1.85	1.04
8.7 I 1 S	772.3	1.96	1.65
8.7 I 2 S	1563.3	1.90	1.38
8.7 I 3 S	1255.3	2.08	1.71
8.7 I 4 S	1148.9	2.10	2.03
8.8 I 5 S	679.6	1.60	0.67
8.9 I 3 S	815.5	2.12	1.91
8.9 I 4 S	778.9	1.99	1.51
8.10 I 1 S	1006.3	1.90	1.13
9.1 I 1 S	543.6	1.97	1.54
9.1 I 2 S	552.5	2.11	1.83
9.1 I 3 S	261.0	1.85	1.22
9.1 I 4 S	327.9	2.00	1.62
9.1 I 5 S	829.1	2.04	1.66

9.10 I 1 S	782.6	2.04	1.77
9.10 I 4 S	728.3	1.95	1.36
9.2 I 1 S	1007.2	2.02	1.66
9.2 I 2 S	615.0	2.05	1.64
9.2 I 3 S	1004.6	2.06	1.64
9.2 I 4 S	910.8	1.97	1.36
9.2 I 5 S	762.5	1.99	1.43
9.3 I 1 S	549.3	1.85	1.36
9.4 I 2 S	678.6	1.95	1.27
9.4 I 3 S	957.1	2.04	1.59
9.4 I 4 S	731.4	2.04	1.64
9.5 I 1 S	596.4	2.03	1.58
9.5 I 2 S	607.3	2.09	1.75
9.6 I 1 S	841.4	1.74	0.79
9.6 I 2 S	286.8	2.07	1.84
9.6 I 3 S	1128.3	2.06	1.74
9.7 I 1 S	762.6	2.01	1.61
9.7 I 2 S	668.7	2.11	1.93
9.7 I 3 S	848.1	2.08	1.81
9.7 I 4 S	623.9	2.12	1.95
9.7 I 5 S	956.1	2.04	1.76
9.9 I 1 S	1317.6	2.10	1.84
9.9 I 2 S	1153.5	2.08	1.82
9.9 I 3 S	1017.9	2.06	1.64
9.10 I 3 S	877.7	2.05	1.66
9.9 I 4 S	960.4	2.04	1.52
9.9 I 5 S	695.8	2.05	1.63
10.1 I 2 S	884.4	1.94	1.30
10.1 I 1 S	603.1	1.92	1.20
10.2 I 3 S	605.3	2.06	1.65
10.2 I 6 S	776.6	2.04	1.50
10.3 I 1 S	650.7	2.00	1.58
10.3 I 3 S	556.0	1.98	1.40
10.3 I 4 S	874.5	1.91	1.16
10.3 I 5 S	817.9	2.02	1.59
10.3 I 6 S	779.4	2.06	1.65
10.4 I 1 S	833.6	1.96	1.28
10.4 I 2 S	748.6	2.12	1.98
10.6 I 2 S	938.5	1.93	1.16
10.7 I 1 S	923.3	1.99	1.46
10.7 I 2 S	704.3	2.00	1.21
10.7 I 4 S	771.4	1.92	1.25
10.8 I 2 S	445.8	2.03	1.53
10.8 I 4 S	766.8	2.04	1.65

10.9 I 1 S	556.8	1.94	2.02
10.9 I 2 S	997.0	1.99	1.40
10.9 I 3 S	771.5	2.00	1.44
10.10 I 1 S	404.6	1.96	1.33
10.10 I 4 S	868.2	2.07	1.83
10.12 I 1 S	181.8	1.69	0.81
10.12 I 2 S	241.4	1.78	1.08
11.5 I 1 S	944.8	2.06	1.51
11.5 I 2 S	485.2	2.00	1.39
11.8 I 1 S	881.9	2.03	1.72
11.8 I 2 S	1143.0	1.95	1.28
11.9 I 2 S	1310.0	2.00	1.43
11.10 I 1 S	1034.3	1.93	1.20
11.10 I 4 S	1075.6	2.02	1.55
11.10 I 5 S	590.0	1.95	1.29
12.1 I 1 S	1091.8	2.09	1.73
12.2 I 1 S	584.5	2.04	1.64
12.3 I 1 S	987.3	2.02	1.66
12.3 I 2 S	1048.5	2.03	1.80
12.3 I 3 S	569.0	2.04	1.57
12.3 I 5 S	841.4	1.94	1.34
12.5 I 3 s	1142.2	2.02	1.53
12.5 I 5 S	1201.1	2.06	1.60
12.6 I 1 S	904.2	1.97	1.33
12.6 I 2 S	852.6	2.07	1.60
12.6 I 4 S	725.3	2.02	1.53
12.7 I 1 S	955.5	2.06	1.64
12.7 I 4 S	968.9	2.04	1.55
12.7 I 5 S	567.3	1.97	1.46
12.8 I 1 S	723.0	2.02	1.55
12.8 I 2 S	983.3	2.09	1.69
12.8 I 4 S	803.5	2.04	1.63
12.9 I 1 S	485.4	1.87	1.13
12.9 I 2 S	368.8	1.70	0.89
12.10 I 1 S	919.6	2.07	1.80
12.10 I 3 S	941.1	2.07	1.68
12.10 I 5 S	997.7	2.02	1.59
12.11 I 1 S	895.5	2.04	1.70
12.11 I 2 S	857.0	2.05	1.70
12.11 I 3 S	655.8	2.04	1.56
12.11 I 5 S	120.2	2.08	2.18
12.11 I 6 S	778.2	1.98	1.49

Fonte: Autora (2025).

Legenda: Análise quantitativa do DNA extraído de 184 isolados de *E. coli*. Explícitos o código único com a identificação e a concentração do DNA quantificada para cada isolado, e as razões de absorvância A260/A280, referentes à pureza proteica, e A260/A230, à pureza de outros contaminantes. Os isolados estão padronizados de acordo com o seguinte código de identificação (Número do Rio), (Número do Ponto de Coleta do Rio), (Letra “I”, indicando Isolado), (Número Ordenado do Isolado), (Letra “S”, referente à estação seca), a exemplo do código “1.1 I 1 S”, que se refere ao primeiro isolado de *E. coli* obtido no ponto 1 de coleta do Rio 1. Observação: os isolados dos pontos 11 e 12, coletados em torneiras da queijaria, foram incluídos na análise final.

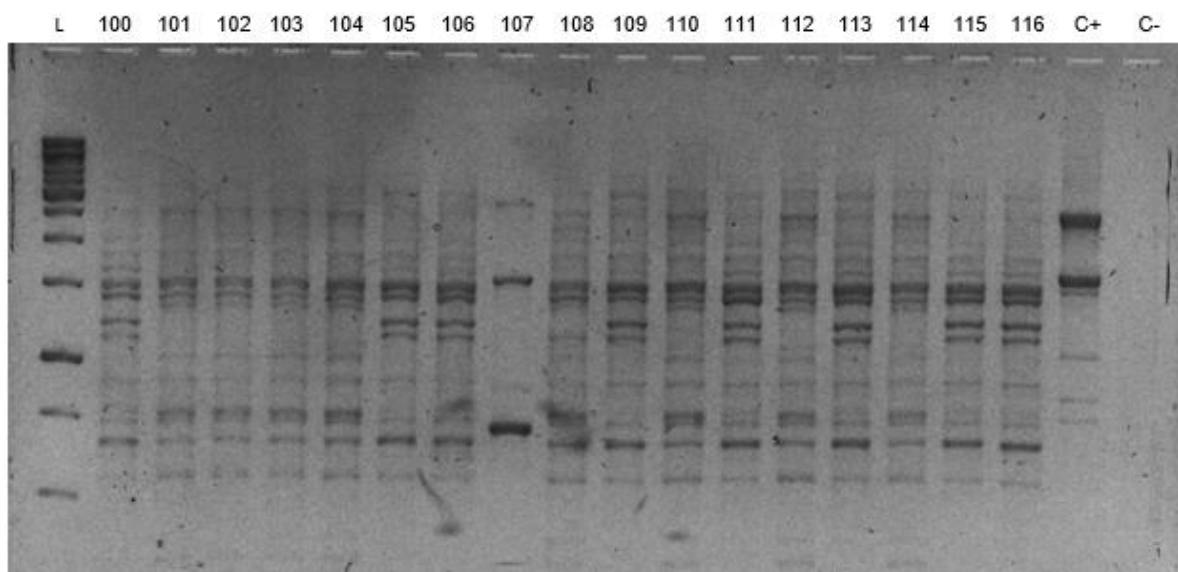
A tabela acima revela que o rendimento do DNA extraído dos isolados de *E. coli* apresentou uma variação significativa nas concentrações atingidas. Quase a totalidade de isolados exibiu concentrações satisfatórias para as fases posteriores de avaliação molecular; assim, notou-se que, em resumo, as relações de pureza do DNA pela razão A260/A280 e A260/A230 evidenciaram bom padrão de qualidade e pureza das amostras. Entretanto, algumas amostras apresentaram alguns valores discrepantes, podendo indicar a existência de impurezas durante o processo de extração. Todavia, de maneira geral, foi observado que, apesar de algumas variações, o protocolo de extração empregado resultou em quantificações satisfatórias, sendo eficiente para a extração do material genético dos isolados em um projeto de caracterização molecular de *E. coli* obtidas de ambiente.

Em um laboratório de microbiologia molecular, abordagens eficientes e produtivas de extração de ácidos nucleicos são de extrema relevância; logo, a avaliação do rendimento e da pureza do DNA é essencial para reações de PCR bem executadas, visto que contaminantes podem intervir diretamente na amplificação (BOESENBERG-SMITH *et al.*, 2011).

As razões de absorvância A260/A280 e A260/A230 fornecem informações importantes sobre a qualidade do DNA extraído. A razão A260/A280 indica contaminação por proteínas ou fenóis, e valores em torno de 1,8 são esperados para DNA puro; já a razão A260/A230 avalia a presença de compostos orgânicos e resíduos de reagentes de extração, sendo desejáveis valores de aproximadamente 2,0 (LUCENA-AGUILAR *et al.*, 2016). Valores abaixo desses intervalos sugerem contaminação e podem comprometer a reação de PCR, levando à inibição da Taq DNA polimerase, formação de bandas fracas ou ausência de amplificação, conforme destacado por Alaeddini (2012) em sua pesquisa, que identificou diversos inibidores presentes em amostras. Portanto, tanto o rendimento quanto a pureza do DNA devem ser meticulosamente examinados anteriormente à PCR.

A Figura 14 apresenta um resultado de *fingerprinting rep-PCR* realizado com o *primer* (GTG)₅ no qual são evidenciados isolados de uma mesma linhagem e isolados de linhagens diferentes, distintos de acordo com o perfil de bandas obtido após a separação por migração dos *amplicons*, em eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo.

Figura 14 - Perfis de *fingerprinting rep-PCR* (GTG)₅ de isolados de *E. coli* alcançados através da resolução dos *amplicons* em eletroforese em gel de agarose 2%.



Fonte: Autora (2025).

Legenda: Perfis de *fingerprinting rep-PCR* (GTG)₅ de isolados de *E. coli* alcançados por meio da resolução de *amplicons* gerados por PCR em eletroforese em gel de agarose 2% (LGC Biotecnologia) corado com brometo de etídeo e documentado em transluminador (NOVA EC-020). Os padrões de amplificação representam fragmentos de DNA de distintos tamanhos, gerando os perfis genéticos. No gel de agarose, cada canaleta revela um perfil de bandas característico, conforme o padrão de amplificação obtido por PCR com *primer* repetitivo (GTG)₅. Na canaleta indicada pela letra “L”, foi aplicado o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (SinapseInc). Na canaleta 107, é possível visualizar um isolado único de diferente cepa, que não demonstra similaridade com outros isolados desse mesmo rio nem com os demais perfis observados no gel. Ao contrário, nas canaletas 100, 105, 106, 109, 111, 113, 115 e 116, os isolados foram considerados pertencentes à mesma cepa ou linhagem. O mesmo ocorre com os isolados das canaletas 101, 102, 103, 104, 108, 110, 112 e 114, que também apresentam perfis compatíveis entre si.

Para cada rio, todos os seus isolados foram submetidos à análise do perfil de *fingerprinting* (GTG)₅, com a finalidade de identificar isolados de *E. coli* que integravam uma mesma linhagem bacteriana, portanto, clones entre si. Mediante esta avaliação molecular, foram descartados 64 (34.78%) isolados que representavam um clone de outro isolado obtido dentro de um mesmo rio, conservando somente um isolado da mesma cepa ou linhagem, de cada perfil por rio amostrado, para análises seguintes.

São considerados perfis geneticamente idênticos ou similares aqueles que apresentam o mesmo padrão de bandas de acordo com a intensidade, o tamanho e posição no gel, o que sugere genoma muito semelhante. Em contraste, perfis genéticos diferentes possuem distinção na disposição das bandas, como a ausência ou a presença de fragmentos, com tamanhos e intensidades diferentes, propondo que os isolados possuem sequências de DNA distintas.

Na Tabela 6, está representada a codificação correspondente aos perfis considerados distintos, de acordo com a comparação dos padrões de bandas obtidos por GTG₅-PCR para cada um dos isolados extraídos, ao serem comparados com os demais, oriundos do mesmo rio. Os perfis genéticos identificados com padrões de bandas únicos estão categorizados com o símbolo #, sinalizando que são representantes de linhagens geneticamente distintas. Por outro lado, aqueles categorizados como “igual a” correspondem a isolados que apresentaram o mesmo padrão de bandas de um perfil previamente identificado. Ainda assim, um isolado de cada grupo com padrão repetido ou igual permaneceu como perfil distinto, com o intuito de assegurar a representação de todas as linhagens genéticas observadas na análise.

Tabela 6 - Identificação de clones distintos com seus correspondentes códigos genéticos.

Amostras (Códigos)	Classificação do Perfil Genético (GTG₅)	Código Perfil Genético distinto (GTG₅)
1.1 I 1 S	Perfil Distinto	R1C1s
1.4 I 1 S	Perfil Distinto	R1C2s
1.4 I 3 S	Igual a 1.4 I 1 S	
1.4 I 4 S	Perfil Distinto	R1C3s
1.5 I 3 S	Perfil Distinto	R1C4s
1.5 I 4 S	Perfil Distinto	R1C5s
1.5 I 5 S	Perfil Distinto	R1C6s
1.5 I 6 S	Perfil Distinto	R1C7s
1.7 I 1 S	Perfil Distinto	R1C8s
1.8 I 2 S	Igual a 1.7 I 1 S	
1.8 I 3 S	Igual a 1.7 I 1 S	

1.8 I 5 S	Perfil Distinto	R1C9s
1.10 I 2 S	Perfil Distinto	R1C10s
1.10 I 3 S	Perfil Distinto	R1C11s
1.10 I 4 S	Igual a 1.10 I 3 S	
1.11 I 1 S	Igual a 1.10 I 3 S	
2.2 I 5 S	Perfil Distinto	R2C1s
2.6 I 1 S	Perfil Distinto	R2C2s
2.9 I 2 S	Perfil Distinto	R2C3s
2.11 I 1 S	Perfil Distinto	R2C4s
2.12 I 1 S	Perfil Distinto	R2C5s
2.12 I 3 S	Perfil Distinto	R2C6s
3.1 I 1 S	Perfil Distinto	R3C1s
3.2 I 1 S	Perfil Distinto	R3C2s
3.7 I 1 S	Perfil Distinto	R3C3s
3.7 I 3 S	Perfil Distinto	R3C4s
3.8 I 1 S	Perfil Distinto	R3C5s
3.8 I 2 S	Igual a 3.8 I 1 S	
3.9 I 3 S	Perfil Distinto	R3C6s
4.2 I 5 S	Perfil Distinto	R4C1s
4.3 I 1 S	Igual a 4.2 I 5 S	
5.1 I 2 S	Perfil Distinto	R5C1s
5.1 I 3 S	Perfil Distinto	R5C2s
5.1 I 4 S	Perfil Distinto	R5C3s
5.2 I 1 S	Perfil Distinto	R5C4s
5.2 I 2 S	Igual a 5.1 I 3 S	
5.2 I 4 S	Igual a 5.1 I 3 S	
5.3 I 2 S	Perfil Distinto	R5C5s
5.3 I 3 S	Igual a 5.3 I 2 S	
5.3 I 5 S	Igual a 5.3 I 2 S	
5.4 I 1 S	Perfil Distinto	R5C6s
5.4 I 2 S	Perfil Distinto	R5C7s
5.4 I 3 S	Perfil Distinto	R5C8s
5.4 I 4 S	Igual a 5.4 I 2 S	
5.5 I 1 S	Perfil Distinto	R5C9s
6.1 I 1 S	Perfil Distinto	R6C1s
6.1 I 2 S	Perfil Distinto	R6C2s
6.1 I 3 S	Igual a 6. 1 I 2 S	
6.1 I 4 S	Igual a 6. 1 I 2 S	
6.1 I 5 S	Igual a 6. 1 I 2 S	
6.2 I 1 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.2 I 2 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.3 I 1 S	Perfil Distinto	R6C3s
6.3 I 2 S	Igual a 6. 1 I 2 S	
6.3 I 3 S	Igual a 6. 1 I 1 S	

6.4 I 1 S	Igual a 6. 1 I 2 S	
6.4 I 2 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.4 I 3 S	Igual a 6. 1 I 2 S	
6.4 I 4 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.4 I 5 S	Igual a 6.1 I 2 S	
6.5 I 1 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.5 I 2 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.5 I 4 S	Igual a 6. 1 I 1 S	
6.5 I 5 S	Perfil Distinto	R6C4s
6.6 I 1 S	Igual a 6.1 I 2 S	
6.6 I 2 S	Igual a 6.1 I 2 S	
6.6 I 5 S	Igual a 6.1 I 2 S	
7.6 I 5 S	Perfil Distinto	R7C1s
7.7 I 1 S	Igual a 7.6 I 5 S	
7.9 I 3 S	Perfil Distinto	R7C2s
7.10 I 1 S	Perfil Distinto	R7C3s
8.10 I 4 S	Igual a 8.7 I 1 S	
8.2 I 1 S	Perfil Distinto	R8C1s
8.2 I 2 S	Perfil Distinto	R8C2s
8.2 I 3 S	Perfil Distinto	R8C3s
8.3 I 2 S	Perfil Distinto	R8C4s
8.3 I 3 S	Perfil Distinto	R8C5s
8.4 I 1 S	Perfil Distinto	R8C6s
8.4 I 2 S	Perfil Distinto	R8C7s
8.4 I 3 S	Perfil Distinto	R8C8s
8.4 I 4 S	Igual a 8.3 I 2 S	
8.5 I 2 S	Perfil Distinto	R8C9s
8.5 I 5 S	Perfil Distinto	R8C10s
8.6 I 2 S	Perfil Distinto	R8C11s
8.6 I 5 S	Perfil Distinto	R8C12s
8.7 I 1 S	Perfil Distinto	R8C13s
8.7 I 2 S	Perfil Distinto	R8C14s
8.7 I 3 S	Perfil Distinto	R8C15s
8.7 I 4 S	Perfil Distinto	R8C16s
8.8 I 5 S	Igual a 8.7 I 4 S	
8.9 I 3 S	Perfil Distinto	R8C17s
8.9 I 4 S	Perfil Distinto	R8C18s
8.10 I 1 S	Perfil Distinto	R8C19s
9.1 I 1 S	Perfil Distinto	R9C1s
9.1 I 2 S	Perfil Distinto	R9C2s
9.1 I 3 S	Perfil Distinto	R9C3s
9.1 I 4 S	Perfil Distinto	R9C4s
9.1 I 5 S	Perfil Distinto	R9C5s
9.10 I 1 S	Igual a 9.7 I 5 S	

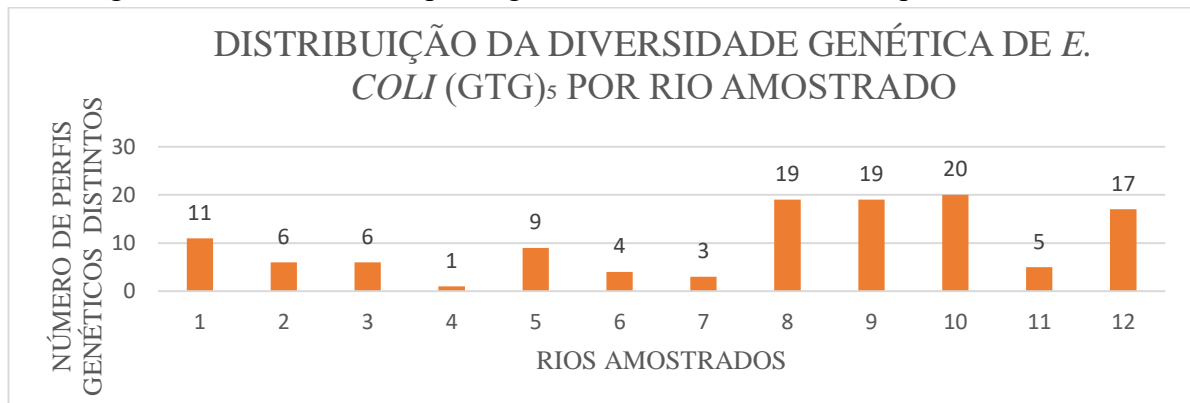
9.10 I 4 S	Igual a 9.10 I 3 S	
9.2 I 1 S	Perfil Distinto	R9C6s
9.2 I 2 S	Perfil Distinto	R9C7s
9.2 I 3 S	Igual a 9.2 I 2 S	
9.2 I 4 S	Igual a 9.2 I 2 S	
9.2 I 5 S	Igual a 9.2 I 2 S	
9.3 I 1 S	Perfil Distinto	R9C8s
9.4 I 2 S	Igual a 9.2 I 2 S	
9.4 I 3 S	Igual a 9.2 I 2 S	
9.4 I 4 S	Igual a 9.2 I 2 S	
9.5 I 1 S	Perfil Distinto	R9C9s
9.5 I 2 S	Igual a 9.5 I 1 S	
9.6 I 1 S	Perfil Distinto	R9C10s
9.6 I 2 S	Perfil Distinto	R9C11s
9.6 I 3 S	Perfil Distinto	R9C12s
9.7 I 1 S	Perfil Distinto	R9C13s
9.7 I 2 S	Perfil Distinto	R9C14s
9.7 I 3 S	Igual a 9.7 I 2 S	
9.7 I 4 S	Igual a 9.7 I 2 S	
9.7 I 5 S	Perfil Distinto	R9C15s
9.9 I 1 S	Perfil Distinto	R9C16s
9.9 I 2 S	Perfil Distinto	R9C17s
9.9 I 3 S	Perfil Distinto	R9C18s
9.10 I 3 S	Perfil Distinto	R9C19s
9.9 I 4 S	Igual a 9.9 I 3 S	
9.9 I 5 S	Igual a 9.9 I 3 S	
10.1 I 2 S	Igual a 10.1 I 1 S	
10.1 I 1 S	Perfil Distinto	R10C1s
10.2 I 3 S	Perfil Distinto	R10C2s
10.2 I 6 S	Perfil Distinto	R10C3s
10.3 I 1 S	Perfil Distinto	R10C4s
10.3 I 3 S	Perfil Distinto	R10C5s
10.3 I 4 S	Perfil Distinto	R10C6s
10.3 I 5 S	Perfil Distinto	R10C7s
10.3 I 6 S	Perfil Distinto	R10C8s
10.4 I 1 S	Perfil Distinto	R10C9s
10.4 I 2 S	Igual a 10.3 I 6 S	
10.6 I 2 S	Perfil Distinto	R10C10s
10.7 I 1 S	Perfil Distinto	R10C11s
10.7 I 2 S	Perfil Distinto	R10C12s
10.7 I 4 S	Igual a 10.7 I 2 S	
10.8 I 2 S	Perfil Distinto	R10C13s
10.8 I 4 S	Perfil Distinto	R10C14s
10.9 I 1 S	Perfil Distinto	R10C15s

10.9 I 2 S	Perfil Distinto	R10C16s
10.9 I 3 S	Perfil Distinto	R10C17s
10.10 I 1 S	Perfil Distinto	R10C18s
10.10 I 4 S	Perfil Distinto	R10C19s
10.12 I 1 S	Perfil Distinto	R10C20s
10.12 I 2 S	Igual a 10.12 I 1 S	
11.5 I 1 S	Perfil Distinto	R11C1s
11.5 I 2 S	Perfil Distinto	R11C2s
11.8 I 1 S	Perfil Distinto	R11C3s
11.8 I 2 S	Igual a 11.8 I 1 S	
11.9 I 2 S	Igual a 11.8 I 1 S	
11.10 I 1 S	Perfil Distinto	R11C4s
11.10 I 4 S	Igual a 11.10 I 1 S	
11.10 I 5 S	Perfil Distinto	R11C5s
12.1 I 1 S	Perfil Distinto	R12C1s
12.2 I 1 S	Perfil Distinto	R12C2s
12.3 I 1 S	Perfil Distinto	R12C3s
12.3 I 2 S	Perfil Distinto	R12C4s
12.3 I 3 S	Perfil Distinto	R12C5s
12.3 I 5 S	Perfil Distinto	R12C6s
12.5 I 3 s	Igual a 12.3 I 5 S	
12.5 I 5 S	Igual a 12.3 I 2 S	
12.6 I 1 S	Perfil Distinto	R12C7s
12.6 I 2 S	Igual a 12.6 I 1 S	
12.6 I 4 S	Perfil Distinto	R12C8s
12.7 I 1 S	Igual a 12.6 I 4 S	
12.7 I 4 S	Perfil Distinto	R12C9s
12.7 I 5 S	Igual a 12.8 I 4 S	
12.8 I 1 S	Igual a 12.8 I 4 S	
12.8 I 2 S	Perfil Distinto	R12C10s
12.8 I 4 S	Perfil Distinto	R12C11s
12.9 I 1 S	Igual a 12.8 I 4 S	
12.9 I 2 S	Perfil Distinto	R12C12s
12.10 I 1 S	Igual a 12.8 I 4 S	
12.10 I 3 S	Perfil Distinto	R12C13s
12.10 I 5 S	Igual a 12.10 I 3 S	
12.11 I 1 S	Perfil Distinto	R12C14s
12.11 I 2 S	Igual a 12.8 I 4 S	
12.11 I 3 S	Perfil Distinto	R12C15s
12.11 I 5 S	Perfil Distinto	R12C16s
12.11 I 6 S	Perfil Distinto	R12C17s

Legenda: Caracterização molecular dos pontos amostrais com base nos perfis gerados pela técnica (GTG)₅-PCR, identificando clones com perfis genéticos idênticos (clones iguais), perfis distintos (clones diferentes) e a identificação de respectivos clones únicos entre as amostras analisadas.

No Gráfico 2 (Figura 15), está apresentada a variação no número de perfis genéticos distintos identificados em cada rio amostrado, considerando a heterogeneidade genômica das amostras investigadas.

Figura 15 - Quantidade de perfis genéticos diferentes de *E. coli* por rio analisado.



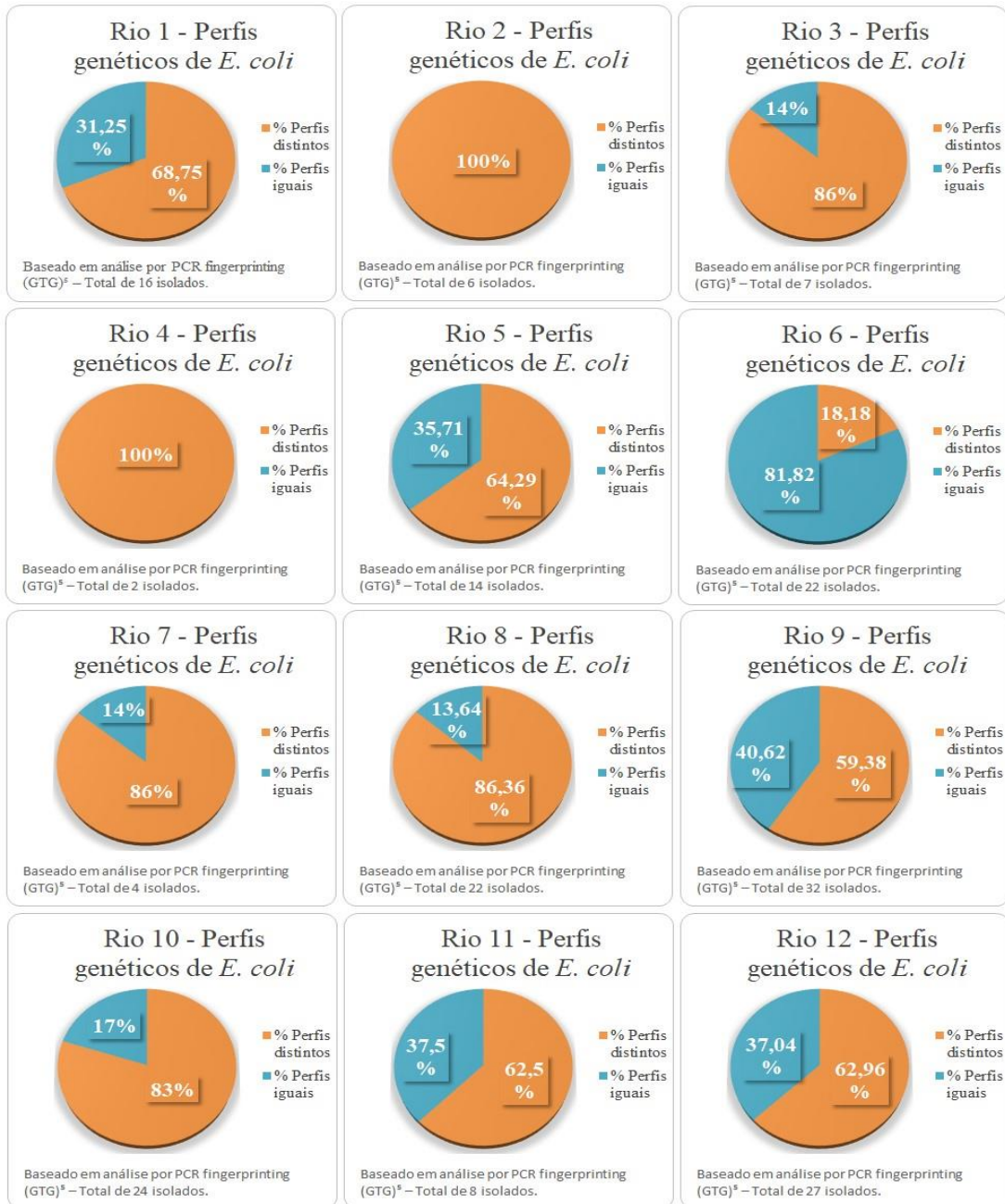
Fonte: Autora (2025).

Legenda: Variação do número de perfis genéticos distintos de *E. coli*, alcançados por PCR *fingerprinting*, com o *primer* (GTG)₅, nos diferentes rios estudados. Cada um dos perfis genéticos foi analisado distintamente, com base nas diferenças nos padrões de bandas obtidos por eletroforese em gel, ponderando a variabilidade genômica entre os isolados.

Os resultados apontam que a diversidade genética de *E. coli* variou consideravelmente entre os rios amostrados (Figura 16), refletindo possíveis diferenças nas fontes de contaminação, nos agroecossistemas e nas características ambientais de cada manancial. Observa-se que os rios 8, 9 e 10 foram os que apresentaram o maior número de perfis genéticos distintos, com 19, 19 e 20 perfis, respectivamente. A elevada diversidade amostrada sugere a presença de múltiplas fontes de contaminação fecal ao longo desses cursos d'água. Conforme discutido anteriormente, os rios 9 e 10 apresentam pontos de captação de água localizados a jusante dos empreendimentos rurais, o que pode favorecer ainda mais o escoamento superficial de resíduos fecais provenientes das atividades produtivas para o interior dos cursos d'água. Além disso, com 17 perfis diferentes, destaca-se o rio 12, que também apresentou uma diversidade significativa.

Essa alta diversidade encontrada também no rio 12 pode estar relacionada com o aspecto que o rio possui de atravessar a área urbana do município, o que pode aumentar a exposição a distintas fontes de efluentes. Uma possível explicação para esse resultado é a razão de que seu percurso atravessa a área urbana do município de São Roque de Minas. Rios que cortam regiões urbanizadas estão mais suscetíveis ao recebimento de efluentes gerados por atividades humanas, como o escoamento de águas pluviais contaminadas e o lançamento de esgoto doméstico. Tal como demonstrado por Glińska-Lewczuk et al. (2016), a presença de áreas urbanas ao longo dos rios pode ocasionar variações na qualidade da água, aumentando a entrada de poluentes e comprometendo o equilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos. Essas condições podem possibilitar o aumento da carga microbológica ao longo do curso do rio, refletindo-se nos resultados alcançados nas análises.

Figura 16 - Percentual de isolados de *E. coli* com perfis genéticos distintos e semelhantes em cada rio analisado.



Fonte: Autora (2025).

Legenda: Gráficos de percentual da diversidade genética de isolados de *Escherichia coli* oriundos de doze rios caracterizados. Cada um dos gráficos mostra de forma individual um rio, clarificando a proporção de isolados com perfis genéticos iguais e isolados geneticamente diferentes, de acordo com a avaliação realizada de PCR-*fingerprinting* utilizando o *primer* GTG₅. Isolados classificados como "Iguais" demonstraram padrões semelhantes de bandas, e isolados "diferentes" possuem padrões distintos, conforme os perfis genéticos.

Em contrapartida, o rio 7 apresenta características opostas às observadas nos rios 9 e 10. Neste caso, a captação da água ocorre em um ponto situado em uma altitude superior à área de produção da fazenda, o que reduz o risco de contaminação por escoamento superficial de resíduos fecais. Essa condição pode explicar o baixo número de isolados de *Escherichia coli* confirmados neste rio e, conseqüentemente, a menor diversidade de perfis genéticos identificados. Estudo realizado em rio montanhoso demonstra que as concentrações médias de *E. coli* e outros indicadores fecais podem ser significativamente mais baixas na parte superior, que é mais elevada, com menor impacto humano e aumenta progressivamente à medida que o rio atravessa áreas habitadas e lida com estações de tratamento de esgoto (LENART-BOROÑ *et al.*, 2022). Esse padrão fortalece a importância da posição altimétrica no risco de contaminação microbiológica dos mananciais, além de demonstrar que o número de contaminantes bacterianos varia ao longo do curso de um rio, dependendo da pressão antrópica, atividade humana, em cada local. Portanto, seus resultados corroboram a explicação do menor número de isolados de *Escherichia coli* encontrados no rio 7, cuja captação de água é verificada a montante das áreas de produção, em maior altitude.

Como pode ser observado na Tabela 5, foram identificados padrões distintos de diversidade após a análise de predominância dos clones e de isolados geneticamente diferentes dentro do total de *E. coli* isolados em cada um dos rios estudados.

Tabela 7 - Dominância clonal e interpretação de diversidade de isolados pertencentes aos 12 rios avaliados.

Rio	Perfil dominante	N.º de isolados com esse perfil	Total de isolados	% no total do rio	Interpretação
Rio 1	R1C8s / R1C11s	3 (cada)	16	18,75%	Alta diversidade
Rio 2	Não há um perfil dominante	-	6	16,67%	Alta diversidade
Rio 3	R3C5s	2	7	28,57%	Alta diversidade
Rio 4	R4C1s	2	2	100%	Baixa diversidade
Rio 5	R5C2s e R5C5s	3 (cada)	14	21,43%	Alta diversidade
Rio 6	R6C2s	11	22	50%	Diversidade moderada
Rio 7	R7C1s	2	4	50%	Diversidade moderada
Rio 8	R8C4s / R8C13s/ R8C16s/	2 (cada)	22	9,09%	Alta Diversidade

Rio 9	R9C7s	7	32	21.88%	Alta Diversidade
Rio 10	R10C1s/ R10C8s/ R10C12s/ R10C20s	2 (cada)	24	8% cada	Alta Diversidade
Rio 11	R11C3s	3	8	37.5%	Alta Diversidade
Rio 12	R12C11s	6	27	22.22%	Alta Diversidade

Fonte: Autora (2025).

Legenda: Cenário da diversidade clonal de isolados bacterianos (*E. coli*) identificados nos 12 rios estudados, com base nos perfis dominantes de cada rio, apontando para o índice de diversidade entre as categorias “baixa diversidade”, “diversidade moderada” e “alta diversidade”.

Concluiu-se que o rio 10 apresentou a menor taxa de porcentagem de ocorrência para cada um de seus perfis dominantes (8% para R10C1s, R10C8s, R10C12s e R10C20s), o que denota elevada diversidade clonal com fonte de contaminação diversificada, sem um perfil principal visível. De outro modo, o rio 4 mostrou a menor diversidade, apontando, através do clone R4C1s, com 100% dos dois isolados, que existe somente uma via particular de contaminação, apesar de a pequena parcela de isolados para o rio 4 ter interferido nesse resultado. Os rios 6 e 7 revelaram 50% do clone dominante em cada um, sendo que os rios demonstraram uma predominância clonal moderada, sinalizando um índice de diversidade que não é descrito como alto, com muitos clones em frequências baixas, nem com uma taxa extremamente baixa.

Esta pesquisa proporcionou observar que a diversidade genética de *Escherichia coli* isolada nos diferentes rios está diretamente ligada às características dos agrossistemas ao tipo de uso do solo, à presença de atividades agropecuárias e à posição geográfica de cada curso d'água em relação às propriedades rurais e seus empreendimentos. Os resultados indicam que a localização dos rios em relação às áreas de produção, principalmente considerando a altitude, é um fator determinante para a ocorrência de contaminação fecal. Rios com captação de água situados a jusante das propriedades, em altitudes mais baixas, apresentaram maior número de perfis genéticos, o que pode ser justificado pela maior exposição ao escoamento superficial de resíduos provenientes do manejo das atividades. Por outro lado, rios localizados a montante e em áreas menos impactadas pela presença de bovinos e pela ação antrópica mostraram menor número de isolados confirmados e, conseqüentemente, menor diversidade genética entre eles.

Esses padrões consolidam os efeitos das características do uso da terra e da posição topográfica sobre a qualidade microbiológica da água.

A literatura aponta que aspectos como o tamanho da bacia, a declividade e a permeabilidade do solo influenciam concentrações de *E. coli* e Enterococos e funcionam como um fator-chave na determinação de como cada tipo de uso do solo afeta a qualidade da água dos rios. Assim, os autores deixam destacado que o solo pode adaptar a dinâmica do escoamento superficial, favorecendo ou restringindo o transporte de contaminantes, interferindo na intensidade e no volume do escoamento superficial (KANG *et al.*, 2010). Essa relação reforça a ideia de que a posição geográfica dos pontos de captação de água, principalmente a altitude e o fato de estarem situados a montante ou a jusante das áreas de produção, exerce controle direto sobre o risco de contaminação fecal nos rios avaliados. Embora a ênfase dada nesta discussão seja acerca da influência da altitude e do posicionamento dos pontos de captação em relação às áreas de produção, a consideração das propriedades do solo se mostra importante como um elemento complementar, capaz de ajudar a entender os padrões observados de poluição fecal nos diferentes rios avaliados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que o perfil microbiológico das cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de água dos mananciais da região produtora do Queijo Minas Artesanal Canastra apresenta variada diversidade genética. A partir dos rios estudados, notou-se uma distinção expressiva no número de isolados e nos perfis genéticos. Portanto, a presença de contaminantes microbiológicos neste estudo não é uniforme entre os rios, e essa variação pode ser explicada pelas distintas ações antrópicas determinadas pela presença de gado, escoamento de fezes e proximidade das atividades humanas, bem como pela localização topográfica dos pontos de captação, isto é, a altitude em relação à área produtiva. A aplicação da técnica de rep-PCR (GTG)_s demonstrou-se eficiente na discriminação entre isolados geneticamente distintos e geneticamente semelhantes (clonais), consolidando seu potencial como recurso de identificação de fontes de contaminação fecal e monitoramento ambiental. A avaliação das linhagens genéticas mostrou diferentes vertentes de contaminação entre os rios; dessa forma, o rio 4 revelou baixa diversidade genética, apontando para uma possível única fonte predominante de entrada de *E. coli*. Por sua vez, o rio 10 apresentou uma elevada diversidade clonal, propondo múltiplas fontes de contaminação.

Os dados gerados por esta pesquisa servirão de base para as fases posteriores do projeto, que propõem identificar os genes de virulência (VGs) encontrados nesses isolados, bem como o perfil de resistência aos antimicrobianos (ARGs). Assim, essas próximas pesquisas poderão apresentar a segurança alimentar do Queijo Canastra, avaliando o verdadeiro potencial de ameaça que essas *E. coli* possuem para consumidores do produto, dado que foram isoladas em mananciais que abastecem o empreendimento nas unidades de produção. Fica evidente, portanto, a necessidade de ações voltadas para a melhoria da qualidade da água utilizada nesta cadeia produtiva, de modo que os produtores do Queijo Canastra compreendam que o manejo e o sistema implementado na gestão de seus estabelecimentos rurais podem ter impacto na qualidade da água disponível em sua propriedade e, conseqüentemente, em sua atividade, que é o queijo acabado. Por fim, este estudo facilita o prosseguimento de informações que possam colaborar para minimizar a contaminação microbiológica, pretendendo preservar a qualidade do produto, a segurança alimentar e a identidade e o reconhecimento do Queijo Minas Artesanal Canastra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGRAR. **Manual de orientação em educação para gestão ambiental**. Rio de Janeiro: Agrar – Consultoria e Estudos Técnicos, 2004. 50 p.

AHMED, Warish; NELLER, Ron; KATOULI, Mohammad. **Evidence of septic system failure determined by a bacterial biochemical fingerprinting method**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 4, p. 910-920, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/98/4/910/6722443>. Acesso em: 07 jun. 2025.

ALAEDDINI, R. **Forensic implications of PCR inhibition – a review**. *Forensic Science International: Genetics*, v. 6, n. 3, p. 297–305, 2012. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.08.006.

ALTIERI, Miguel A. **Agroecologia: bases científicas para una agricultura sustentable**. Montevideo: Nordan Comunidad, 1999. 325 p. Disponível em: <https://agroeco.org/wp-content/uploads/2010/10/Libro-Agroecologia.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2024.

ANDRADE, C. R. **Diagnóstico da qualidade microbiológica de Queijo Serra da Canastra e caracterização de bactérias do gênero Enterococcus**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. 112 p. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/449086>. Acesso em: 07 jun. 2025.

APROCAN – Associação dos Produtores de Queijo Canastra. **Regulamento de uso da Indicação de Procedência Canastra**. 2011. Disponível em: <https://www.sertaobras.org.br/wp-content/uploads/2011/03/CANASTRA-INAES-doc.-5-regulamento-de-uso-alterado-ok.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2025.

ARIAS, Ana Rosa Linde; BUSS, Daniel Forsin; ALBURQUERQUE, Carla de; INÁCIO, Alan Ferreira; FREIRE, Marina Moreira; EGLER, Mariana; MUGNAI, Riccardo; BAPTISTA, Darcilio Fernandes. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61–72, jan./mar. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/s7ghXwVLFHTGztkg3GBt4Lz/>. Acesso em: 08 jun. 2025.

BARBOSA, Cristiano. **Territórios de vida e trabalho dos pequenos produtores de queijo da Serra da Canastra: um estudo sobre a relação entre produção camponesa e espaços naturais protegidos nas nascentes do rio São Francisco, Minas Gerais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Humanas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007. 126 f. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16270>. Acesso em: 15 mai. 2025.

BASTOS, M. do S. R.; BASTOS, M. do S.R.; NASSU, R.T.; BORGES, M. de F.; SILVA, J.B. **Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando a implantação das boas práticas de fabricação**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 57, p. 130-136, 2001. Disponível em: <https://scispace.com/pdf/microrganismos-patogenicos-e-indicadores-em-queijo-de-coalho-3dys04q86q.pdf>. Acesso em: 08 set. 2024.

BEJ, A. K. **Detection of microbial nucleic acids by polymerase chain reaction in aquatic samples**. In: *Molecular Ecology Manual*. 2. ed. 2004. p. 369-432. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20043173171>. Acesso em: 10 dez. 2024.

BEMFEITO, Raquel Martino. **Queijo Minas artesanal da microrregião da Serra da Canastra: caracterização sensorial e eletroquímica**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11021>. Acesso em: 30 ago. 2024.

BERNARDES, Julyanne Marajó. **Escola de mestre queijeiros de queijos artesanais para Serra da Canastra**. 2021. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) – Universidade de Uberaba, Uberaba, 2021. Disponível em: <https://dspace.uniube.br:8443/handle/123456789/1938>. Acesso em: 27 jun. 2024.

BOESENBERG-SMITH, Kelly A.; PESSARAKLI, Mohammad M.; WOLK, Donna M. **Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting**. *Biologicals*, v. 39, n. 4, p. 211–215, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196439911000560>. Acesso em: 08 jun. 2025.

BORGES, Eduardo José; CASTRO, Mariana Torres de; FREITAS, Amanda Rodrigues Franco de; BORGES, Ana Cláudia; SANTOS, Priscila Alonso dos. **Desenvolvimento e caracterização físico-química do queijo Minas artesanal Canastra produzido com *Cynara cardunculus* L.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 73, n. 3, p. 136–148, 2018. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/697/0>. Acesso em: 10 jun. 2025.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; MIERZWA, J. C.; BARROS, M. T.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental: o desafio do desenvolvimento sustentável**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 318 p.

BRASIL. **Lei nº 11.326, de 25 de julho de 2006: Política Nacional da Agricultura Familiar e Empreendimentos Familiares Rurais**. Diário Oficial da União, Brasília-DF, p. 1.

BRASIL. Ministério da Cultura. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Departamento do Patrimônio Imaterial. **Certidão de registro do modo de fazer queijo de minas, na região das Serras da Canastra e do Salitre**. Instituído pelo Decreto nº 3.551 de 04.08.2000. Registro no Livro dos saberes. v. L, folhas 7 e verso, 13 jun. 2008. Disponível em: . Acesso em: 09 abr. 2025.

BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. **Family of Enterobacteriaceae**. In: BRENNER, D. J.; KRIERG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. v. 2, p. 587-607, 2005.

BUCKALEW, D.; TUONO, A.; SIMMONS, A.; LANKFORD, T.; SMITH, D. **Homogeneous distribution of *Escherichia coli* measured within the vertical water column of small, freshwater streams**. *Journal of Water Resource and Protection*, v. 7, n. 5, p. 410-421, 2015. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=55051>. Acesso em: 07 jun. 2025.

BYAMUKAMA, D.; KANSIIME, F.; MACH, R. L.; FARNLEITNER, A. H. **Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala,**

Uganda. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 2, p. 864–868, 2000. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.66.2.864-868.2000>. Acesso em: 17 dez. 2024.

CAMPOS, Gabriela Zampieri. **Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação.** 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-03122019-125240/pt-br.php>. Acesso em: 11 jun. 2025.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; LUIZ, L. M. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, C. I. F.; SILVA, A. M.; NUNES, A. C.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. **Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216303502>. Acesso em: 11 jun. 2025.

CATÃO, Raissa Mayer Ramalho; CEBALLOS, Beatriz Susana Ovruski de. **Listeria spp., coliformes totais e fecais e E. coli no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil).** Food Science and Technology, v. 21, p. 281-287, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/DXgzWK59X94bqVfP3rn8tkG/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

CAVALCANTE, Rosane Barbosa Lopes. **Ocorrência de Escherichia coli em fontes de água e pontos de consumo em uma comunidade rural.** Revista Ambiente & Água, v. 9, p. 550-558, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ambiagua/a/gWBsnTFR7xbXWLn3WnZg6zm/?lang=pt>. Acesso em: 11 jun. 2025.

CORRIVEAU, Julie; VAN BOCHOVE, Eric Luc John; SAVARD, Martine M.; CLUIS, Daniel. **Occurrence of high in-stream nitrite levels in a temperate region agricultural watershed.** Water, Air, and Soil Pollution, v. 206, p. 335-347, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-009-0109-6>. Acesso em: 11 jun. 2025.

COSTANZO, N.; CENITI, C.; SANTORO, A.; CLAUSI, M. T.; CASALINUOVO, F. **Avaliação de patógenos transmitidos por alimentos em queijos de leite cru.** International Journal of Food Science, v. 2020, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/3616713>. Acesso em: 12 jun. 2025.

DA SILVA, Benedito Cláudio; CLARKE, Robin. **Análise estatística de chuvas intensas na bacia do rio São Francisco.** Revista Brasileira de Meteorologia, v. 19, n. 3, p. 265-272, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/284107211_Analise_estatistica_de_chuvas_intensas_na_Bacia_do_Rio_Sao_Francisco. Acesso em: 12 jun. 2025.

DA SILVA, D. F.; GALVÍNCIO, J. D.; DE CARVALHO ALMEIDA, H. R. R. **Variabilidade da qualidade de água na bacia hidrográfica do rio São Francisco e atividades antrópicas relacionadas.** Qualitas Revista Eletrônica, v. 9, n. 3, 2010.

DAS DORES, Milene Therezinha; FERREIRA, Célia Lucia de Lucas Fortes. **Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios.** Revista Brasileira de Agropecuária

Sustentável, Uberlândia, v. 2, n. 3, p. 129-136, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/rbas/article/view/2754/1238>. Acesso em: 28 ago. 2024.

DENARDIN, José Eloir; KOCHHANN, Rainoldo Alberto; FAGANELLO, Antonio; SANTI, Anderson; D'ÁVILA DENARDIN, Norimar; WIETHÖLTER, Sírio. **Diretrizes do sistema plantio direto no contexto da agricultura conservacionista**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 15 p. (Embrapa Trigo. Documentos online, 141). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/969148/1/2012documentosonline141.pdf>. Acesso em: mai. 2024.

DIAMANTE, Leôncio Jânio Silva. **Impacto da produção artesanal de queijos em mananciais da Serra da Canastra**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Campus Bambuí, Bambuí, 2023.

DORES, Milene Therezinha das. **Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente sob refrigeração**. 2007. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2856>. Acesso em: 10 jun. 2025.

DOS SANTOS, Marta Victor; PEDROSA, Paulo. **Análises de coliformes fecais e totais em solos de pasto e Mata Atlântica na região da bacia do rio Imbé–Lagoa de Cima (RJ)**. In: CONFLICT – Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica, 4., 2012, Niterói. Anais... Niterói: Editora Essentia / IFF, 2012. Disponível em: <https://editoraessentia.iff.edu.br/index.php/conflict/article/view/3028/1745>. Acesso em: 12 jun. 2025.

EMATER MG. **Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte: EMATER MG, 2004. 19 p. (Relatório técnico). Disponível em: <https://www.emater.mg.gov.br/download.do?id=73907>. Acesso em: 04 jun. 2024.

EMATER. **Queijo Minas Artesanal: guia técnico para a implantação de boas práticas de fabricação em unidades de produção do queijo minas artesanal**. Belo Horizonte: OCEMG/SESCOOP/UFV/Emater-MG, 2009. 68 p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário do leite 2019**. Brasília: Embrapa, 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE-2019.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2024.

EMBRAPA Agroindústria de Alimentos. **Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria**. Brasília: Embrapa, 2018.

FAEMG – Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais. **Recordistas no cadastro de produtores do Queijo Minas Artesanal**. [s.d.]. Disponível em: <http://www.sistemafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=2907&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>. Acesso em: 02 jun. 2024.

FALAGAS, Matthew E.; GORBACH, Sherwood L. **Practice guidelines: urinary tract infections**. Infectious Diseases in Clinical Practice, v. 4, n. 4, p. 241–257, 1995. Disponível em: https://journals.lww.com/infectdis/fulltext/1995/07000/practice_guidelines__urinary_tract_infections.1.aspx. Acesso em: 12 jun. 2025.

FEIDEN, A.; MIQUELONI, D. P.; FEIDEN, I. R.; CARDOSO, D. R. **Agroecossistemas: conceitos e caracterização**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 18 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 75).

FERREIRA, Fernanda Silva. **Avaliação microbiológica de queijos Minas Artesanais provenientes da microrregião Canastra durante e após o período de maturação**. 2019. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade em Tecnologia Ambiental) – Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Bambuí, Bambuí, 2019. Disponível em: https://sistemas.bambui.ifmg.edu.br/open_conference/index.php/SEP/2018/paper/view/162. Acesso em: 12 jun. 2025.

FIGUEIRÊDO, Maria Cléa Brito de; TEIXEIRA, Adunias S.; ARAÚJO, Lúcia de Fátima Pereira; ROSA, Morsyleide Freitas; PAULINO, Walt Disney; MOTA, Suetônio; ARAÚJO, José Carlos. **Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização**. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 12, n. 4, p. 399-409, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/f79cyd4q9VpyCzTLhgFkfVR/?lang=pt>. Acesso em: 12 jun. 2025.

FINNEY, M.; SMULLEN, J.; FOSTER, H. A.; BROKX, S.; STOREY, D. M. **Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects**. Journal of Microbiological Methods, v. 54, n. 3, p. 353–358, set. 2003. DOI: 10.1016/S0167-7012(03)00068-X. PMID: 12842481.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 196 p.

FURTADO, M. M. **Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 35, p. 33-36, 1980. Disponível em: <https://www.iepha.mg.gov.br/index.php/component/phocadownload/category/18-queijo-artesanal-do-serro?download=33%3Adossie-tecnico-queijo>. Acesso em: 05 jun. 2024.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. **Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species**. FEMS Microbiology Letters, v. 205, n. 1, p. 31-36, 2001.

GILMORE, Michael S.; FERRETTI, Joseph J. **The thin line between gut commensal and pathogen**. Science, v. 299, n. 5615, p. 1999-2002, 2003.

GLIŃSKA-LEWCZUK, K. et al. **The impact of urban areas on the water quality gradient along a lowland river**. Environmental Monitoring and Assessment, v. 188, n. 624, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-016-5638-z>. Acesso em: 16 jun. 2025.

GUERRA, M. G.; GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; GUILHERMINO, M. M.; NOVAES, L. P. **Disponibilidade e qualidade da água na produção de leite**. Acta Veterinaria Brasilica, v. 5, n. 3, p. 230-235, 2011.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo**

de produção. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/4kyXVF6wYQdzpqzFW47wBYk/?lang=pt>. Acesso em: 12 jun. 2025.

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODD, E. C. D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods: coliforms-Escherichia coli and its toxins.** 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1996. p. 325-369.

HOLANDA, Francisco S. Rodrigues. **A gestão dos recursos hídricos e a sustentabilidade de agroecossistemas.** Informe UFS, São Cristóvão, ano IX, n. 312, 09 jan. 2003.

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 1810, de 24 de abril de 2018: alteração do artigo 1º da Portaria nº 694 para incluir o município de Córrego D’anta na microrregião da Canastra.** 2018.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JOHNSON, James R.; STELL, Adam L. **Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/181/1/261/906198>. Acesso em: 13 jun. 2025.

JONES, Sara E.; VERSALOVIC, James. **Probiotic Lactobacillus reuteribiofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors.** *BMC Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2009.

JUNG, B.; HOILAT, G. J. **MacConkey Medium.** In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Atualizado em 10 set. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491326>. Acesso em: 8 jun. 2025.

KAMIMURA, Bruna A.; RICCIARDI, Anna; ZANELLA, Mariane; PIRES, Amanda; SOUZA, Mariana; et al. **Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms.** *Food Microbiology*, v. 89, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002020300423>. Acesso em: 29 jun. 2024.

KANG, Joon-Hee; KIM, Seong-Tae; LEE, Jong-Hwan; PARK, Soon-Jin. **Linking land-use type and stream water quality using spatial data of fecal indicator bacteria and heavy metals in the Yeongsan river basin.** *Water Research*, v. 44, n. 14, p. 4143-4157, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.009>. Acesso em: 24 jun. 2025.

KATHLEEN, M. M.; LAY, C. H.; CHUNG, W. H.; CHEN, C. C.; CHANG, J. S. **(GTG) 5-PCR analysis and 16S rRNA sequencing of bacteria from Sarawak aquaculture environment.** *International Food Research Journal*, v. 21, n. 3, 2014.

KEMPER, Nicole. **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.** *Ecological Indicators*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470160X07000647>. Acesso em: 02 jun. 2025.

KUHNERT, Peter; BOERLIN, Patrick; FREY, Joachim. **Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment.** *FEMS*

Microbiology Reviews, v. 24, n. 1, p. 107–117, 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/24/1/107/525645>. Acesso em: 13 jun. 2025.

LANDGRAF, Jeffrey R.; WU, Jingcai; CALVO, Joseph M. **Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in Escherichia coli**. Journal of Bacteriology, v. 178, n. 23, p. 6930-6936, 1996. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.178.23.6930-6936.1996>. Acesso em: 13 jun. 2025.

LENART BORÓN, Agnieszka; BORÓN, Paweł; KULIK, Karolina; PRAJSNAR, Jan; ŻELAZNY, Mariusz J.; CHMIEL, Małgorzata J.; et al. **Anthropogenic pollution gradient along a mountain river affects bacterial community composition and genera with potential pathogenic species**. Scientific Reports, v. 12, art. 18140, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22642-x>. Acesso em: 16 jun. 2025.

LIMA, Renato S.; DOULA, Suzy M. **A tradição e a lei: o queijo Minas artesanal e os impasses da legislação sanitária no impedimento de sua comercialização fora do estado de MG**. Revista Faz Ciência, v. 14, n. 19, p. 181-195, 2012.

LOBO, Gustavo Dantas. **O javali (Sus scrofa) no Brasil: controle, prevenção e impactos econômicos**. 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/003080914>. Acesso em: 15 jun. 2025.

LOGUERCIO, Ana Paula; ALEIXO, José Augusto Gava. **Microbiologia do queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente**. Ciência Rural, v. 31, n. 6, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/PK3m3pNcvkYYSk94YBzXpQsC/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

LUCAS, Adriano S.; CARVALHO, Claudinei M.; CRUZ, Rosane C.; BORBA, Marcos F. **Diagnóstico do uso de nascentes como fonte de abastecimento de água pela pecuária familiar no território do Alto Camaquã, RS**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL NA AGROPECUÁRIA, 4., 2014, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. p. 136–142. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1001658/1/Lucasetal.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2024.

LUCENA AGUILAR, Giovanna; CASTRO, Vanessa L.; ALCÂNTARA, Paula M.; et al. **DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis**. Biopreservation and Biobanking, v. 14, n. 4, p. 264–270, ago. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27158753/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

MACHADO, Eduardo C.; FREITAS, Mariana P.; CUNHA, Liliane S.; et al. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais**. Food Science and Technology, v. 24, p. 516-521, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/qJ3sq6qhqspsjRbBhnZyTnkr/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

MADANI, Amir; WANG, Zhaowei; XIE, Xin; et al. **Artificial intelligence for intraoperative guidance: using semantic segmentation to identify surgical anatomy during laparoscopic cholecystectomy**. Annals of Surgery, v. 276, n. 2, p. 363–369, ago. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33196488/>. Acesso em: 22 jun. 2025.

MARA, Duncan; HORAN, Nigel J. (Ed.). **Handbook of water and wastewater microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 2003.

MARTEN, Gerald G. **Productivity, stability, sustainability, equitability and autonomy as properties for agroecosystem assessment**. *Agricultural Systems*, v. 26, p. 291-316, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0308521X88900467>. Acesso em: 13 jun. 2025.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 158 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/006cce81-c2cd-4169-902f-1cc5e5a37f08>. Acesso em: 13 jun. 2025.

MCMULLEN, Lynn M.; STILES, Michael E. **Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats**. *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 13, p. 64-71, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28384021/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

MENESES, J. N. C. **Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil: dossiê interpretativo**. Belo Horizonte: IPHAN, 2006. v. 1. Disponível em: http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minis_web.pdf. Acesso em: 22 jun. 2024.

MENEZES, Maria Fernanda Cáceres; AMARAL, Adriana Tavares do; GUIMARÃES, Fabiana Estanislau; et al. **Microbiota e conservação do leite**. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 18, n. 5, p. 76-89, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/index.php/reget/article/view/13033>. Acesso em: 15 jun. 2025.

MENEZES, R. S. C.; SALCEDO, I. H. **Mineralização de N após incorporação de adubos orgânicos em um Neossolo Regolítico cultivado com milho**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 11, n. 4, p. 361-367, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000400003>. Acesso em: 23 jun. 2025.

MERCK. **Chromocult® Coliform Agar: ficha técnica**. [S.l.]: Merck KGaA, 2013. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-JP-Site/ja_JP/-/JPY/ShowDocument-Pronet?id=201304.082. Acesso em: 4 jun. 2025.

MERCK. **Chromocult® Coliform Agar: ficha técnica**. [S.l.]: Merck KGaA, 2014. Disponível em: <https://ebiz-newtest.merckmillipore.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/349/182/ds4485es00-chromocult-coliform-6-25--mk.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2025.

MESSIAS, C. G.; FERREIRA, M. C. **Modelo geoespacial para a identificação de áreas com perigo de propagação de queimadas no Parque Nacional da Serra da Canastra**. *Revista do Departamento de Geografia, São Paulo*, v. 38, p. 154-168, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/rdg.v38i1.153493>. Acesso em: 2 jun. 2024.

MILLER, G. Tyler; SPOOLMAN, Scott E. **Ciências ambientais**. 18. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2021. 562 p.

MINAS GERAIS (Estado). **Lei n. 20.549, de 18 de dezembro de 2012: dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais**. *Diário do Executivo*, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=248559>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004: identifica a microrregião da Canastra como produtora do Queijo Minas Artesanal.** Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

MINAS GERAIS. **Portaria IMA nº 1969, de 26 de março de 2020: dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal - QMA em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal - QMA.** Belo Horizonte, 26 mar. 2020. Disponível em: <https://www.ima.mg.gov.br/files/1706/Ano-2020/17923/Portaria-n%C2%BA-1969%2C-de-26-de-marco-de-2020..pdf>. Acesso em: 14 jun. 2025.

MOHAPATRA, B. R.; MAZUMDER, A. **Comparative efficacy of five different rep PCR methods to discriminate Escherichia coli populations in aquatic environments.** Water Science & Technology, v. 58, n. 3, p. 537–547, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18725719/>. Acesso em: 04 mai. 2024.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. **Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits.** International Journal of Food Microbiology, v. 177, p. 136-154, 2014.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DAS DORES, M. T.; FERREIRA, E. M.; et al. **Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal, fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 63, n. 363, p. 26-30, 2008. Disponível em: <https://revistaict.embrapa.br/index.php/inct/article/view/129>. Acesso em: 5 jun. 2024.

NÓBREGA, Juliana Escarião da. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras.** 2007. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFV_84aec1586e1e8d3a0e75f1278c0da5b3. Acesso em: 5 jun. 2024.

OKURA, M. H. **Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal comercializados na região do triângulo mineiro.** 2010. 146 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/a95259a3-2085-4dec-ba9f-dbf11f4b4bc0>. Acesso em: 14 jun. 2024.

ORDOÑEZ, J. A. P. **Tecnologia de alimentos: volume 2: alimentos de origem animal.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAPALEXANDRATOU, Z.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; DE VUYST, L. **(GTG)5-PCR reference framework for acetic acid bacteria.** FEMS Microbiology Letters, v. 301, n. 1, p. 44-49, 2009. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01792.x. Epub 2009 Sep 17. PMID: 19824903.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: riscos microbiológicos da carne.** Goiânia: UFG, 1995. v. 1, p. 294-308.

PINEDA, Ana Paulina Arellano. **Caracterização molecular de Staphylococcus aureus isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo,

2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-13102022-150737/pt-br.php>. Acesso em: 28 ago. 2024.

QUEIJO DA CANASTRA. **Região**. 2025. Disponível em: <https://queijodacanastra.com.br/regiao/>. Acesso em: 08 mar. 2025.

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; et al. **The complex microbiota of raw milk**. FEMS Microbiology Reviews, v. 37, p. 664–698, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>. Acesso em: 14 jun. 2025.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Herd health: food animal production medicine**. Philadelphia: Saunders, 1994. 631 p.

RESENDE, Álvaro Vilela de. **Agricultura e qualidade da água: contaminação da água por nitrato**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/546464/1/doc57.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2025.

RESENDE, E. C. **Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes**. 2014. 114 p. Dissertação (Mestrado profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFJF_edf63c4ca40afa28aab7b50a3bef9f1c. Acesso em: 19 mai. 2025.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; CUNHA, A. F.; NUNES, A. C.; MOREIRA, J. L. S.; PENNA, C. F. A. M. **Queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, p. 1567-1573, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/QvV468RTqd6HNcdxN3LjvSK/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 5 jun. 2024.

RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; GARINO JUNIOR, F.; COSTA, E. O. **Análise microbiológica da qualidade da água utilizada na ordenha em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo e Minas Gerais**. Napgama, v. 3, n. 3, p. 3-6, 2000. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001199599>. Acesso em: 30 mar. 2025.

RIBEIRO, Laryssa F.; BARBOSA, Mayhara M. C.; PINTO, Fernanda R.; LAVEZZO, Leticia F.; ROSSI, Gabriel A. M.; ALMEIDA, Henrique M. S.; AMARAL, Luiz A. **Diarrheogenic Escherichia coli in raw milk, water and cattle feces in non-technified dairy farms (Escherichia coli diarreogênica em leite cru, água e fezes bovinas de propriedades leiteiras não tecnificadas)**. Ciência Animal Brasileira, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/335989124>. Acesso em: 27 jun. 2025.

ROMERO, Rosana; NAKAJIMA, Jimi Naoki. **Espécies endêmicas do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais**. Brazilian Journal of Botany, São Paulo, v. 22, p. 259-265, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/qfyRDKgZb3ZdYGVtKxv8zHs/>. Acesso em: 2 jun. 2024.

SABOURIN, E.; LEMOS, C. C. S.; TRIVINHO, E.; et al. **Fertilidade e agricultura familiar no Agreste Paraibano: um estudo sobre o manejo da biomassa**. 2000. Disponível em: <https://agritrop.cirad.fr/477046/>. Acesso em: 15 jun. 2025.

SALAM, S.; McDANIEL, R.; BLEAKLEY, B.; AMEGBLETOR, L.; MARDANI, S. **Variability of E. coli in streambed sediment and its implication for sediment sampling**. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 242, p. 103859, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34343844/>. Acesso em: 10 jun. 2025.

SANTOS, A. F. dos; MENEZES, R. S. C.; FRAGA, V. S.; PÉREZ-MARIN, A. M. **Efeito residual da adubação orgânica sobre a produtividade de milho em sistema agroflorestal**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 12, p. 1267-1272, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662010001200003>. Acesso em: 15 jun. 2025.

SANTOS, A. S. **Queijo minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

SARAIVA, Claudety Barbosa; ARAÚJO, Rosiane Coelho de; CASTRO, Túlio Luiz de; et al. **Aspectos ambientais da produção do queijo minas artesanal**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 67, n. 388, p. 41-47, 2012. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/264>. Acesso em: 15 jun. 2025.

SILVA, Gilvan; DUTRA, Paulo Ricardo Santos; CADIMA, Ivan Marques. **Higiene na indústria de alimentos**. 2016. Disponível em: <https://proedu.rnp.br/handle/123456789/361?show=full>. Acesso em: 20 out. 2024.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. **Avaliação do padrão coliformes a 45 °C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e Escherichia coli em alimentos**. *Food Science and Technology*, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/FwVQNPFX6pFSLMQVDBdfpkx/abstract/?lang=en&format=html>. Acesso em: 26 ago. 2024.

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. **Eutrophication science: where do we go from here?**. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 4, p. 201-207, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.11.009>. Acesso em: 15 jun. 2025.

SOARES, Juliane Alessandra Cavalieri; OLIVEIRA, Ana Carolina de; TERRA, Natália Rios; et al. **Efeitos antrópicos sobre a qualidade dos sedimentos do rio Toledo (PR, Brasil): análises físico-químicas e ecotoxicológicas**. 2017. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/3143>. Acesso em: 15 jun. 2025.

STEINBERG, R. S.; MONTASSIER, E.; SAID, L. B.; et al. **Changes in bovine milk bacterial microbiome from healthy and subclinical mastitis affected animals of the Girolando, Gyr, Guzera, and Holstein breeds**. *International Microbiology*, 2022. doi: 10.1007/s10123-022-00267-4.

STEINBERG, Raphael S.; MONTEIRO, Cinthia R.; MONTASSIER, Edgard; et al. **Prospecting of potentially probiotic lactic acid bacteria from bovine mammary ecosystem:**

imminent partners from bacteriotherapy against bovine mastitis. *International Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 189-206, 2022.

TORRES, C. P. **Caracterização da atividade leiteira de escala comercial no município de Campo Largo – PR.** 2014. 93 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VANETTI, M. C. D.; PINTO, U. M. **Bactérias patogênicas em leite e produtos lácteos.** p. 181-206. In: PINTO, C. L. O.; LOPES, L. M. *Qualidade microbiológica do leite cru.* Viçosa, MG: EPAMIG, 2013. 272 p.

VEZALLI, Lucas Pezzin; MARTINS, Aline de Souza; SILVA, Tiago Marinho da; et al. **Elaboração do Plano APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) na produção do queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra – MG.** 2022. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/588255874/03V40-n1-2022-p17a23>. Acesso em: 15 jun. 2025.

ZHANG, W.; RICKETTS, T. H.; KREMEN, C.; CARNEY, K.; SWINTON, S. M. **Ecosystem services and dis-services to agriculture.** *Ecological Economics*, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 253–260, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921800907001462>. Acesso em: 07 jun. 2025.

ZHANG, X.-X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. **Antibiotic resistance genes in water environment.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, n. 3, p. 397–414, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>. Acesso em: 15 jun. 2025.

ZHANG, Xuzhao; CAI, Hong; TU, Haomiao. **Impact of landscape pattern on river water quality based on different topographic relief areas: a case study of Chishui River Basin in Southwest China.** *Sustainability*, Basel, v. 15, n. 2, p. 1476, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su15021476>. Acesso em: 22 jun. 2025.