



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL NA  
AMAZÔNIA**

**ALLANA LAIS ALVES LIMA**

**MICROBIOMA DE BÚFALAS LEITEIRAS: ESTUDO DA INTERAÇÃO  
COM O BEZERRO E AMBIENTE AO DESENVOLVIMENTO DE  
RESISTÊNCIA BACTERIANA**

**BELÉM-PA  
2024**

**ALLANA LAIS ALVES LIMA**

**MICROBIOMA DE BÚFALAS LEITEIRAS: ESTUDO DA INTERAÇÃO  
COM O BEZERRO E AMBIENTE AO DESENVOLVIMENTO DE  
RESISTÊNCIA BACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia para a obtenção do título de Doutora em Reprodução Animal.

**Área de Concentração**

Reprodução de Animais Silvestres e Domésticos.

**Orientador**

Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana.

**Co-orientadores**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Joana Montezano Marques

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Prof Dr. Bruno Moura Monteiro

**BELÉM-PA  
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A474m Alves Lima, Allana Lais  
MICROBIOMA DE BÚFALAS LEITEIRAS: ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O BEZERRO E  
AMBIENTE AO DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA / Allana Lais Alves Lima. -  
2024.  
79 f. : il. color.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia (ReproAmazon),  
Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2024.  
Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana Batista Viana  
Coorientador: Prof. Dr. Joana Montezano Marques.
1. Bubalus bubalis, leite, ecologia microbiana, transferência vertical, resistência a antimicrobianos.
- 
- I. Batista Viana, Rinaldo Batista Viana. *orient.* II. Título

CDD 636.089

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** LIMA, Allana Lais Alves

**Título:** Microbioma de búfalas leiteiras: estudo da interação com o bezerro e ambiente ao desenvolvimento de resistência bacteriana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia para a obtenção do título de Doutora em Reprodução Animal.

**Área de Concentração:** Reprodução dos Animais Domésticos e Selvagens

Aprovado em: 18/07//2024

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA  
Orientador

---

Profa. Dra. Joana Montezano Marques  
Universidade Federal Do Pará-UFPA  
Co-orientadora

---

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera  
Universidade de São Paulo-USP  
Co-orientadora

---

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann  
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ  
Membro titular 1

---

Prof. Dr. Diego Assis das Graças  
Universidade Federal do Pará-UFPA  
Membro titular 2

---

Prof. Dra. Alyne Cristina Sodré Lima  
Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amapá - IFAP  
Membro titular 3

---

Dr. Damazio Campos de Souza  
Centro Universitário Augusto Motta-UNISUAM  
Membro titular 4



Comissão de Ética no  
Uso de Animais CEUA/UFRA



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise polifásica da glândula mamária de búfalos e suas correlações com o bezerro e ambiente", protocolada sob o CEUA nº 6612040821 (ID 000370), sob a responsabilidade de **Rinaldo Batista Viana** e equipe; *Allana Lais Alves Lima; Joana Montezano Marques; Bruno Moura Monteiro; Alice Maria Melville Paiva Della Libera* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) na reunião de 15/09/2021.

We certify that the proposal "Polyphasic analysis of buffalo mammary gland and its correlations with the calf and environment", utilizing 32 Buffalos (males and females), protocol number CEUA 6612040821 (ID 000370), under the responsibility of **Rinaldo Batista Viana** and team; *Allana Lais Alves Lima; Joana Montezano Marques; Bruno Moura Monteiro; Alice Maria Melville Paiva Della Libera* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal Rural University of Amazonia (CEUA/UFRA) in the meeting of 09/15/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2021** a **10/2022**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Biotério Unidade de Bubalinocultura Leiteira "Eva Daher Abufaiad"**

Espécie: **Bubalinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 50 meses**

N: **32**

Linhagem: **Mestiços Murrah x Mediterrâneo**

Peso: **35 a 600 kg**

Local do experimento: A utilização dos animais dar-se-á na Unidade de Bubalinocultura Leiteira Eva Daher Abufaiad - BUBali/ISPA/Ufra- Belém -PA, onde amostras serão colhidas do rebanho de bubalinos.

Belém, 23 de setembro de 2021

Prof. Dra. Natalia Guarino Souza Barbosa  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dra. Ernestina Ribeiro dos Santos Neta  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural da Amazônia

*A Deus e ao meu guia espiritual **Mestre***

***Gabriel!***

*A minha família!*

*Ao meu esposo **Camilo González** que sempre  
me apoiou e acreditou no meu potencial, assim*

*como minha família!*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus e ao meu guia espiritual **Mestre Gabriel** por sempre me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, por me dar persistência e determinação, por mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.*

*À minha família, meus pais **Antônio Vitor e Andréia Lima** minha avó **Joana Souza**, meu amado esposo **Camilo Gonzalez** por serem tão presentes, por todo amor e esforço dedicados ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*Aos meus amigos **Vanda Souza** e família, **Julia Cohen, Paula Monteiro, Andrea Viana e Tainara Verônica** por todo conselho e orientação recebida, por cada risada, cada momento de descontração, de desabafo e de apoio nessa caminhada.*

*Aos meus orientadores **Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana e Profa. Dra. Joana Montezano Marques**, pela oportunidade, atenção e apoio durante o período do doutorado. A vocês meu muito obrigado pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação. Minha respeitosa e eterna gratidão!*

*Aos meus co-orientadores **Profa. Dra. Alice Maria Della Libera e Prof. Dr. Bruno Moura Monteiro** pelo apoio durante o doutorado, ensinamentos e orientação.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal (ReproAmazon | Ufra-UFPA)** pela oportunidade de realização do curso de doutorado.*

*A **Profª. Dra. Natalia da Silva e Silva Silveira**, minha primeira orientadora, que me deu a oportunidade de ver a graduação com outros olhos, me mostrou o que era possível, me ensinou com toda atenção, sou muito grata a Sra. por ter acreditado no meu potencial, mesmo quando nem mesmo eu o enxergava, você foi e será sempre uma pessoa que admiro muito.*

*A todos os integrantes do Grupo GAIA e as amigas que cultivei em atividades do grupo. Em especial ao **Hugo Santos, Maria Alzirene, Samara Cardoso, Thayane Maciel, Sacha Lobato e João Marcelo**.*

*Às integrantes do Grupo de Pesquisa em Microbiologia **Josy Garcia, Suania Souza** e querido **Prof. Dr. Walter Oelemann**, em especial a minha amiga **Roseane Reis**.*

*Ao **Prof. Dr. Diego Assis** que gentilmente auxiliou no sequenciamento de amostras do presente estudo, além de se dispor a ensinar juntamente com seu aluno e meu amigo **Sávio Costa** a processar e interpretar os dados.*



*A Caroline Teixeira e meu estimado amigo Dr. Damazio Campos por se disponibilizarem para realização das viagens de campo para colheita das amostras deste trabalho.*

*Ao Sr. Leandro e Sr. Zeca pela recepção e auxílio na colheita das amostras e a todos animais aqui incluídos, pois sem eles não haveria estudo científico, e sem os estudos científicos não haveria contribuição à ciência.*

*À banca avaliadora por aceitar gentilmente o convite.*

*À Capes pela bolsa de estudos concedida.*

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 BUBALINOCULTURA.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 LEITE BUBALINO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE DE BÚFALAS.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 MICROBIOMA.....</b>	<b>19</b>
<i>1.4.1 Microbioma do leite de búfalas.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.2 Microbioma das fezes de búfalos.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4.3 Microbioma da saliva do bezerro.....</i>	<i>22</i>
<i>1.4.4 Microbioma do solo.....</i>	<i>23</i>
<b>1.5 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....</b>	<b>22</b>
<i>1.5.1 Bactérias Gram-negativas.....</i>	<i>22</i>
<i>1.5.2 Resistência antimicrobiana.....</i>	<i>24</i>
<i>1.5.3 A resistência a classe beta-lactâmicos.....</i>	<i>24</i>
<i>1.5.4 A resistência a classe tetraciclina.....</i>	<i>24</i>
<b>2. OBJETIVOS DA TESE.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b><i>CAPÍTULO 1 - ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO LEITE DE BÚFALA E SUA INTERAÇÃO COM O BEZERRO.....</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b><i>CAPÍTULO 2 - BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES À TETRACICLINA E AOS BETA-LACTÂMICOS SÃO COMPARTILHADAS ENTRE A MICROBIOTA DE BÚFALAS, BEZERROS E O MEIO AMBIENTE, NO MARAJÓ, AMAZÔNIA BRASILEIRA.....</i></b>	<b><i>57</i></b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS DA TESE.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>77</b>

## RESUMO DA TESE

LIMA, A. L. A. **Microbioma de búfalas leiteiras: estudo da interação com o bezerro e ambiente ao desenvolvimento de resistência bacteriana**. 2024. 71f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal na Amazônia). Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2024.

A presente tese foi dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo, a hipótese de que o microbioma do leite da búfala poderia compartilhar táxons com amostras de suas fezes, do solo do pasto e, ainda com a saliva de seu bezerro, foi testada. Além disso, uma provável correlação entre gerações também foi estudada. Para tal, amostras de leite, fezes e saliva foram colhidas em triplicata, de animais de primeira e terceira parição em uma propriedade no arquipélago do Marajó, Amazônia, Pará-Brasil. O solo do pasto também foi coletado. Os animais se encontravam clinicamente saudáveis. A contagem de células somáticas do leite mostrou diferença significativa ao ser avaliada entre novilhas e vacas. A abordagem de *Metabarcoding* usando 16S rRNA demonstrou diferença significativa na estrutura filogenética e ecológica entre todas as matrizes estudadas. A beta-diversidade mostrou agrupamento entre as amostras de leite dos animais de primeira e terceira lactações, e comportamentos semelhantes em amostras de fezes e saliva. Os filos mais abundantes nas amostras biológicas foram Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota. Esses táxons, quando compartilhados eram encontrados concomitantemente sempre em pelo menos duas matrizes biológicas, mas nunca nas três matrizes estudadas ao mesmo tempo. O filo Firmicutes foi compartilhado entre o solo e o leite e as fezes de vacas e novilhas. As amostras estudadas apresentaram um padrão matriz-dependente. Foi possível observar o compartilhamento de famílias no microbioma do leite e das fezes búfalas e saliva de seus bezerros, fortalecendo a ideia de interação de microbiota entre eles. No segundo capítulo, foi avaliada a hipótese de que haveria correlação entre a microbiota Gram-negativa nas fezes de búfalas, quando comparadas entre diferentes números de lactação, bezerros e ambiente. Para tanto, foram coletadas amostras fecais de búfalas de primeira lactação (novilha - HF) e quarta lactação (vaca - CW), bem como de seus respectivos bezerros (CFH e CFC) de uma fazenda no Arquipélago do Marajó, Pará, Brasil. Amostras de solo (S) também foram coletadas. As amostras foram diluídas e semeadas em meios seletivos suplementados com Ceftriaxona (CRO) ou Tetraciclina (TET) para isolamento bacteriano. Colônias cultivadas em CRO foram submetidas à pressão seletiva pelo método de replicação em placas com Cefepima (CFP) e Imipenem (IMP). A contagem, o isolamento e a identificação foram realizados por MALDI-TOF. No total, 91 cepas bacterianas foram identificadas: 37 eram resistentes a TET, 27 a CFP e 27 a IMP. As cepas foram identificadas como *Escherichia coli* (TET [33]; IMP [7]), *Ochrobactrum intermedium* (TET [4]; CFP [19]; IMP [10]), *Achromobacter xyloxidans* (CFP [5]) e *Stenotrophomonas maltophilia* (CFP [3]; IMP [10]). Foi observado agrupamento entre os perfis de resistência para CFC e CW para o antibiótico IMP; CW, HF e CFC com o grupo S para os antibióticos TET, IMP e CFP, respectivamente. Os resultados destacam a importância do monitoramento constante do perfil de resistência bacteriana nesses animais e no solo ao redor, pois bactérias comensais e ambientais podem ser indicadores de pressão seletiva e podem destacar agentes emergentes de resistência antimicrobiana comumente usados.

**Palavras-chave:** *Bubalus bubalis*, leite, ecologia microbiana, transferência vertical, resistência a antimicrobianos.

## ABSTRACT OF THESIS

LIMA, A. L. A. **Microbiome of dairy buffaloes: study of the interaction between the calf and the environment and the development of bacterial resistance.** 2024. 71p. Thesis (PhD in Animal Reproduction in the Amazon). Institute of Animal Health and Production, Federal Rural University of the Amazon, 2024.

This thesis was divided into two chapters. In the first chapter, the hypothesis that the buffalo milk microbiome could share taxa with samples from its feces, pasture soil, and even with the saliva of its calf was tested. Additionally, a possible correlation across generations was also studied. For this, milk, feces, and saliva samples were collected in triplicate from first and third-parity animals on a farm in the Marajó Archipelago, Amazon, Pará-Brazil. Pasture soil was also collected. The animals were clinically healthy. The somatic cell count in the milk showed a significant difference when evaluated between heifers and cows. The metabarcoding approach using 16S rRNA demonstrated a significant difference in the phylogenetic and ecological structure among all the matrices studied. Beta-diversity showed clustering between the milk samples of first and third-lactation animals, and similar patterns in feces and saliva samples. The most abundant phyla in the biological samples were Firmicutes, Proteobacteria, and Bacteroidota. When shared, these taxa were found simultaneously in at least two biological matrices, but never in all three matrices at the same time. The phylum Firmicutes was shared between the soil and the milk, and between the feces of cows and heifers. The samples studied presented a matrix-dependent pattern. It was possible to observe the sharing of families in the microbiome of buffalo milk and feces and the saliva of their calves, reinforcing the idea of microbial interaction among them. In the second chapter, the hypothesis was assessed that there would be a correlation between the Gram-negative microbiota in buffalo feces when compared across different lactation numbers, calves, and the environment. To this end, fecal samples were collected from first-lactation (heifer - HF) and fourth-lactation (cow - CW) buffaloes, as well as their respective calves (CFH and CFC) from a farm in the Marajó Archipelago, Pará, Brazil. Soil samples (S) were also collected. The samples were diluted and plated on selective media supplemented with Ceftriaxone (CRO) or Tetracycline (TET) for bacterial isolation. Colonies grown on CRO were subjected to selective pressure using the replication method on plates with Cefepime (CFP) and Imipenem (IMP). Counting, isolation, and identification were performed using MALDI-TOF. In total, 91 bacterial strains were identified: 37 were resistant to TET, 27 to CFP, and 27 to IMP. The strains were identified as *Escherichia coli* (TET [33]; IMP [7]), *Ochrobactrum intermedium* (TET [4]; CFP [19]; IMP [10]), *Achromobacter xyloxidans* (CFP [5]), and *Stenotrophomonas maltophilia* (CFP [3]; IMP [10]). Grouping was observed between the resistance profiles for CFC and CW for the antibiotic IMP; CW, HF, and CFC with group S for the antibiotics TET, IMP, and CFP, respectively. The results highlight the importance of constant monitoring of the bacterial resistance profile in these animals and the surrounding soil, as commensal and environmental bacteria can be indicators of selective pressure and may highlight emerging antimicrobial resistance agents commonly used.

**Keywords:** *Bubalus bubalis*, milk, microbial ecology, vertical transfer, antimicrobial resistance.

## CONTEXTUALIZAÇÃO



## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 BUBALINOCULTURA

Os búfalos foram inicialmente domesticados há milênios, primeiro na Mesopotâmia por volta do terceiro milênio a.C., depois na China durante o segundo milênio a.C. Mais tarde, durante a Idade Média, eles foram levados para a Europa, Extremo Oriente e África. No Brasil, sua chegada correu a partir dos meados do século XIX, trazidos em pequenos grupos da Ásia, e, principalmente, da Itália e do Caribe (Nascimento *et al.*, 2023).

A criação de búfalos no Brasil teve grande êxito, principalmente na Ilha do Marajó, localizada no delta do estado do Pará, formado pelo Rio Amazonas. O primeiro a fazê-lo foi Vicente Chermont de Miranda, que trouxe alguns animais da região do Mediterrâneo, na Itália. A partir desse ponto, a importação de búfalos se expandiu para várias regiões do país (Silva *et al.*, 2021), o qual compõe hoje um rebanho de aproximadamente 1,6 milhões cabeças, o maior fora do continente asiático (IBGE, 2023).

Os búfalos são um importante recurso pecuário em diversas regiões mundiais, principalmente em países tropicais e subtropicais (Mokhber *et al.*, 2018), por apresentar tripla aptidão, sendo usado não apenas para tração, mas também para produção de leite e carne (Zhang; Colli; Barker, 2020). Ademais, a espécie bubalina destaca-se por sua habilidade de se adaptar a diversas condições climáticas e altitudes, além de ser facilmente manejado devido a sua docilidade. Por essas razões, é possível encontrar criações de búfalos tanto em regiões de clima frio na Europa quanto em áreas de clima quente, como em países asiáticos e no norte do Brasil (Neto *et al.*, 2022).

O búfalo asiático (*Bubalus bubalis*) é uma espécie domesticada que, frequentemente, é erroneamente confundida pelo Bisão americano selvagem (*Bison bison*), bem como pelo búfalo africano (*Syncerus caffer*). Essas duas últimas espécies são, na verdade, não relacionadas e de natureza selvagem. *Bubalus bubalis* é composto por duas subespécies distintas: o búfalo-do-rio (*B. bubalis bubalis*) e o búfalo-do-pântano (*B. bubalis kerebau*), que de acordo com Minervino *et al.* (2020), apresentam divergência genética com diferença no número de cromossomos (50 e 48, respectivamente), além de divergências morfofisiológica, produtiva e reprodutiva.

Atualmente no Brasil, são oficialmente reconhecidas quatro raças de búfalos: Carabao, Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi, todas com potencial para a produção de leite e carne. A produção média anual de leite dessas raças é de 1.800 litros em 300 dias de lactação, evidenciando o alto potencial produtivo da espécie (ABCB, 2023).

O estado do Pará destaca-se como o principal polo de produção pecuária do país, abrigando 40% do rebanho nacional, com cerca de 65% concentrados no arquipélago do Marajó. Este arquipélago, famoso por sua riqueza natural e cultural, engloba diversos municípios, como Soure, Cachoeira do Arari, Ponta de Pedras, Muaná, Chaves, Salvaterra e Cruz de Santa Arari, onde a criação bubalina desempenha um papel crucial na economia e na sociedade local (Lopes Filho, 2020).

Nesse contexto, alguns municípios do Marajó apresentam baixos Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) quando comparados com o restante do Brasil, e a criação de búfalos emerge como uma alternativa eficiente para os produtores rurais. Certas características desses animais permite um manejo menos oneroso, impulsionando a economia local através da produção de carne, leite, couro, e fabricação de queijo, além do transporte de cargas. Ao mesmo tempo, essa atividade atrai turistas interessados na cultura local, contribuindo para o desenvolvimento regional (Dos Santos, 2020).

A criação de bubalinos foi tradicionalmente voltada para a produção de carne. No entanto, de acordo com Santos *et al.* (2016), nas últimas décadas, verificou-se uma expansão significativa na exploração leiteira desses animais. Essa tendência deve-se à composição físico-química única do leite bubalino em comparação ao leite bovino, permitindo a produção de derivados lácteos de alto valor comercial. Como resultado, a bubalinocultura voltada à produção de leite tem crescido notavelmente.

## **1.2 LEITE BUBALINO**

O leite é uma substância biológica complexa que se constitui por água e diversos nutrientes essenciais, como gorduras, açúcares, proteínas, vitaminas e minerais. Adicionalmente, a composição do leite é influenciada por uma série de fatores internos e externos que podem de certa forma influir sobre ela (Neglia *et al.*, 2023).

Estudos sobre a composição do leite de búfala indicam que ele possui percentuais mais elevados de sólidos totais (Kapadiva *et al.*, 2016), proteína (4-5%) (Borghese e Mioli, 2016) e lactose (5-5,63%) (Becskei *et al.*, 2020). Além de apresentar maior quantidade de glóbulos de gordura em comparação com o leite de vaca (6,4-8% vs. 4,1-5%) (Becskei *et al.*, 2020). Sendo estas características modeladas por diversos fatores, como raça, estação do ano, práticas de gestão, alimentação, saúde do animal, estágio de lactação e contagem de células somáticas do leite (Gustavsson *et al.*, 20214; Sahin, Yildirim e Ulutas, 2017).

As vantagens do leite bubalino, não se limitam apenas às suas características físico-químicas, composicionais e sensoriais, mas abrangem benefícios nutricionais. Um exemplo são as proteínas, consideradas completas e de alto valor biológico, contendo aminoácidos essenciais nas proporções necessárias para o corpo humano (Khedkar *et al.* 2016). Além disso, seu elevado teor de sólidos totais, resulta em um rendimento superior dos produtos lácteos como queijo, manteiga e iogurte (Mane e Chatli., 2015).

No âmbito da produção leiteira, os búfalos são a segunda maior fonte de leite do mundo, contribuindo com 15,3% (139 toneladas) do leite global, e apresentando uma taxa de crescimento anual de 4,5% (IFD, 2021). Seu consumo tem aumentado nos últimos anos devido ao sabor suave, à taxa de gordura favorável, e às características organolépticas únicas de seus produtos derivados (Abdel-Hamil *et al.*, 2023).

Apesar do sucesso na sua comercialização, o leite bubalino não possui regulamentação federal vigente no Brasil que estabeleça todos os parâmetros necessários para sua padronização. Em decorrência da similaridade entre os gêneros *Bos* e *Bubalus*, a Instrução Normativa n° 76 de 26 de novembro de 2018, usada para leite bovino, aplica-se provisoriamente como referência para o leite de búfala.

### **1.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE DE BÚFALAS**

A contagem de células somáticas é uma ferramenta que determina a qualidade do leite em todo mundo, sendo um importante indicador de saúde do úbere e indicando precocemente enfermidades como a mastite. O número de células somáticas aumenta significativamente em caso de infecção, podendo influir na diminuição da produção leiteira, bem como afetar as características organolépticas, a durabilidade e a vida útil dos produtos nas prateleiras, o que causa consequentemente grandes perdas econômicas aos produtores (Sharma *et al.*, 2011; Sahim *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Jorge *et al.* (2005), foram colhidas 544 amostras de leite de 38 búfalas, e ao analisarem o escore do *California Mastitis Test* (CMT) em conjunto com a CCS, foi observado que 83,3% das amostras apresentaram score 1, apresentaram uma média de 12.830 células/ml, enquanto 11% apresentaram score 2, com uma média de 46.810 células/ml. Já Cerón-Munhoz *et al.* (2002), em estudo realizado no estado de São Paulo, ao avaliarem 2693 amostras provenientes de 222 búfalas Murrah, observaram uma média de 63.610 células somáticas/mL, sendo que 37% apresentaram entre 0 e 17.000 cels. /mL, 59,2% entre 18.000 e 282.000 cels. /mL e apenas 3,2% excederam os valores de 282.000 cels. /mL.



Sahim *et al.* (2017) avaliaram a quantidade de partos e o estágio de lactação em relação às células somáticas do leite, e observaram que a CCS variou de acordo com a quantidade de partos, sendo que animais de terceira lactação apresentaram menores valores, com média de 50.014 cels. / mL, e maiores valores nos animais de primeira e sétima lactações, onde observaram médias de 186.109 cels. / mL.

## 1.4 MICROBIOMA

Microrganismos definem-se como organismos unicelulares microscópicos presentes na natureza, isoladamente ou em agregados celulares. A microbiota por sua vez, consiste em um conjunto diversificado de espécies, que ocupam diferentes nichos ecológicos, variando conforme o ambiente onde se encontram, interagindo entre si e com o meio, podendo ser cultivadas para a identificação (Marchesi e Ravel, 2015; Ferrocino *et al.*, 2021).

Neste contexto, a definição de microbioma segundo Berg *et al.* (2020) consiste em comunidades microbianas que ocupam um habitat definido. Não se referindo apenas a caracterização dos microrganismos, mas abrangendo também sua função. Originando assim um microecossistema dinâmico e interativo, sendo determinante para saúde e funcionamento de hospedeiros.

### 1.4.1 Microbioma do leite de búfalas

É reconhecido que o equilíbrio entre o hospedeiro e seu microbioma é indispensável para sua saúde, uma vez que esta tem papel na indução, treinamento e função do sistema imune (Belkaid e Hand, 2014). Apesar da maior parte dos estudos anteriores se concentrarem na microbiota do rúmen de bovinos e bubalinos (Myer *et al.*, 2015; Noronha *et al.*, 2023), reconhece-se também outros locais, que possuem seu próprio microbioma (Rainard, 2017).

Fatores como local de criação e modo de ordenha, tipo de criação, dieta e cama utilizadas, influenciam as populações bacterianas presentes no teto do animal, no ambiente e, consequentemente, no leite proveniente do mesmo (Kable *et al.*, 2016). Young *et al.* (2015) observaram uma correlação entre o microbioma intestinal e o da glândula mamária através do sequenciamento do rRNA 16S em amostras de leite, fezes e sangue de vacas lactantes, tendo identificado bactérias pertencentes aos gêneros *Ruminococcus* e *Bifidobacterium*, e à família *Peptostreptococcaceae*. Este resultado sugere a existência de uma via de comunicação que facilita a migração de componentes da microbiota intestinal para a glândula mamária.

Estudos utilizando a técnica de *metabarcoding* para pesquisa do microbioma do leite de búfalas são recentes (Catozzi *et al.*, 2017; Salmann *et al.*, 2023; Luziatelli *et al.*, 2023), mas o avanço de novas técnicas em bubalinos como a análise metagenômica pode representar a estratégia para alcançar a identificação em nível de espécies e estudar de forma mais profunda esse microbioma e correlacioná-lo a saúde do úbere (Catozzi *et al.*, 2020).

Neste contexto, o microbioma do leite é dinâmico, e em sua composição predominam bactérias, seguidas por bolores e leveduras. Uma pesquisa realizada na Itália com búfalas saudáveis, identificou que membros dos gêneros *Micrococcus*, *Propionibacterium* e *Solibacillus* compunham o *core microbiome* do leite cru desses animais (Catozzi *et al.*, 2017). Outra pesquisa, realizada no Paquistão, comparou o microbioma de búfalas saudáveis com o de búfalas com mastite clínica e subclínica, e observou em animais saudáveis maiores percentuais dos gêneros *Streptococcus*, *Herbaspirillum* e *Estafilococos*; em animais com mastite clínica *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*; e em animais com mastite sub-clínica *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Staphylococcus* (Salmann *et al.*, 2023).

#### 1.4.2 Microbioma das fezes

O microbioma intestinal de animais tem sido pesquisado devido a seu papel em processos fisiológicos como nutrição, saúde e produtividade animal. Em ruminantes, as bactérias presentes no trato gastrointestinal (TGI) desempenham funções importantes, como a quebra da celulose e a produção de ácidos graxos voláteis como acetato, butirato e propionato, que fornecem mais de 70% da energia para o animal (Durso *et al.*, 2010; Holman *et al.*, 2019).

Neste contexto, a preservação de populações microbianas benéficas se torna algo importante no sentido de manter a homeostase do animal. Contudo o microbioma do TGI também pode ser influenciado por diversos fatores, tanto internos quanto externos. Entre eles, destacam-se a dieta, a genética do hospedeiro, a idade, o estado de saúde e infecções, que podem modular a composição microbiana (Castillo-Lopez e Domínguez-Ordóñez, 2019).

A diversidade de populações microbianas nos pré-estômagos de ruminantes é bastante uniforme. Estudo realizado por Mao *et al.* (2015) descreve que no rúmen bovino encontra-se a maior diversidade bacteriana. Entretanto no mesmo estudo foi observado que no intestino a densidade de bactérias é a mais elevada, juntamente com as concentrações de ácidos graxos voláteis como acetato, propionato e butirato encontradas no intestino grosso (ceco e cólon) e no reto.

Segundo Oliveira *et al.* (2013) os índices de riqueza e diversidade são semelhantes entre ceco, cólon e reto, além de as abundâncias relativas de cada filo encontrado também apresentam

semelhança, corroborando que o uso de amostras fecais é representativo para caracterização do microbioma do intestino grosso. Meyer *et al.* (2015) estudando o microbioma de fezes de bovinos encontrou maior abundância de *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, ambas pertencentes ao filo Firmicutes. Já Noronha *et al.* (2023) ao estudar microbioma ruminal de búfalos de diferentes ecossistemas da Amazônia Oriental encontrou *Prevotellaceae* e *Bacteroidaceae* como as principais famílias do filo Bacteroidetes e *Lachnospiraceae*, *Acidaminococcaceae* e *Ruminococcaceae* filo firmicutes encontradas em todos os ecossistemas estudados.

#### 1.4.3 Microbioma da saliva

A saliva possui um papel essencial na manutenção da saúde e fisiologia do animal, atuando como barreira frente a potenciais patógenos, além de auxiliar no processo inicial de degradação dos alimentos (Shinde *et al.*, 2024). Existe uma grande diversidade de espécies bacterianas que compõe a microbiota oral, sendo este o segundo habitat mais diverso (Lee *et al.*, 2021).

A saliva fornece condições ideais para aderências das bactérias na boca, sendo suas funções primordiais atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, que se dão a partir de uma mistura complexa de componentes físico-químicos e biológicos, além de ação tamponante e de enzimas que auxiliam na digestão alimentar (Shinde *et al.*, 2024). Além desses componentes a saliva também possui diversas bactérias que podem ser usadas como biomarcadores para detecção de possíveis distúrbios orais, digestivos e outros (Yoshizawa *et al.*, 2013).

O microbioma oral humano foi amplamente estudado, sendo identificados mais de 700 taxóons, incluindo *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. (Baty, Stoner e Soffield, 2022) Estudos realizados anteriormente demonstraram que o microbioma oral pode influenciar em outras partes do corpo, por exemplo na colonização do trato respiratório, oferecendo proteção contra patógenos oportunistas, entretanto uma disbiose nesta microbiota também pode afetar negativamente, ocasionando doenças orais e sistêmicas no hospedeiro (Baker *et al.*, 2024).

Shinde *et al.* (2024) descreve que em humanos, os filos mais abundantes encontrados são Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacterium, Actinobacteria. Em um estudo realizado nos Estados Unidos com leitões desmamados foi observada maior abundância de taxóons pertencentes ao filo Firmicutes, seguido de Proteobacteria. Os gêneros *Streptococcus*, membros da família *Pasteurellaceae* foram os mais abundantes (Buiatte *et al.*, 2024).

#### 1.4.4 Microbioma do solo

O solo representa o mais vasto reservatório de diversidade microbiana na Terra. Essa comunidade microbiana de enorme diversidade pode ter impactos significativos, tanto diretos quanto indiretos, na saúde e bem-estar do solo, das plantas, dos animais e dos seres humanos (Berg *et al.*, 2020). Solos ricos em biodiversidade podem fornecer microrganismos comensais à microbiota intestinal dos animais. Neste contexto, o consumo deliberado de solo ou argila é chamado de geofagia e já foi descrito sendo praticado por alguns animais como ovelhas, gorilas e papagaios (Liddicoat *et al.*, 2020).

Pelo seu baixo senso epicrítico, animais como bovinos e bubalinos podem consumir uma grande quantidade de solo, que estão aderidos a brotos e plantas. Um estudo realizado com vacas, aponta que um animal pode consumir 350 kg de solo por vaca por ano (Jurjanz *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Hartmann *et al.* (2015) foi observada maior abundância do filo Firmicutes com representantes de gêneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Epulopiscium*, *Paenibacillus*, *Solibacillus*, *Symbiobacterium*, *Tepidimicrobium*, *Thermobacillus* e *Ureibacillus*.

### 1.5 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

#### 1.5.1 Bactérias Gram-negativas

A classificação de bactérias em Gram-negativas e Gram-positivas está relacionada ao processo de Coloração de Gram, onde observa-se microscopicamente bactérias Gram-positivas com uma cor arroxeada devida à presença de uma camada espessa de peptidoglicano em sua parede celular, ou uma cor rosácea, observada em bactérias Gram-negativas com camada mais fina de peptidoglicano (Procop *et al.*, 2018).

Esses microrganismos são comumente encontrados em diversos ambientes, incluindo o trato gastrointestinal humano e animal, além de solos e plantas, onde desempenham funções essenciais no ecossistema. Entretanto, esses microrganismos também podem ser identificados como contaminantes de matrizes alimentares (Janda e Abbott, 2021).

Na Medicina Veterinária, estas bactérias são comumente identificadas como responsáveis por causar infecções dos tratos gastrointestinal, geniturinário, e respiratório, acarretando grandes prejuízos econômicos aos tutores e produtores de animais (Aurich, Berninghoff e Ewers, 2022).

A identificação de microrganismos de forma rápida resultou em um grande avanço na

medicina veterinária. Uma das técnicas atualmente empregadas é a de identificação de microrganismos por espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo - TOF (*Time-of-Flight*). Esta metodologia identifica e classifica o patógeno na cultura da amostra através da comparação do seu espectro de massas com os espectros de referência de cepas conhecidas (Angeletti, 2017).

### 1.5.2 Resistência antimicrobiana

Apesar de o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos (RAM) acontecer naturalmente, ou seja, sem o uso direto de antibióticos, o uso indiscriminado dessas drogas provoca uma pressão na seleção de bactérias resistentes, contribuindo para o aparecimento de multirresistência (Smith *et al.*, 2023).

No século XX, a descoberta de antibióticos caracterizou um dos maiores feitos na medicina humana da época. Seu uso na clínica acarretou uma diminuição significativa da morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas, e entre décadas de 30 e 60 sendo que a penicilina por exemplo, está disponível no mercado desde 1941. A partir disso disseminou-se o uso exponencial de antimicrobianos, marcando a chamada “Era de ouro dos antibióticos” (Aslam *et al.*, 2018; Baram *et al.*, 2023).

Em paralelo a isso, houve registros das primeiras cepas bacterianas resistentes e, subsequentemente, o uso indevido e excessivo de diversas classes de antimicrobianos, que vêm sendo impulsionado pela clínica humana e ampla utilização na pecuária e agricultura, resultando na disseminação da resistência a antimicrobianos em todas as populações microbianas (Gajdacs e Albericio, 2019).

Neste contexto, o aumento desenfreado do número de bactérias resistentes a antimicrobianos (RAM) é atualmente uma das mais graves ameaças à saúde pública reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo a resistência de bactérias Gram-negativas particularmente alarmantes (Alonso *et al.*, 2017; OMS, 2023).

Estudos indicam que a resistência a antimicrobianos podem se dar de três principais formas: i) por uma característica intrínseca da espécie, que pode resistir através de características estrutural ou funcional; ii) por mutações que ocorrem durante a replicação celular ou são de certa forma induzidas; iii) através de incorporação de material genético exógeno por transferência gênica horizontal (Blair *et al.*; 2015; Silva e Junio, 2022).

### 1.5.3 A resistência à classe beta-lactâmicos

A resistência a antibióticos beta-lactâmicos possui origem natural, oriunda de uma possível autopreservação de bactérias frente à interação com compostos munidos de anel lactâmico. Uma evidência desse mecanismo ser desenvolvido por questões de sobrevivência, se demonstra pela homologia das  $\beta$ -lactamases com proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (Bush, 2018).

Os antimicrobianos Ceftriaxona e Cefepime pertencem a subclasse das cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações respectivamente. Apresentam atividade antimicrobiana, dispondo de potencial de ação similar ao dos carbapenêmicos. Atuam na interrupção da síntese do peptidoglicano, sendo esta responsável pela formação da parede celular bacteriana, por ligação às proteínas de ligação a penicilina (PBP's), o que ocasiona lise osmótica (Craig e Andes, 2015). A resistência a estes antimicrobianos por sua vez, se dá pela produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) que atuam hidrolisando a cadeia oximino beta-lactâmica dos antimicrobianos (Curello e Mac Dougall, 2014) e produção de  $\beta$ -lactamases AmpC, que podem ser produzidas através de superexpressão do gene cromossômico AmpC ou por um determinante AmpC mediado por plasmídeo, sendo sua ação mais evidente nos canais porínicos da membrana celular, ocasionando mutações e estreitamento (Kim *et al.*, 2006).

O imipenem pertence a subclasse dos carbapenêmicos de 1ª geração, que por sua vez, são utilizados como último recurso no tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos. Possuem ação frente a ESBL e carbapenemases, agindo na atividade de enzimas de construção da membrana bacteriana, interferindo na reticulação da camada peptidoglicana da bactéria, prejudicando assim a formação integral da parede celular, o que leva à lise osmótica (Munera, e Quiceno, 2020). Sua resistência por sua vez, pode ser mediada por dois mecanismos principais: i) produção de  $\beta$ -lactamases (cefalosporinases ou ESBL) combinadas com permeabilidade diminuída devido a perda ou alteração de porinas; ii) produção de  $\beta$ -lactamases hidrolisantes de carbapenêmicos (Nordmann *et al.*, 2011).

### 1.5.4 A resistência a classe tetraciclina

As tetraciclina atuam principalmente no ribossomo e, portanto, na síntese de proteínas das células bacterianas. São antimicrobianos usados extensivamente na medicina humana, veterinária e agricultura, uma vez que oferecem amplo espectro de ação frente a bactérias gram-positivas e Gram-negativas (Hellweger *et al.*, 2011). Esses antibióticos são considerados

bacteriostáticos e podem atuar rompendo a membrana bacteriana ou se ligando ao ribossomo e inibindo a fase de alongamento da síntese proteica, prevenindo a adição de novos aminoácidos que levariam ao crescimento polipeptídico (Nguyen *et al.*, 2014).

Um número crescente de espécies bacterianas resistentes à atividade bacteriostática da tetraciclina vem sendo identificado. A resistência a esses antimicrobianos, se dá por aquisição de determinantes, tendo como principais mecanismos: i) as bombas de efluxo; ii) proteção ribossômica, levando a inativação do antimicrobiano (Schmitz e Fluit, 2010).

## **2. OBJETIVOS DA TESE**

Caracterizar a diversidade e composição bacteriana do leite de búfalas e analisar a resistência aos antimicrobianos de isolados bacterianos dos animais em estudo.

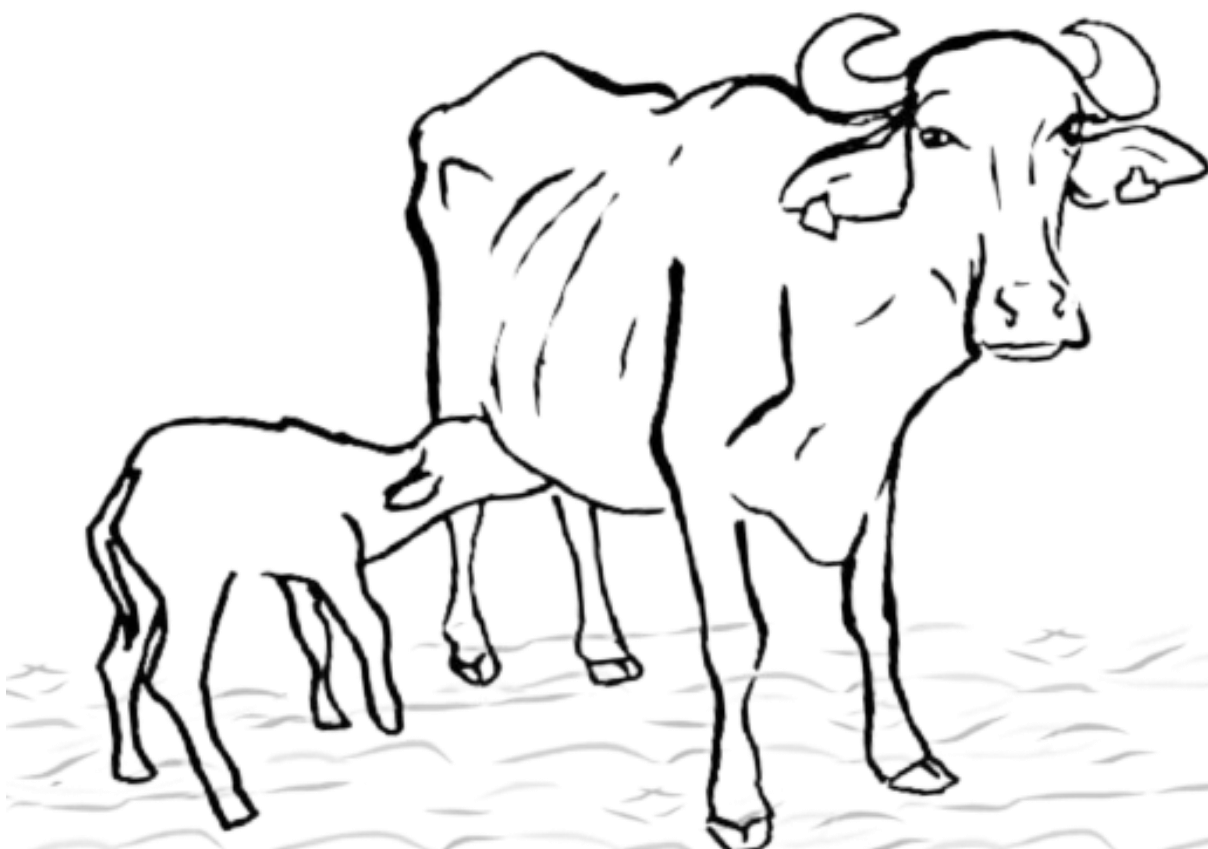
### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a composição do microbioma bacteriano do leite cru procedente de búfalas de primeira e terceira parição;
- Identificar a relação da contagem de células somáticas com o microbioma do leite cru de búfalas;
- Distinguir a composição do microbioma bacteriano do leite e fezes de búfalas com o da saliva do bezerro;
- Identificar bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos e tetraciclina isoladas de fezes de búfalas, seus bezerros e do solo;
- Comparar os perfis de resistência dos isolados bacterianos entre bezerros e suas mães e o ambiente.



*CAPÍTULO 1*

***ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO LEITE DE  
BÚFALA E SUA INTERAÇÃO COM O BEZERRO***



# 1 Study of the microbial diversity of buffalo milk and its interaction 2 with the calf

3 Allana Lais Alves Lima<sup>1</sup>; Savio Souza Costa<sup>2</sup>; Rosiane do Socorro dos Reis<sup>2</sup>; Damazio  
4 Campos de Souza<sup>3</sup>; Guilherme Costa Baião<sup>4</sup>; Rennan G. Moreira<sup>4</sup>; Herve Louis Ghislain  
5 Rogez<sup>2</sup>; Diego Assis das Graças<sup>2</sup>; Rinaldo Batista Viana<sup>1</sup>; Joana Montezano Marques<sup>5</sup>

6 <sup>1</sup> Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém,  
7 Brasil

8 <sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

9 <sup>3</sup> Universidade Augusto Motta UNISUAM, Rio de Janeiro, Brasil

10 <sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,  
11 Brasil.

12 <sup>5</sup> Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo,  
13 Brasil

14  
15 \* Correspondente:

16 Joana Montezano Marques  
17

18 **Keywords:** *Bubalus bubalis*, milk, Metabarcoding, lactations, calf buffalo

## 19 Abstract

20 Buffalo milk stands out for its nutritional characteristics, and, in Brazil, it is produced mainly  
21 in the Amazon region, specifically in the Marajó archipelago, state of Pará. In this context, the  
22 study of this microbiome emerges as an interesting and underexplored topic in the literature,  
23 investigating whether certain biotic factors may influence milk colonization. The hypothesis  
24 that the buffalo milk microbiome could share taxa with samples from their feces, pasture soil,  
25 and even their calf's saliva was tested. Furthermore, a potential correlation between generations  
26 was also explored. For this purpose, milk, feces, and saliva samples were collected in triplicate  
27 from first and third parity animals at peak lactation on a farm in the Marajó archipelago,  
28 Amazon, Pará, Brazil. Pasture soil samples were also collected. All animals were clinically  
29 healthy based on macroscopic examination of milk secretion and the California Mastitis Test,  
30 with no reactivity observed. The somatic cell count in milk showed significant differences when  
31 evaluated between heifers and cows, suggesting that microbial exposure throughout life may  
32 naturally increase SCC (Somatic Cell Count) in these animals. The 16S rRNA Metabarcoding  
33 approach revealed significant differences in the phylogenetic and ecological structure among  
34 all matrices studied. Beta-diversity showed clustering among milk samples from animals in  
35 their first and third lactations, with similar patterns in feces and saliva samples. The most  
36 abundant phyla in biological samples were Firmicutes, Proteobacteria, and Bacteroidota. These  
37 taxa were found concurrently in at least two biological matrices but never in all three  
38 simultaneously. Firmicutes were shared among soil, milk, and feces of both cows and heifers.  
39 Additionally, Actinobacteria were abundant in soil, contrasting with biological samples. The  
40 microbiomes of both milk and feces showed similarity among animals of different ages. It was  
41 possible to observe the sharing of families in the milk and feces microbiomes of buffaloes and  
42 the saliva of their calves, reinforcing the idea of microbial interaction between them.  
43

#### 44 **Introdução**

45 O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um importante recurso na pecuária mundial, tendo a produção  
46 de leite de búfala contribuído em 15% da produção de leite do planeta. Além disso, o leite  
47 bubalino tem despertado a atenção de consumidores principalmente por características  
48 nutricionais relevantes como altos teores de gordura, lactose, proteína, cálcio, vitaminas A e C,  
49 além de baixos níveis de colesterol (Guzman et al., 2020).

50 Ao ser sintetizado e secretado pelos alvéolos mamários de um animal saudável, o leite é  
51 considerado estéril, porém ao ser excretado do teto do animal, ele passa a ser colonizado por  
52 uma diversidade de microrganismos que estão presentes naturalmente no revestimento epitelial  
53 do canal do teto e no ambiente (Melini et al., 2017; Ganda et al., 2016). A diversidade do  
54 microbioma do leite é bem dinâmica, sendo na sua maioria bactérias, seguidas de fungos e  
55 leveduras (Ferrocino et al., 2021).

56 A composição do leite e de seu microbioma pode apresentar alterações, não só pelo uso de  
57 antimicrobianos (Ganda et al., 2016), o que é comumente esperado, mas também pelo tipo de  
58 criação, condições climáticas e alimentação (Kable et al., 2016; Chaves et al., 2016). As fases  
59 de lactação também foram descritas como fator importante para determinação da composição  
60 microbiana do leite em espécies como vacas (Lima et al., 2018; Metzger et al., 2018),  
61 cabras (Mc Innis et al., 2015) e búfalas (Catozzi et al., 2020). Sugerindo que diversos aspectos  
62 podem influir nestas comunidades, sejam eles externos ou fisiológicos. Além disso, técnicas  
63 independentes de cultura ainda mostraram que a microbiota do leite proveniente de um animal  
64 saudável inclui também potenciais agentes patogênicos (Vayssier-Taussat et al., 2014).

65 No contexto vaca-bezerro, o contato materno no sistema de produção leiteira é um  
66 importante fator para saúde e bem-estar dos animais. Assim permite-se que sejam expressos  
67 comportamentos naturais, estimulando o desenvolvimento dos bezerros e aumentando taxas de  
68 crescimento e engorda. Além disso, esse contato afeta positivamente a saúde do úbere, sendo  
69 consequência principalmente da amamentação, indicando uma relação positiva entre  
70 microbioma do leite, a amamentação e a saúde do bezerro (Johnsen et al., 2016). Ademais, em  
71 relação ao bezerro, comportamentos como o pastejo, podem levar o animal a geofagia. O solo  
72 é uma fonte de microrganismos, e estudos anteriores demonstraram uma relação entre a dieta e  
73 a composição do microbioma ruminal de vacas e búfalas. Portanto, suspeita-se que esta troca  
74 ocorra também com o solo acidentalmente ingerido (Iqbal et al., 2018, Noronha et al., 2023).

75 No cenário atual de pesquisa, o sequenciamento e análise de regiões hipervariáveis do gene  
76 rRNA 16S é um método que vem sendo utilizado com grande confiabilidade para caracterizar

77 a diversidade bacteriana de uma determinada amostra (Catozzi et al., 2020, Oikonomou et al.,  
78 2014).

79 No Arquipélago do Marajó a bubalinocultura tem um papel essencial na consolidação da  
80 economia local, levando em consideração que a valorização dos produtos regionais é uma  
81 tendência mundial e, além disso, os consumidores vêm buscando cada vez mais sabores  
82 originais e alimentos mais nutritivos. Neste contexto, apesar da crescente visibilidade que a  
83 bubalinocultura leiteira e seus produtos derivados vêm ganhando, faltam estudos relacionados  
84 ao microbioma do leite de búfala e suas interações com o bezerro e o ambiente. Foi testada a  
85 hipótese de que o microbioma do leite da búfala poderia compartilhar táxons com amostras de  
86 suas fezes, do solo do pasto e, ainda com a saliva de seu bezerro. O objetivo do presente estudo  
87 foi: determinar a composição do microbioma bacteriano do leite cru procedente de búfalas de  
88 diferentes parições, bem como identificar a relação da contagem de células somáticas com o  
89 microbioma do leite cru de búfalas e distinguir a composição do microbioma bacteriano do leite  
90 e fezes de búfalas com o da saliva do bezerro.

## 91 **Material e Métodos**

### 92 **Ética em uso de animais e Gestão do Patrimônio Genético**

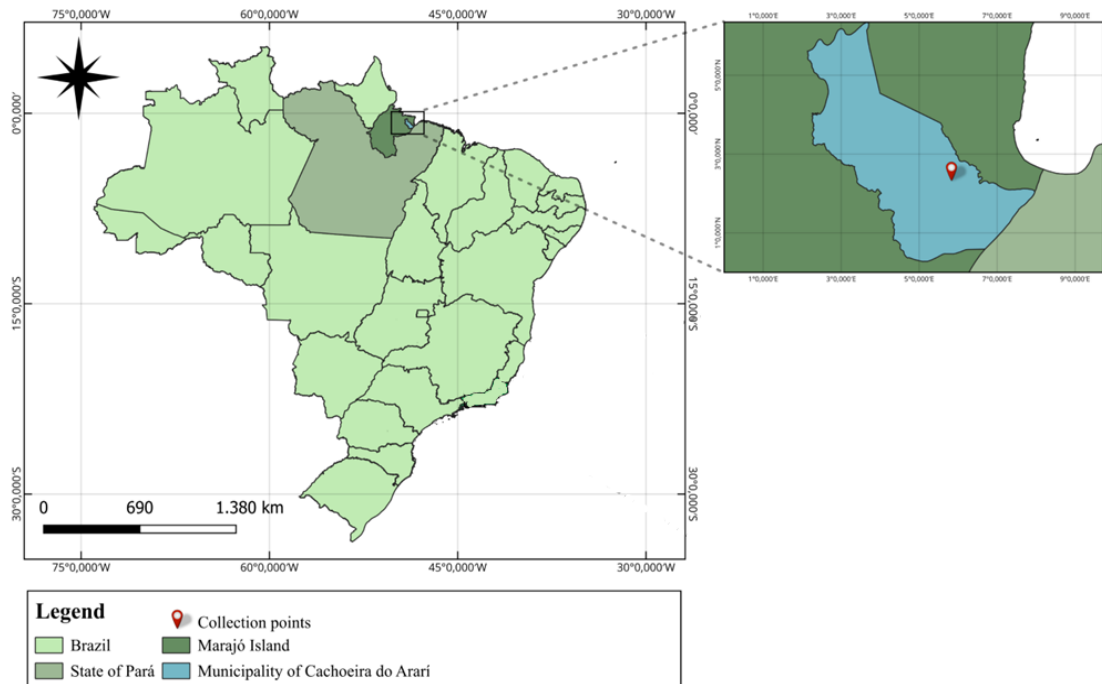
93 O Comitê de Ética Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia aprovou este  
94 experimento, Protocolo nº 6612040821 (CEUA) e 636-202 (UFRA). O projeto também foi  
95 cadastrado através do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Governo Federal, no  
96 Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado  
97 com número de cadastro A144BC3.

98

### 99 **Local de coleta**

100 As amostras foram colhidas em maio, no período chuvoso, em uma propriedade localizada  
101 no Arquipélago do Marajó, no município de Cachoeira do Arari (Figura 1), estado do Pará-  
102 Brasil.

103



104

105 **Figura 1.** Localização da fazenda onde foram realizadas as coletas, no município de Cachoeira  
 106 do Arari- Arquipélago do Marajó, Pará-Brasil.

107

### 108 **Colheita de amostras**

109 O rebanho da propriedade é composto por 120 búfalas mestiças das raças Murrah e  
 110 Mediterrâneo, os animais permanecem no mesmo piquete independentemente da idade, sendo  
 111 ordenhados duas vezes ao dia (às 4 horas da manhã e às 16 horas da tarde), a média de produção  
 112 por animal, por dia varia de 6 a 10 litros de leite. Os bezerros permanecem com a mãe por duas  
 113 horas após a ordenha e mamam o leite de apoio.

114 Para a colheita de material o delineamento experimental adotado foi inteiramente  
 115 casualizado. No total, foram colhidas 18 amostras, sendo: seis amostras de leite e seis de fezes  
 116 de búfalas saudáveis e seis amostras de saliva de seus filhotes. Os animais foram selecionados  
 117 seguindo os seguintes critérios: i. Búfalas divididas em dois grupos: 1ª Lactação (n=3) e 3ª  
 118 Lactação (n=3): ii. Animais com grupamentos genéticos similares; iii. Animais no mesmo  
 119 estágio da lactação; e iv. Animais submetidos ao mesmo manejo geral, nutricional e condições  
 120 de ordenha.

121 Foram realizados nos animais o exame clínico da glândula mamária (Grunert, 1993;  
 122 Radostits et al., 2009), o exame macroscópico da secreção láctea, por meio do teste da caneca  
 123 de fundo escuro (Grunert, 1993) e o *California Mastitis Test* (Schalm e Noorlander, 1957).

124 A colheita das amostras de leite foi realizada após criteriosa antissepsia do óstio do teto com  
125 algodão embebido em álcool a 70%; os três primeiros jatos de leite foram dispensados e em  
126 seguida foram colhidos 5 mL de leite em tubos Falcon estéreis, as fezes foram colhidas por  
127 excreção espontânea e acondicionadas em tubos de coleta estéreis. As amostras de saliva dos  
128 bezerros foram colhidas através da estimulação da produção salivar, sendo realizada com o  
129 auxílio de uma seringa, e em seguida acondicionadas em tubos Falcon estéreis. Para a  
130 amostragem de solo, foi colhida uma amostra composta representando o piquete em que os  
131 animais do estudo se encontravam, em seguida foram armazenadas em sacos de plástico  
132 estéreis.

133 As amostras foram colocadas sob refrigeração em caixa de material isotérmico contendo  
134 gelo reutilizável e levadas ao Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia  
135 (CVACBA) para realização da extração de DNA.

136 Amostras de leite também foram colhidas em tubos contendo o conservante bronopol e  
137 foram enviadas para o Instituto Clínica do Leite e analisadas, para determinação da CCS-  
138 contagem de células somáticas (x1000/mL) pelo método de citometria de fluxo - PO ANA  
139 001:05. Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

140

#### 141 **Extração de DNA e sequenciamento de genes 16S rRNA**

142 Para a extração de DNA do leite, as amostras dos quatro quartos mamários foram unidas  
143 formando uma única amostra composta por animal. A gordura foi removida segundo (16). O  
144 DNA foi extraído utilizando o kit PureLink™. Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen,  
145 Carlsbad, CA, USA). seguindo o manual do fabricante para extração de DNA de saliva (para  
146 saliva e leite), solo e fezes. As amostras de DNA foram quantificadas em fluorímetro Qubit 4.0  
147 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para determinação da pureza e concentração, e por  
148 fim, foram armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A preparação da biblioteca foi realizada de acordo com o  
149 protocolo *Illumina Metagenomic Sequencing* com padrões estabelecidos. Os primers utilizados  
150 foram direcionados à região V4 do rRNA 16S: 515F  
151 (5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA  
152 3') e 806R  
153 (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTW  
154 TCTAAT 3'). Foram realizadas duas PCR, sendo a primeira para amplificação da região, e a  
155 segunda para indexação dos fragmentos gerados. O programa de ciclo utilizado foi:  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  
156 30 s,  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 s, seguindo a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min (repetidos 25 ciclos para primeira PCR e 8  
157 ciclos para segunda),  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 s e foram mantidos ao final a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O volume final da reação

158 de PCR foi de 20  $\mu$ L, contendo 6  $\mu$ L de DNA (12 ng/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de cada primer, 10  $\mu$ L de Phusion  
159 Master Mix.

160

### 161 **Data analysis**

162 Os arquivos de dados obtidos foram importados e processados no ambiente do software R  
163 v4.0.3 (R Development Core Team, 2016). As sequências brutas foram submetidas ao pacote  
164 Divisive Amplicon Denoising Algorithm v3.16 (DADA2) (Callahan et al., 2016). Onde as  
165 qualidades das leituras foram visualizadas e tratadas primeiramente usando as funções do  
166 pacote Dada2, descartando bases com escores de baixa qualidade usando os parâmetros  
167 (truncLen=c (248,248), maxN=0, maxEE=c (3,4), truncQ=2, rm.phix=TRUE,  
168 compress=TRUE, multithread=FALSE). As leituras foram posteriormente mescladas e as  
169 sequências quimera foram removidas. A afiliação taxonômica foi realizada através do método  
170 Amplicon Sequence Variants (ASV) utilizando o banco de dados SILVA (Silva\_nr\_v128)  
171 (McMurdie et al., 2013). Todas as análises de diversidade alfa e beta foram realizadas utilizando  
172 o R v.4.3.1 com os pacotes phyloseq v1.22.3 (Oksanen et al., 2018) e Vegan v2.6-4 (Chi et al.,  
173 2019). As diferenças estatísticas entre a diversidade alfa da população foram testadas usando  
174 Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) e Kruskal-Wallis. As  
175 análises de diversidade beta foram realizadas normalizando os dados para as abundâncias  
176 relativas, removendo táxons não observados em pelo menos 1% das amostras e aglomerando  
177 táxons até o nível de filo. Cálculos de Distâncias Bray-Curtis, Unifrac e Unifrac ponderada  
178 também foram realizados. Os demais gráficos como heatmap e curva de rarefação foram feitas  
179 utilizando os parâmetros padrão do pacote para filo, família e classe.

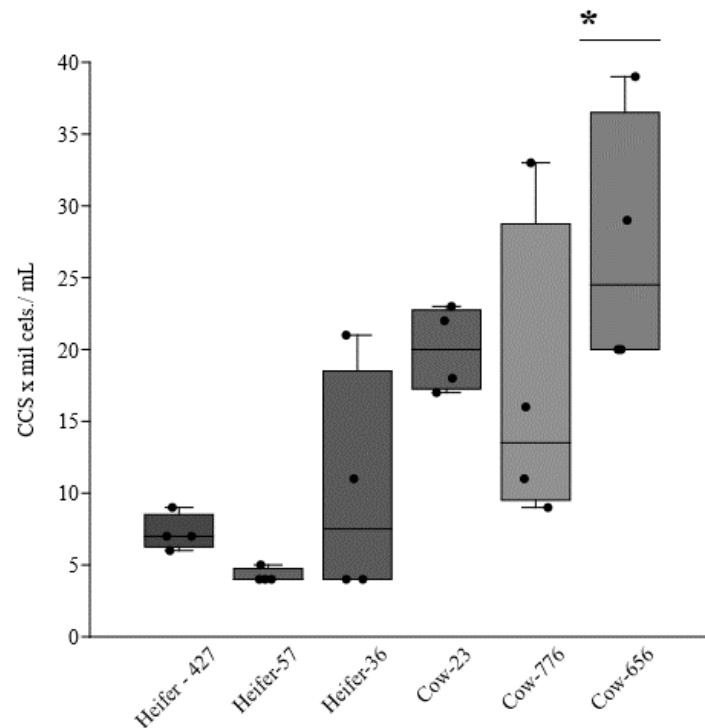
180 Para a análise das famílias microbianas compartilhadas foi utilizado os pacotes phyloseq,  
181 VennDiagram, e RColorBrewer no ambiente RStudio. Os dados de sequenciamento foram  
182 processados e agrupados utilizando o pacote Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013), a nível  
183 taxonômico de Filo, Família e Ordem. Em seguida, a função get\_vennlist do pacote  
184 MicrobiotaProcess foi empregada para criar listas de famílias presentes em cada grupo amostral  
185 (Fezes, Leite e Saliva). Para a visualização das interseções entre diferentes grupos amostrais,  
186 utilizamos o pacote VennDiagram (Chen and Boutros, 2011).

## 187 **3 Resultados**

### 188 **Exames clínicos**

189 Ao exame macroscópico da secreção láctea e ao *California Mastitis Test* nenhuma amostra  
190 de leite se mostrou reagente, apresentando contagem de células somáticas com diferença

191 significativa entre os diferentes grupos analisados (ANOVA,  $F=5,461$   $p\text{-value}=0,001$ ),  
 192 observando diferença entre Cow-656 com Heifer-427 (Tukey;  $p\text{-value}= 0,018$ ); Cow-656 com  
 193 Heifer-57 (Tukey;  $p\text{-value}= 0,006$ ); Cow-656 com Heifer-36 (Tukey;  $p\text{-value}= 0,049$ ), como  
 194 mostra a **Figura 2**.



195

196 **Figura 2.** Contagem de células somáticas do leite de vacas e novilhas. (•) indicam a  
 197 distribuição dos valores CCS do leite por quarto mamário de cada animal avaliado. (—) aponta  
 198 a média de valores de CCS por animal. \* $p\text{-value} < 0,05$ .

199

## 200 Diversidades Alfa e beta

201 Um total de 2.743.330 sequências brutas do gene 16S rRNA foram analisadas. Após  
 202 avaliação de qualidade e recorte, o número médio de sequências por amostra foi de 20.003. O  
 203 maior número de sequências por amostra foi observado nas amostras 427-L e 036-L com mais  
 204 de 30.000 e as demais ficaram entre 16.000 e 27.000 leituras. Um total de 3882 ASVs foram  
 205 obtidas e comparadas no banco de dados SILVA para atribuições taxonômicas (**Tabela Sup.**  
 206 **1**).

207 Os resultados da diversidade alfa para exposição da riqueza (Observado), diversidade  
 208 (Shannon) e Simpson estão demonstrados na **Tabela Sup. 1**. Foi demonstrado pela métrica  
 209 observado que a saliva apresentou maior riqueza de espécies em comparação com as amostras  
 210 de fezes e de leite. Os índices de Shannon, verificados na matriz saliva, variaram de 4,59 a 4,  
 211 97 enquanto as demais amostras mostraram uma variação de 4,18 a 4,50 para fezes e de 3,43 a



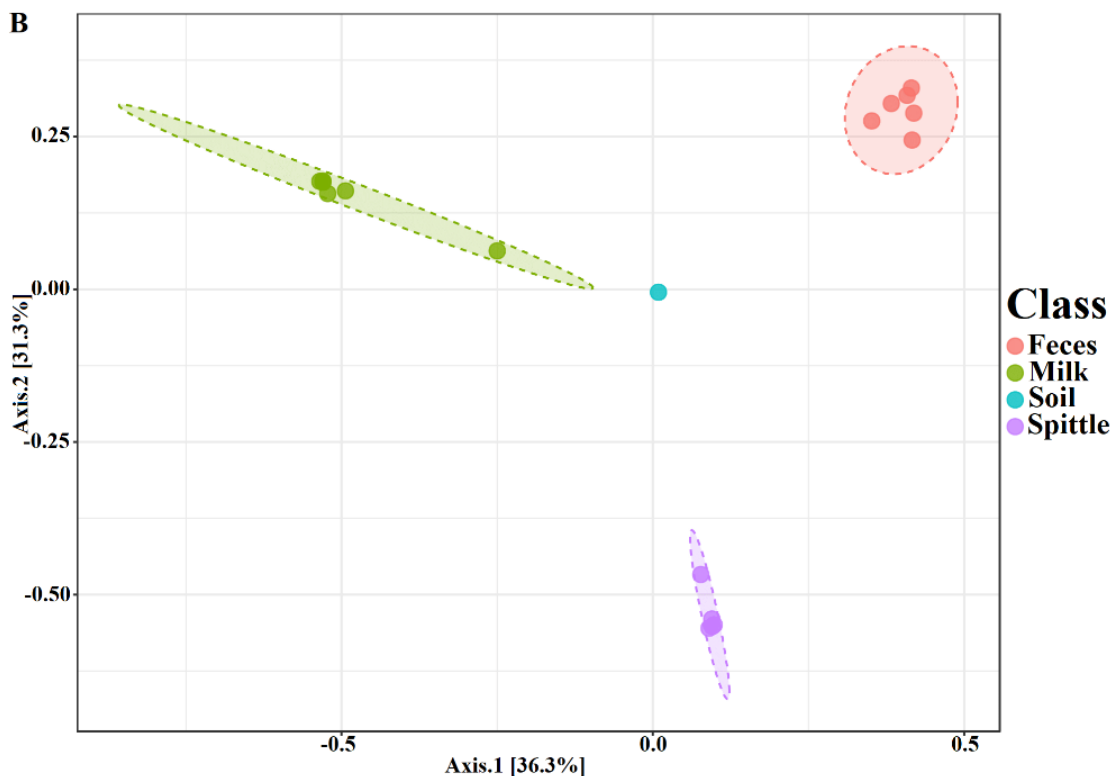
212 3,88 para leite, demonstrando o índice de diversidade de espécies nas diferentes amostras  
 213 estudadas. Já o índice de Simpson mostrou valores perto de 1, o que indicaria que não existiria  
 214 comunidades bacterianas dominantes nas amostras.

215 A curva de rarefação mostrou uma tendência diferente dependendo da matriz da amostra.  
 216 No presente estudo, a amostra de saliva apresentou maior riqueza, seguida de fezes e leite,  
 217 respectivamente, que se comportaram de forma parecida. Todas as curvas de rarefação  
 218 atingiram um platô, independentemente do número de leituras por amostra (**Figura Sup. 2**).

219 A análise de similaridade entre as matrizes estudadas e a análise de componentes principais  
 220 utilizando a métrica de Unifrac, que leva em conta os táxons e sua abundância, mostrou uma  
 221 diferença entre elas, identificando clusters distintos com base no perfil do microbioma. Os  
 222 microbiomas das amostras não se agruparam, apresentando distância de uma matriz para as  
 223 outras (**Figura 3**), estes resultados indicam que a estrutura das comunidades, tanto filogenética  
 224 quanto ecológica se mostraram distintas entre a classe de fezes e os demais.

225

226



227

228 **Figura 3.** Demonstração gráfica da beta diversidade através da análise de componentes  
 229 principais (PcoA), calculada pela matriz de abundância de táxons provenientes das amostras  
 230 fezes e leite de búfalas de primeira e terceira lactação, saliva de seus bezerros e solo. O modelo  
 231 de plotagem explica 67,6% da variância total dos dados.

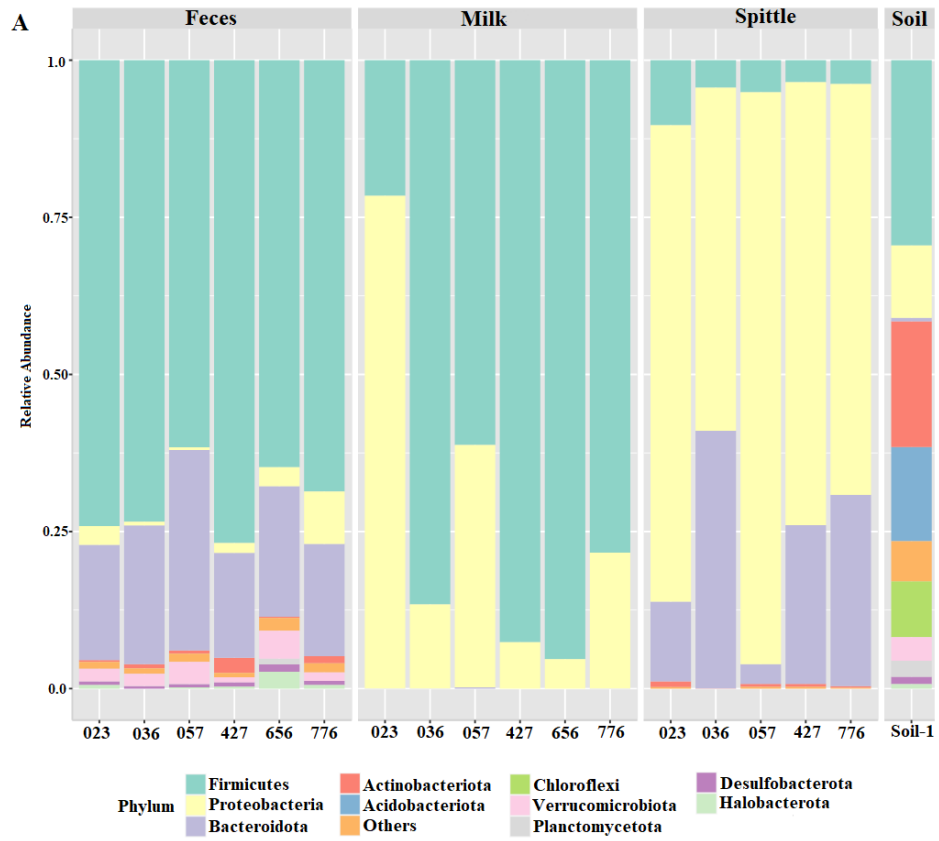
232

**233 Composição taxonômica das comunidades microbianas**

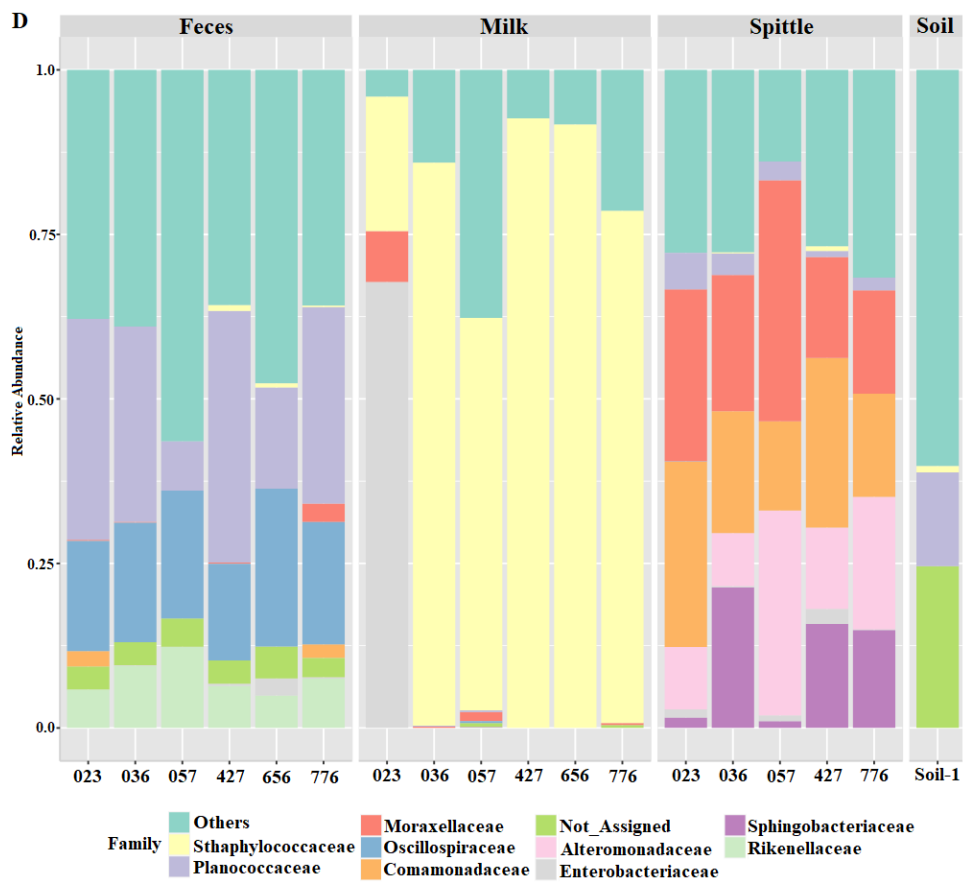
234 No total 35 filos, 79 classes, 148 ordens e 208 famílias foram descritos a partir do conjunto  
235 de dados estudados. Os filos mais abundantes observados foram Firmicutes, Proteobacteria,  
236 Bacteroidota e Actinobacteriota (**Figura 4-A**). Firmicutes e Bacteroidota nas amostras de fezes;  
237 Firmicutes e Proteobacteria nas amostras de leite e Bacteroidota e Proteobacteria nas amostras  
238 de saliva. A amostra de solo avaliada teve como filos mais abundantes Firmicutes e  
239 Actinobacteriota. Assim, foi observada uma mudança na composição bacteriana entre todas as  
240 matrizes estudadas. Em relação às classes bacterianas, *Bacili*, *Gammaproteobacteria*,  
241 *Clostridia* e *Bacteroidia* foram as mais abundantes. A classe das *Clostridias* prevaleceu nas  
242 amostras de fezes, enquanto a classe *Bacilli* foi mais prevalente em leite e solo, e na saliva as  
243 *Gammaproteobacterias* se destacaram. Os táxons bacterianos mais abundantes estavam  
244 afiliados às ordens *Staphylococcales*, *Bacilales*, *Oscillospirales*, *Enterobacteralles*,  
245 *Burkholderiales* e *Pseudomonadales*, sendo: *Oscillospirales* e *Bacilales*, mais prevalentes em  
246 fezes; *Staphylococcales* e *Burkholderiales*, no leite; *Pseudomonadales* e *Burkholderiales*, na  
247 saliva respectivamente. A **Figura 4-B** mostra que a predominância da família *Planococcaceae*  
248 nas amostras fecais; na maioria das amostras de leite *Staphylococcaceae* foi mais abundante, e  
249 apenas em uma das amostras de leite prevaleceu *Enterobacteriaceae*; já as amostras de saliva  
250 apresentaram maior abundância de bactérias da família *Moraxelaceae*. Com relação aos  
251 gêneros, *Ruminococcaceae*, *Rheinheimera* e *Kurthia* foram os mais evidentes nas amostras de  
252 fezes; *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* foram os mais observados nas amostras de  
253 leite, além disso também se observou discreta presença do gênero *Ruminococcaceae*; já nas  
254 amostras de saliva *Acinetobacter*, *Chishuiella*, *Rheinheimera* foram os gêneros mais aparentes.

255

256



257



258

259

260

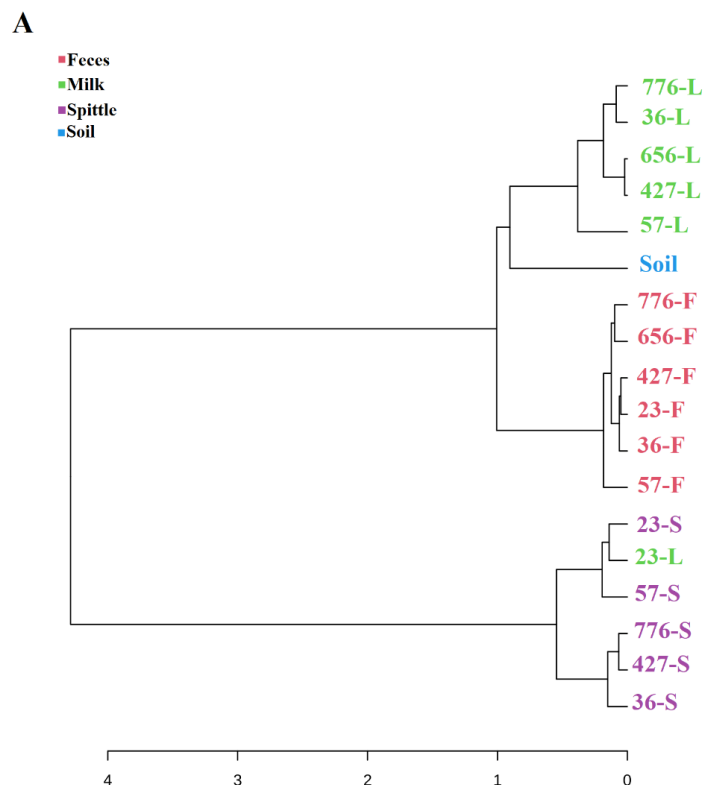
**Figura 4.** Barplots mostrando a abundância relativa de leituras de amplicon do gene 16S rRNA atribuídas ao nível do filo (A) e família (B), das amostras de fezes e leite de animais de

261 primeira e terceira lactações, saliva de seus respectivos bezerros e o solo onde estavam  
 262 inseridos. \*ASVs não classificados foram mostrados como “Not\_Assigned”. Os 11 táxons mais  
 263 representativos foram apresentados nas legendas.

264 Usando análise de agrupamento por similaridade de composição, observou-se dois clusters  
 265 distintos, sendo um com três subgrupos, onde agruparam-se grande parte das amostras de leite  
 266 no primeiro deles, no segundo a amostra de solo e no terceiro todas as amostras de fezes. Outro  
 267 cluster agruparam-se todas as amostras de saliva e uma amostra de leite (23-L) (**Figura 5-A**).

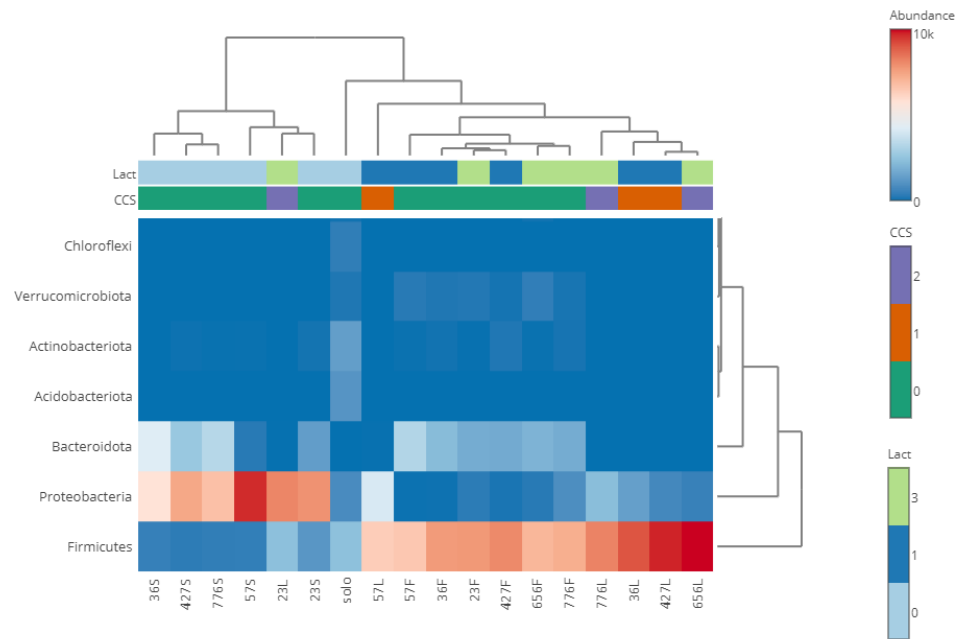
268 O *heatmap* permite observar a diferença na abundância de filos entre as matrizes estudadas  
 269 através da intensidade de cores. Onde o filo firmicutes foi o mais abundante na maioria das  
 270 amostras de leite e fezes podendo estar relacionado a maior abundância observada dos gêneros  
 271 *Staphylococcus* (leite) e *Rumminococcacea* (fezes) respectivamente. Proteobactéria foi mais  
 272 abundante em todas as amostras de saliva e em uma das amostras de leite, podendo estar  
 273 associado a maior abundância dos gêneros *Acinetobacter* e *Rheinheimeria* nas amostras de saliva  
 274 e *Burkholderia* na amostra de leite (**Figura 5-B**).

275



276

277

**B**

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

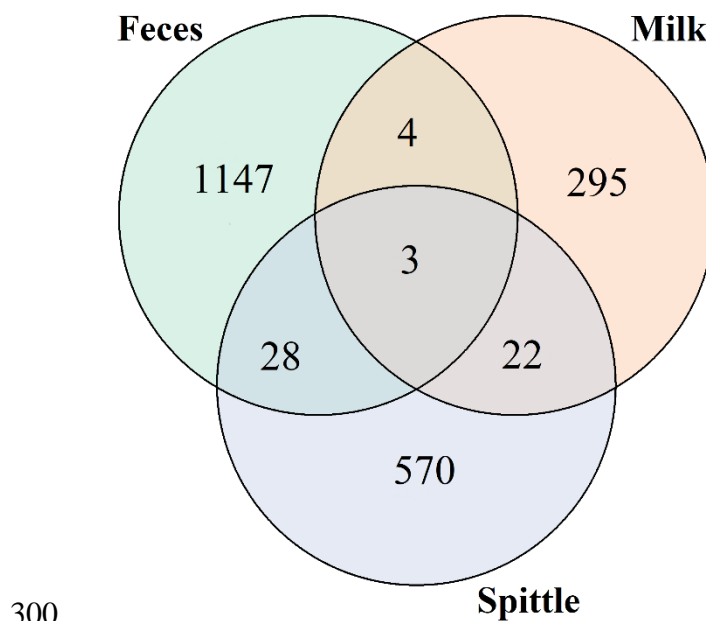
298

299

**Figura 5.** (A) Dendrograma baseado no agrupamento hierárquico métrico da abundância relativa de ASVs para cada tipo de amostra analisada (fezes, leite, saliva e solo). (B) *Heatmap* demonstrando a abundância relativa de filões de acordo com a matriz da amostra e classificações: CCS e Lact. \*Lact- *number of lactations*; \*\*CCS-*Somatic Cell Count*.

Para descrever a composição geral do microbioma das matrizes de leite, fezes e saliva de búfalos, utilizamos os dados da taxonomia das ASVs para construir o diagrama de Venn (**Figura 6**). Esta análise revelou a presença de 3.511 ASVs, obtidas a partir das amostras estudadas. Das ASVs que estão presentes individualmente em cada matriz, estão 1.147 de fezes, sendo predominantemente do filo Firmicutes (54,4%) seguido de Bacteroidetes (27,29%), Verrucomicrobia (3,75%), Proteobacteria (2,79%), Actinobacteria (2,01%) e outros (9,76%); 270 ASV's provenientes das amostras de leite, compostas dos filões Proteobacteria (60,68%), Firmicutes (34,92%), Actinobacteria (2,03%), Bacteroidetes (1,69%) e Cloroflexi (0,34%) e outros (0,34%); e as ASVs das amostras de saliva, nas quais predominantemente foi encontrado o filo Proteobacteria (56,49%), seguido de Bacteroidetes (27,89%), Firmicutes (12,46%) e Actinobacteria (2,11%), Outros (0,7%) e Deinococcus-Thermus (0,35%).

Quando o compartilhamento entre matrizes é avaliado, pode-se observar a presença de três ASV's compartilhadas entre todas elas; quatro compartilhadas entre fezes e leite, pertencentes aos filões Firmicutes e Proteobactéria; 22 entre leite e saliva, pertencentes apenas ao filo Proteobacteria e 28 entre fezes e saliva pertencentes aos filões Proteobacteria e Firmicutes.



300

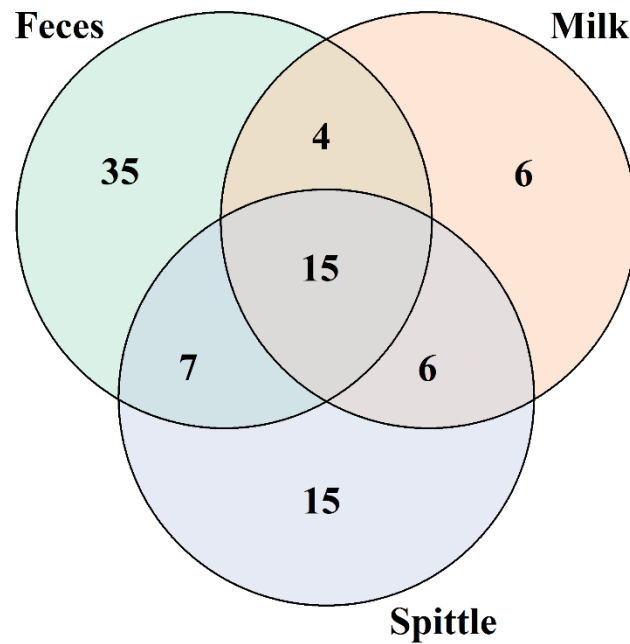
Spittle

301 **Figura 6.** Diagrama de Venn mostrando o número de ASVs individuais em cada matriz e  
 302 compartilhadas provenientes da análise dos microbiomas de fezes e leite de búfalas, e saliva  
 303 dos seus respectivos bezerros.

304

305 A partir das abundâncias relativas encontradas na análise de alfa diversidade, foi realizado  
 306 um diagrama de Venn com a finalidade de demonstrar os resultados de compartilhamento de  
 307 taxóns com maior profundidade, a nível familiar. Observou-se então como demonstrado na  
 308 **Figura 7**, o compartilhamento de 15 famílias entre as três matrizes, sendo elas  
 309 *Staphylococcaceae*, *Planococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Ruminococcaceae*,  
 310 *Pseudomonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Xanthomonadaceae*,  
 311 *Porphyromonadaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Caulobacteraceae*,  
 312 *Micrococcaceae* e *Rhodobacteraceae*. Quando se avalia o compartilhamento entre apenas duas  
 313 das matrizes observa-se, entre leite e saliva: *Burkholderiaceae*, *Aeromonadaceae*,  
 314 *Sphingobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Oxalobacteraceae* e *Propionibacteriaceae*. Entre leite  
 315 e fezes: *Christensenellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Methylobacteriaceae* e *Paenibacillaceae*. Entre  
 316 fezes e saliva: *Comamonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Microbacteriaceae*,  
 317 *Campylobacteraceae*, *Rhizobiaceae* e Family\_XI.

318



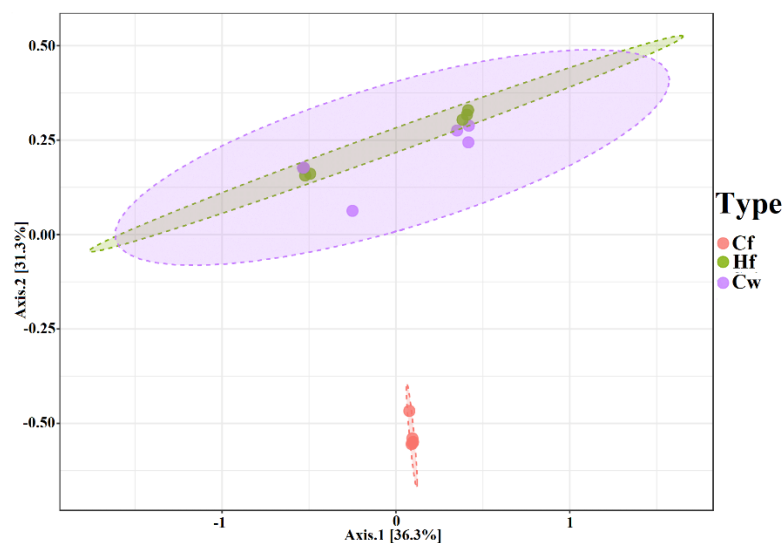
319

320 **Figura 7.** Diagramas de Venn demonstrando a nível familiar o compartilhamento entre as  
 321 matrizes através da alfa diversidade.

322

323 A análise das amostras biológicas das búfalas, resultou no agrupamento de todas as amostras  
 324 de leite, tanto de novilhas de primeira lactação (Hf), quanto de vacas de terceira lactação (Cw).  
 325 Este resultado demonstra que, apesar da diferença significativa entre a contagem células  
 326 somáticas nos animais jovens e adultos, quando observada a similaridade e análise de  
 327 componentes principais, elas se mostram agrupadas. O mesmo comportamento foi observado  
 328 entre as amostras de fezes desses animais, e saliva de seus bezerros (**Figura 8**).

329



330

331

332 **Figura 8.** Demonstração gráfica das análises de beta diversidade – Unifrac ponderado das

333 amostras de leite e fezes de búfalas de primeira (Hf) e terceira lactação (Cw) e saliva seus  
334 bezerros (Cf).

335 Desse modo, a contagem de células somáticas associadas com os índices de diversidade  
336 alfa foi identificada valores de correlação de Pearson de até -0,56. O que poderia indicar uma  
337 Correlação inversamente proporcional entre a os índices de diversidade alfa e a contagem de  
338 células somáticas (**Figura Sup.3**).

### 339 **Discussão**

340 A CCS é um importante indicador de qualidade do leite, bem como da saúde do úbere. O  
341 método de citometria de fluxo, nesta análise, se destaca por ser preciso e apresentar alta  
342 reprodutividade na contagem das células, sendo padronizado por organizações internacionais  
343 de produtos lácteos (Catozzi et al., 2017). Estudos anteriores realizados na espécie bubalina  
344 mostraram que uma glândula mamária saudável libera com o leite até 200.000 cels/mL  
345 (Mesquita et al., 2017), o que corrobora com o presente estudo onde as novilhas apresentaram  
346 entre 7.000 e 21.000 cels/mL e as vacas entre 9.000 e 39.000 cels/mL, refletindo a saúde dos  
347 quartos mamários desses animais. Foi observada no presente estudo uma tendência significativa  
348 de aumento na contagem de células somáticas à medida que as vacas envelhecem. Sugerindo  
349 que este fato esteja atribuído em parte, à exposição a microrganismos ao longo de sua vida,  
350 estimulando seu sistema imune e modulando o microbioma local, destacando assim a  
351 importância de se considerar a idade e histórico clínico ao avaliar a qualidade do leite e a saúde  
352 do úbere bubalino (Catozzi et al., 2020).

353 No presente estudo foi investigado o microbioma do leite de búfala, da saliva do bezerro e  
354 do ambiente utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA. Por ter alto rendimento, o  
355 sequenciamento 16S rRNA tem sido uma ferramenta bastante utilizada, substituindo  
356 abordagens como a cultura de microrganismos, se tornando técnica de eleição para pesquisas  
357 de estrutura e diversidade de comunidades bacterianas (Yang et al., 2024). Mesmo com o  
358 aumento da visibilidade da produção bubalina, estudos já realizados analisaram o metaboloma  
359 do leite de búfala (Salzano et al., 2020) e o comportamento do microbioma durante a mastite  
360 (Catozzi et al., 2020), mas apenas um estudo foi realizado com a finalidade de se investigar  
361 detalhadamente o microbioma do leite de búfala (Luziatelli et al., 2023). Até onde sabemos,  
362 nenhum estudo de ecologia microbiana no conjunto de leite, fezes e saliva de bezerros foi  
363 realizado em búfalas da região do Arquipélago do Marajó, nem em outras regiões do Brasil.

364 Neste trabalho um platô foi observado na curva de rarefação, indicando que uma alta  
365 cobertura da diversidade de espécies presentes nas amostras foi capturada pelo sequenciamento,



366 o que também foi observado em estudos já publicados onde, ao aumentar a profundidade do  
367 sequenciamento, o número de ASVs ou a quantidade de espécies ali detectadas também  
368 aumenta, levando a esse platô (Chi et al., 2019).

369 O solo apresentou maior diversidade taxonômica microbiana do que as demais matrizes  
370 analisadas, o que se fundamenta por ser a matriz que abriga o microbioma bastante heterogêneo,  
371 podendo ter mais de 50.000 espécies por grama (Fierer et al., 2017; Banerjee et al., 2023). A  
372 interação entre o microbioma do solo e o microbioma intestinal dos animais é comprovada e  
373 estimativas sugerem que até 3% do microbioma ruminal de ovinos e bovinos pode ser  
374 contribuído pelo solo ingerido (Liddicoat et al., 2019). Os búfalos, como os bovinos, também  
375 são animais de baixo senso epicrítico, o que ocasiona acidentalmente a ingestão de solo em sua  
376 alimentação, e que pode estar relacionado com o compartilhamento de ASVs entre solo e as  
377 demais matrizes.

378 Os resultados mostram que *Staphylococcaceae* é a principal família do filo Firmicutes  
379 presente nas amostras de leite, que engloba componentes comuns do microbioma do leite e da  
380 pele dos mamíferos. Em seguida, vieram as famílias *Enterobacteriaceae* e *Moraxellaceae* que  
381 pertencem ao filo Proteobacteria. O presente estudo está em concordância com estudos  
382 anteriores (Catozzi et al., 2017; Salmann et al., 2023) que observaram resultados semelhantes  
383 a nível de filo e a nível de família (Catozzi et al., 2017), onde identificaram maior frequência  
384 das famílias *Staphylococcaceae* e *Moraxellaceae* em amostras de leite de animais saudáveis.  
385 Foi demonstrado que a abundância desses filos específicos em vacas, varia com a sazonalidade  
386 e efeito positivo de maior umidade e temperatura (Celano et al., 2022), o que pode estar  
387 diretamente relacionado com a abundância deles na amostragem utilizada no presente estudo,  
388 levando em consideração o clima quente e úmido, que ocorre no bioma Amazônico. Apesar de  
389 descrita em leite de búfalas saudáveis, a família *Moraxellaceae* foi citada em outro trabalho por  
390 incluir bactérias psicrófilas, que podem se apresentar no ambiente, sendo algumas  
391 conhecidas por sua capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies (Maes et al., 2019)  
392 e consequentemente causar alterações nas propriedades do leite. Não obstante, foram  
393 encontradas divergências com outros trabalhos já publicados a nível familiar, onde os autores  
394 encontraram como principais famílias *Corynebacteriaceae* e *Lactobacillaceae* (Luziatelli et al.,  
395 2023) e *Aerococcaceae* e *Corynebacteriaceae* (Catozzi et al., 2019) respectivamente. Essas  
396 variações, portanto, podem estar relacionadas a diferentes condições de gestão da propriedade,  
397 principalmente nas práticas de produção leiteira e das consequências na composição do leite,  
398 sendo que na fazenda estudada neste trabalho são adotadas práticas mais rústicas em  
399 comparação as propriedades avaliadas em outros trabalhos.

400 A análise de composição taxonômica identificou uma abundância inesperada de  
401 *Enterobacteriaceae* em uma das amostras de leite provenientes de um animal aparentemente  
402 sadio. Estudos anteriores revelaram que gêneros como *Enterococcus*, *Klebsiella* e a espécie  
403 *Escherichia coli*, que pertencem a esta família, estão relacionados com mastite subclínica  
404 (Catozzi et al., 2017), mostrando que a análise de sequenciamento viabiliza informações sobre  
405 a qualidade microbiológica do leite e estado de saúde dos animais.

406 No microbioma fecal de búfalas, a família das *Planococcaceae* é a mais abundante seguida  
407 da *Oscillospiraceae*. Ambas as famílias pertencem ao filo Firmicutes. No entanto, estudos  
408 realizados anteriormente verificaram que, apesar Firmicutes ser o filo mais abundante, em se  
409 falando de família teve a maior abundância observada de *Ruminococcaceae* e *Bacteroidaceae*  
410 (Nguyen et al., 2020). Em um estudo realizado com búfalas (Sharma et al., 2021), as famílias  
411 mais abundantes encontradas em suas fezes foram: *Muribaculaceae* e *Christensenellaceae*,  
412 quando avaliados os animais durante o estro, e *Bacillaceae* e *Peptomiphilaceae* encontradas em  
413 maior abundância no diestro e no proestro, respectivamente. Estudos demonstram a microbiota  
414 intestinal como um importante fator na fisiologia do hospedeiro, uma vez que inúmeros  
415 processos fisiológicos e patológicos estão ligados a ela (Pluznick et al., 2014).

416 Em bezerros, o microbioma da saliva desempenha um papel fundamental no  
417 desenvolvimento do trato gastrointestinal, na digestão de alimentos, na proteção frente a  
418 patógenos, e no fortalecimento do sistema imunológico. A composição do microbioma varia de  
419 acordo com a dieta, idade, condições de criação e saúde dos animais (Mojahedi et al., 2018).  
420 Quando abordamos as famílias mais presentes nas amostras de saliva dos bezerros, pudemos  
421 observar *Moraxellaceae* e *Commamonadaceae*, ambas pertencentes ao filo de Proteobacteria  
422 que foi o mais abundantemente observado. Ao se estudar o microbioma da saliva humana de  
423 pacientes sadios, foi encontrada predominância do filo Proteobacteria, corroborando com o  
424 presente estudo (Soriano-Lerma et al., 2020). No que se refere à família, *Moraxellaceae*  
425 envolve bactérias anteriormente descritas no leite de animais saudáveis e microrganismos  
426 presentes no solo e na água (Luziatelli et al., 2023). Já a família *Commamonadaceae* teve sua  
427 ocorrência registrada como parte do trato respiratório de primatas (Facioli et al., 2020).

428 Ao avaliarmos o compartilhamento da microbiota não cultivável de amostras de leite, saliva  
429 e fezes, observa-se a nível familiar um total de 15 famílias, sendo que duas delas são  
430 especificamente de abundância elevada nas amostras de leite: *Staphylococcaceae*,  
431 *Enterobacteriaceae*, que como dito anteriormente englobam microrganismos comumente  
432 encontrados no microbioma do leite de diversas espécies. *Moraxellaceae* por sua vez é uma  
433 família de abundância elevada em leite e saliva fortalecendo a ideia de uma influente troca de

434 microrganismos entre a búfala e seu bezerro, através do aleitamento. *Planococcaceae* foi  
435 compartilhada entre as três matrizes, mas têm sua abundância observada nas fezes, família  
436 quem teve o aumento em abundância correlacionada positivamente com a disbiose provocada  
437 pela inflamação gastrointestinal causada por *Mycobacterium*  
438 *avium* subsp. *paratuberculosis* em bezerros (Derakhshani et al., 2016) e em vacas secas  
439 (Elmagzoub et al., 2024).

440 Quando analisadas as famílias compartilhadas apenas entre leite e fezes de búfalas  
441 *Christensenellaceae* e *Paenibacillaceae* (pertencentes ao filo Firmicutes), *Alcaligenaceae* e  
442 *Methylobacteriaceae* (pertencentes ao filo Proteobacteria) foram identificadas. Destas, a  
443 família *Christensenellaceae* se destaca por possuir alguns gêneros capazes de produzir uma  
444 ampla gama de metabólitos probióticos e ácidos biliares secundários, trazendo benefícios a  
445 microbiota ruminal e melhorando a fermentação alimentar destes animais (Wei et al., 2022),  
446 corroborando com Youg et al. (2015) que identificou uma rota de compartilhamento de  
447 microrganismos entre o sistema gastrointestinal e a glândula mamária de vacas bovinas através  
448 da corrente sanguínea. Em pesquisa realizada por Derakhshani et al. (2018) *Alcaligenaceae*  
449 teve seu aumento no colostro de vacas bovinas relacionado com a diminuição dos índices de  
450 riqueza e diversidade, sugerindo uma possível disbiose nestes animais.

451 Foi observado um compartilhamento de seis famílias entre as amostras de leite das búfalas  
452 e saliva de seus bezerros, estudos preliminares indicam que a microbiota de bezerros é  
453 influenciada pelo tipo de contato, prolongado ou não, entre mãe e filho, acarretando o  
454 compartilhamento vertical de microrganismos através da ingestão do leite (Wenker et al., 2022).  
455 Das famílias compartilhadas, *Burkholderiaceae*, *Oxalobacteraceae* e *Propionibacteriaceae*  
456 foram descritas compondo o microbioma do leite bovino (AoDaohu et al., 2024). Entretanto  
457 Gathinji et al. (2023) descreveu a relação da abundância destas famílias a níveis mais elevados  
458 de ácidos graxos não esterificados, hepatoglobina e aspartato transaminase no plasma do sangue  
459 de vacas leiteiras e sugeriu que esta abundância estaria relacionada ao estresse metabólico  
460 causado pelo período de transição da gestação para a lactação nestes animais. A família  
461 *Sphingobacteriaceae* foi descrita recentemente com seu aumento normal na saliva de bezerros  
462 bovinos com 78 a 90 dias de vida (Amin et al., 2021), sendo relacionada a mudanças alimentares  
463 do início do desmame, o que pode também estar ocorrendo com os bezerros bubalinos do  
464 presente estudo, já que estão com 60-75 dias de vida e iniciaram a alimentação mista de  
465 forragem livre, além da ingestão do leite de apoio.

466 Quando examinadas as famílias compartilhadas entre saliva e fezes, é observada a família  
467 *Comamonadaceae* que foi a mais abundante presente nas amostras de saliva avaliadas neste

468 trabalho. Sabe-se que os búfalos ao se alimentarem de forragem, ingerem acidentalmente o solo  
469 e o que está contido nele, e por consequência são encontrados microrganismos de fezes  
470 coabitando a saliva destes animais, como alguns representantes da família *Bacteroidaceae*  
471 descrita com abundância de 6% no microbioma de fezes bovinas em estudo realizado por  
472 (AoDaohu et al., 2024). *Rhizobiaceae* por sua vez, está relacionada a plantas, não sendo  
473 comensal de animais, mas relaciona-se principalmente as forragens ingeridas por eles, tendo  
474 sua presença nas fezes e saliva, concomitantemente. Amin et al. (2021) descreveu abundância  
475 de *Clostridiaceae* na microbiota pós-desmame de líquido ruminal de bezerros bovinos,  
476 correlacionada a ingestão de forragens e forragens mistas.

477 As informações obtidas de estudos a respeito do microbioma relacionado a esses animais  
478 são essenciais para entender melhor a importância no bem-estar das búfalas e seus bezerros,  
479 além de fornecer um entendimento valioso para o desenvolvimento de estratégias de manejo e  
480 intervenções, que promovam a existência de um microbioma saudável nesses animais.

481

## 482 **Conclusão**

483 Apesar da contagem de células somáticas do leite apresentar diferenças significativas entre  
484 novilhas e vacas, os microbiomas, tanto do leite quanto das fezes, mostraram semelhança entre  
485 animais de diferentes idades.

486 As amostras estudadas mostraram padrão de agrupamento matriz-semelhante.

487 Foi possível observar o compartilhamento de famílias no microbioma do leite e das fezes  
488 búfalas e saliva de seus bezerros, fortalecendo a ideia de interação de microbiana entre eles.

489

## 490 **Declaração de disponibilidade de dados**

491 Os dados estão disponíveis no banco de dados Sequence Read Archive (SRA) sob o número  
492 de acesso PRJNA1111038.

## 493 **Declaração de ética**

494 Este estudo foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética e Bem-Estar animal da  
495 Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

## 496 **Contribuição dos autores**

497 A obra foi idealizada por RV, JM, BM, ADL e AL. AL, DC e RR foram responsáveis pelo  
498 acompanhamento da amostragem. GB, RM foram responsáveis pelas análises. AL, DG e SC  
499 foram responsáveis pela interpretação dos resultados. O manuscrito foi escrito principalmente  
500 por AL, SC, DG e JM. Todos os autores aprovaram a versão final.

501

502 **Financiamento**

503 Este artigo foi financiado pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento pessoal de  
504 Nível Superior (CAPES) através de bolsa da Doutorado concedida a AL (bolsa número  
505 88887.633228/2021-00).

506

507 **Conflito de interesses**

508 *Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações*  
509 *comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como potencial conflito de*  
510 *interesses.*

511

512 **Referências**

- 513 Amin, N., Schwarzkopf, S., Kinoshita, A. et al. Evolution of rumen and oral microbiota in  
514 calves is influenced by age and time of weaning. *anim microbiome* **3**, 31 (2021).  
515 <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00095-3>
- 516 AoDaohu, Karin, A., Kiiru, G. P., & Naoki, N. (2024). Variations in milk, udder skin, and  
517 fecal microbiota and their relationships with blood metabolites and milk composition  
518 in dairy cows. *Letters in applied microbiology*, *77*(3), ovae014.  
519 <https://doi.org/10.1093/lambio/ovae014>
- 520 Banerjee S, Van Der Heijden MGA. Soil microbiomes and one health. *Nature reviews.*  
521 *Microbiology*, (2023), v.21, n.1, p.6–20. doi:10.1038/s41579-022-00779-w.
- 522 Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-  
523 resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, (2016),  
524 13:7, doi:10.1038/nmeth.3869.
- 525 Catozzi C, Bonastre A S, Francino O, Lecchi C, Carlos E C, Veccio D, Martucciello A,  
526 Fraulo P, Bronze V, Cusco A, D' Andreano S, Ceciliani F. The Microbiota of water  
527 buffalo milk during mastitis. *Plos One*, (2017), 12:9, doi:  
528 10.1371/journal.pone.0184710
- 529 Catozzi C, Ceciliani F, Lechi C, Talenti A, Vecchio D, De Carlo E et al. Short  
530 communication: Milk microbiota profiling on water buffalo with full-length 16S rRna  
531 using nanopore sequencing. *Journal of Dairy Science*, (2020) 103:2693-7. doi:  
532 10.3168/jds.2019-17359
- 533 Catozzi C, Cuscó A, Lecchi C, Talenti A, Martucciello A, Cappelli G, Bonastre AS, Francino  
534 O, Ceciliani F. Short communication: Intra- and inter-individual milk microbiota  
535 variability in healthy and infected water buffalo udder quarters. *Journal Dairy Science*,  
536 (2019), v.102, n.8, p.7476-7482. doi: 10.3168/jds.2019-16352.
- 537 Celano G, Calasso M, Costantino G, Vacca M, Ressa A, Nikoloudaki O, De Palo P,  
538 Calabrese FM, Gobbetti M, De Angelis M. (2022). Effect of Seasonality on  
539 Microbiological Variability of Raw Cow Milk from Apulian Dairy Farms in Italy.  
540 *Microbiology Spectr* v.10, p. e00514-22. doi:10.1128/spectrum.00514-22.
- 541 Chaves Lopez C, Serio A, Rossi C, Mazzarrino G, Sonia Marchetti S, Castellani F, Grotta  
542 L, Fiorentino FP, Paparella A, Martino G. Effect of diet supplementation with  
543 *Ascophyllum nodosum* on cow milk composition and microbiota, *Journal of Dairy*  
544 *Science*, (2016) 99:9, 6285-6297, doi: 10.3168/jds.2015-10837.

- 545 Chen, H., & Boutros, P. C. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-  
546 customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 35.  
547 doi:10.1186/1471-2105-12-35
- 548 Chi X, Gao H, Wu G, Qin W, Song P, Wang L, Chen J, Cai Z, Zhang T. Comparison of gut  
549 microbiota diversity between wild and captive bharals (*Pseudois nayaur*). *BMC*  
550 *Veterinary Research*, (2019), 15:243, doi: 10.1186/s12917-019-1993-
- 551 Derakhshani, H., De Buck, J., Mortier, R., Barkema, H. W., Krause, D. O., & Khafipour, E.  
552 (2016). The features of fecal and ileal mucosa-associated microbiota in dairy calves  
553 during early infection with *Mycobacterium avium* subspecies  
554 paratuberculosis. *Frontiers in microbiology*, 7, 426.
- 555 Derakhshani, H., Plaizier, J. C., De Buck, J., Barkema, H. W., Khafipour, E. (2018). Composition of the teat canal and  
556 intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat  
557 sealant. *Journal of dairy science*, 101(11), 10191-10205.
- 558 Elmagzoub, W. A., Idris, S. M., Elnaiem, M. H., Mukhtar, M. E., Eltayeb, E., Bakhiet, S.  
559 M., ... & Eltom, K. H. (2024). Faecal microbial diversity in a cattle herd infected by  
560 *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: a possible effect of production  
561 status. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(9), 276.
- 562 Facioli FL, Pedrotti LF, Ataide MW, da Silva AN, Zanella GC, Cantão ME, Zanella R.  
563 Microbiota do trato respiratório superior de macacos-prego (*Sapajus* spp.) cativos  
564 através de sequenciamento metagenômico, *Science and Animal Health*, (2020) v.8,  
565 n.1, p.02-20. doi:10.15210/sah.v8i1.18351
- 566 Ferrocino I, Rantsiou K, Cocolin L. Investigating dairy microbiome: an opportunity to  
567 ensure quality, safety and typicity. *Current Opinion in Biotechnology*, (2021), 73:164-  
568 6. doi: 10.1016/j.copbio.2021.08.009567891011
- 569 Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome.  
570 *National Reviews Microbiology*, (2017), v.15, p.579–590. doi:  
571 10.1038/nrmicro.2017.87.
- 572 Ganda EK, Businoto RS, Lima SF, Kronauer K, Dexter DH, Oikonomou G, Schukken YH,  
573 Bicalho RC. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact  
574 of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*  
575 (2016) 6:37565, doi: 10.1038/srep37565
- 576 Ganda EK, Businoto RS, Lima SF, Kronauer K, Dexter DH, Oikonomou G, Schukken YH,  
577 Bicalho RC. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact  
578 of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*  
579 (2016) 6:37565, doi: 10.1038/srep37565
- 580
- 581 Gathinji, P. K., Yousofi, Z., Akada, K., Wali, A., & Nishino, N. (2023). Monitoring the Milk  
582 Composition, Milk Microbiota, and Blood Metabolites of Jersey Cows throughout a  
583 Lactation Period. *Veterinary sciences*, 10(3), 226.  
584 <https://doi.org/10.3390/vetsci10030226>
- 585 Grunert E. Sistema genital feminino. p.269-314. In: DIRKSEN G, Grunder HD e Stober M.  
586 Rosenberger, *Exame Clínico dos Bovinos*. Guanabara Koogan, (1993), 3:419.
- 587 Guzman, JLG, Lázaro SF, do Nascimento AV, de Abreu DJ, Santos J, et al. Tonhati  
588 Genome-wide association study applied to type traits related to milk yield in water  
589 buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Dairy Science*. (2020) 103:1642-8. doi:  
590 10.3168/jds.2019-16499
- 591 Iqbal MW, Zhang Q, Yang Y, Li L, Zou C, Huang C, Lin B. Comparative study of rumen  
592 fermentation and microbial community differences between water buffalo and Jersey  
593 cows under similar feeding conditions. *Journal Applied Animals Research*, (2018), 46,  
594 740–748. doi: 10.1080/09712119.2017.1394859

- 595 Johnsen JF, Zipp KA, Kalber T, Passillé AM, Knierim U, Bart K, Mejdell CM. Is rearing  
596 calves with the dam a feasible option for dairy farms? Current and future research.  
597 *Applied Animal Behaviour Science*, (2016), 181:1-11. doi:  
598 10.1016/j.applanim.2015.11.011
- 599 Kable ME, Srisengfa Y, Laird M, Zaragoza J, McLeod J, Heidenreich J, Marco ML, Kable  
600 CM. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the  
601 impact of transfer to a milk processing facility, *ASM Journal mBio* (2016) 7:4.  
602 doi:10.1128
- 603 Liddicoat C, Sydnor H, Cando-Dumancela C, Dresken R, Liu J, Gellie N, Mills JG, Youg  
604 JM, Weyrich L, Hutchinson MR, Weisnstein P, Breed MF. (2019). Naturally-diverse  
605 airborne environmental microbial exposures modulate the gut microbiome and may  
606 provide anxiolytic benefits in mice. *Science of The Total Environment*, (2019), p.701.  
607 doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134684.
- 608 Lima SF, Bicalho MLS, Bicalho RC. Evaluation of milk sample fractions for  
609 characterization of milk microbiota from healthy and clinical mastitis cows. *PLoS One*  
610 (2018), 13. doi: 10.1371/journal.pone.0193671.
- 611 Luziatelli F, Melini F, Ficca1 AG, Melini V, Nardilli F, Ruzzi M. Core microbiome  
612 and bacterial diversity of the Italian Mediterranean river buffalo milk. *Applied*  
613 *Microbiology and Biotechnology* (2023) 107:1875–11. doi: 10.1007/s00253-023-  
614 12415-5.
- 615 Maes S, Vackier T, Nguyen Huu S, Heyndrickx M, Steenackers H, Sampers I, Raes K,  
616 Verplaetse A, Reu K. Occurrence and characterisation of biofilms in drinking water  
617 systems of broiler houses. *BMC Microbiology*, (2019) v. 19, doi: 10.1186/s12866-  
618 019-1451-5.
- 619 McInnis EA, Kalanetra KM, Mills DA, Maga EA. Analysis of raw goat milk microbiota:  
620 Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiol.*  
621 (2015) 46:121–10. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.021
- 622 Mcmurdie PJ, Holmes S, Jordan G, Chamberlain S. handling and analysis of high-  
623 throughput microbiome census data. *Plos One*, (2013), 8:4, doi:  
624 10.18129/B9.bioc.phyloseq.
- 625 Melini F, Melini V, Luziatelli F, Ruzzi M. Raw and Heat-Treated Milk: From Public Health  
626 Risks to Nutritional Quality. *Beverages* (2017) 3:54. doi:10.3390/beverages3040054
- 627 Mesquita AA, Da Costa GM, Almeida FVM, Demeu FA, REIS EMB. Mastitis in buffalo  
628 herds and their susceptibility to antimicrobials, (2017), *Pubvet*, v.11, n.1, p.62–73,  
629 doi:10.22256/pubvet.v11n1.62-73
- 630 Metzger SA, Hernandez LL, Skarlupka J H, Walker TM, Suen G, Ruegg PL. A cohort study  
631 of the milk microbiota of healthy and inflamed bovine mammary glands from dryoff  
632 through 150 days in milk. *Frontiers Veterinary Science*, (2018) 5:247. doi:  
633 10.3389/fvets.2018.00247.
- 634 Mojahedi S, Khorvash M, Ghorbani GR, Ghasemi E, Mirzaei M, Hashemzadeh-Cigari F.  
635 Performance, nutritional behavior, and metabolic responses of calves supplemented  
636 with forage depend on starch fermentability. *Journal of Dairy Science*, (2018)  
637 v.101,n.8, p.7061-7072. doi: 10.3168/jds.2017-13798.
- 638 Neuwirth, E. (2014). RColorBrewer: ColorBrewer palettes. R package version 1.1-2.
- 639 Nguyen QD, Tsuruta T, Nishino N. Examination of milk microbiota, fecal microbiota, and  
640 blood metabolites of Jersey cows in cool and hot seasons. *Animal Science Journal*,  
641 (2020) v.91, n.1. doi: 10.1111/asj.13441.
- 642 Noronha GN, Hess MK, Dodds KG, Silva AGMe, de Souza SM, da Silva JAR, Graças DAd,  
643 de Carvalho Rodrigues TCG, da Silva WC, da Silva ÉBR, Jansen PH, Henry HM,  
644 Rowe SJ, Castro VCG, Lourenço Junior JB. Characterization of the Ruminant

- 645 Microbiome of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Kept in Different Ecosystems in  
646 the Eastern Amazon *Animais*, (2023), 13(24):3858. doi: 10.3390/ani13243858
- 647 Oikonomou G, Bicalho ML, Meira E, Rossi RE, Foditsch C, et al. (2014) Microbiota of  
648 Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters.  
649 *PLOS ONE* 9:e85904. doi:10.1371/journal.pone.0085904
- 650 Oksanen J, Blanchet FG, Kind R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL,  
651 Solymos PM, Stevens HH, Wagner H. *Vegan: community ecology package*. R  
652 Package Version 2. 4-6. (2018).  
653 Disponível:<<https://cran.rproject.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>>
- 654 Pluznick J. L. (2014). Gut microbes and host physiology: what happens when you host  
655 billions of guests? *Frontiers in endocrinology*, (2014), v.5n. 91. doi:  
656 10.3389/fendo.2014.00091.
- 657 Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW. Constable P. D. *Veterinary Medicine: A textbook*  
658 *of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs, and horses*. Elsevier, (2009), 10:2156.
- 659 Salman MM, Nawaz M, Yaqub T, Mushtaq MH. Exploring the Milk Microbiota of Healthy  
660 and Mastitic Nili Ravi Buffalo Using 16S rRNA Gene Base Metagenomic  
661 Analysis. *Animals*, (2023), 13:2298, doi:10.3390/ani13142298
- 662 Salzano A, Manganiello G, Neglia G, Vinale F, De Nicola D, D'Occhio M, Campanile G. A  
663 Preliminary Study on Metabolome Profiles of Buffalo Milk and Corresponding  
664 Mozzarella Cheese: Safeguarding the Authenticity and Traceability of Protected Status  
665 Buffalo Dairy Products. *Molecules* (Basel, Switzerland), (2020), v.25, n.2, p.304,  
666 doi:10.3390/molecules25020304
- 667 Schalm OW, Noorlander DO. Experiments and observations leading to development of the  
668 California Mastitis Test. *Journal of American Veterinary Medical Association*, (1957)  
669 130:5.
- 670 Sharma R, Kumar Singh P, Onteru SK, Singh D. Faecal microbiome analysis reveals  
671 Clostridiales and Bacteroidales as signature gut microbes during estrus of buffalo.  
672 *Reproduction Biology*, (2021), v.21, n.2 p.100509. doi:  
673 10.1016/j.repbio.2021.100509.
- 674 Soriano-Lerma A, Pérez-Carrasco V, Sánchez-Marañón M, Ortiz-González M, Sánchez-  
675 Martín V, Gijón J, Navarro-Mari JM, García-Salcedo JA, Soriano M. Influence of 16S  
676 rRNA target region on the outcome of microbiome studies in soil and saliva samples.  
677 *Science Reproduction*, (2020), v.12, n.10, p.13637. doi: 10.1038/s41598-020-70141-  
678 8.
- 679 Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson JF, Jacques MA, Lebrun MH. "Changing the  
680 paradigm from pathogens to pathobiomes: new concepts in the light of metaomics".  
681 *Front Cell Infect Microbiol*, (2014), 4: 29. doi: 10.3389/fcimb.2014.00029
- 682 Wei, X., Ouyang, K., Long, T., Liu, Z., Li, Y., & Qiu, Q. (2022). Dynamic variations in  
683 rumen fermentation characteristics and bacterial community composition during in  
684 vitro fermentation. *Fermentation*, 8(6), 276.
- 685 Wenker ML, Verwer CM, Bokkers EAM, Te Beest DE, Gort G, de Oliveira D, Koets A,  
686 Bruckmaier RM, Gross JJ, Van Reenen CG. Effect of Type of Cow-Calf Contact on  
687 Health, Blood Parameters, and Performance of Dairy Cows and Calves. *Front Vet Sci*,  
688 (2022), v.12, n.9, p.855086. doi: 10.3389/fvets.2022.855086.
- 689 Yang MQ, Wang ZJ, Zhai, CB, Chen, LQ. Research progress on the application of 16S  
690 rRNA gene sequencing and machine learning in forensic microbiome individual



691 identification. *Frontiers in microbiology*, (2024), v.15. doi:  
692 10.3389/fmicb.2024.1360457.

693 Young W, Hine BC, Wallace OA, Callaghan M, Bibiloni R (2015) Transfer of intestinal  
694 bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ* 3:e888.  
695 <https://doi.org/10.7717/peerj.888>

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

### *Supplementary Material*

715 **Study of the microbial diversity of buffalo milk and its interaction**  
716 **with the calf**

717 **Allana Lais Alves Lima<sup>1</sup>; Savio Souza Costa<sup>2</sup>; Rosiane do Socorro dos Reis<sup>2</sup>; Damazio**  
718 **Campos de Souza<sup>3</sup>; Guilherme Costa Baião<sup>4</sup>; Rennan G. Moreira<sup>4</sup>; Herve Louis Ghislain**  
719 **Rogez<sup>2</sup>; Diego Assis das Graças<sup>2</sup>; Rinaldo Batista Viana<sup>1</sup>; Joana Montezano Marques<sup>5</sup>**

720 <sup>1</sup> Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém,  
721 Brasil

722 <sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

723 <sup>3</sup> Universidade Augusto Motta UNISUAM, Rio de Janeiro, Brasil

724 <sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,  
725 Brasil.

726 <sup>5</sup> Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo,  
727 Brasil

728

729 **\*Correspondente:** Joana Montezano Marques

730

731

732 **Tabela Sup. 1.** Métrica de sequenciamento por amostra e valores de alfa diversidade de  
733 amostras de fezes e leite de búfalas de primeira e terceira lactação e saliva de seus respectivos  
734 bezerros.

Sample ID	Type	Observed	Chao 1	Shannon	Simpson
023-F**	Feces	80	105	4.35	0.984
023-M**	Milk	29	41	3.43	0.958
023-S**	Spittle	114	166	4.89	0.991
036-F*	Feces	56	89	4.32	0.984
036-M*	Milk	40	64	3.68	0.970
036-S*	Spittle	107	176	4.94	0.991
057-F*	Feces	51	75	4.18	0.982
057-M*	Milk	43	73	3.88	0.975
057-S*	Spittle	96	126	4.59	0.987
427-F*	Feces	56	83	4.27	0.984
427-M*	Milk	37	41	3.48	0.965
427-S*	Spittle	110	171	4.96	0.991
656-F**	Feces	41	71	4.12	0.981
656-M**	Milk	39	50	3.52	0.966

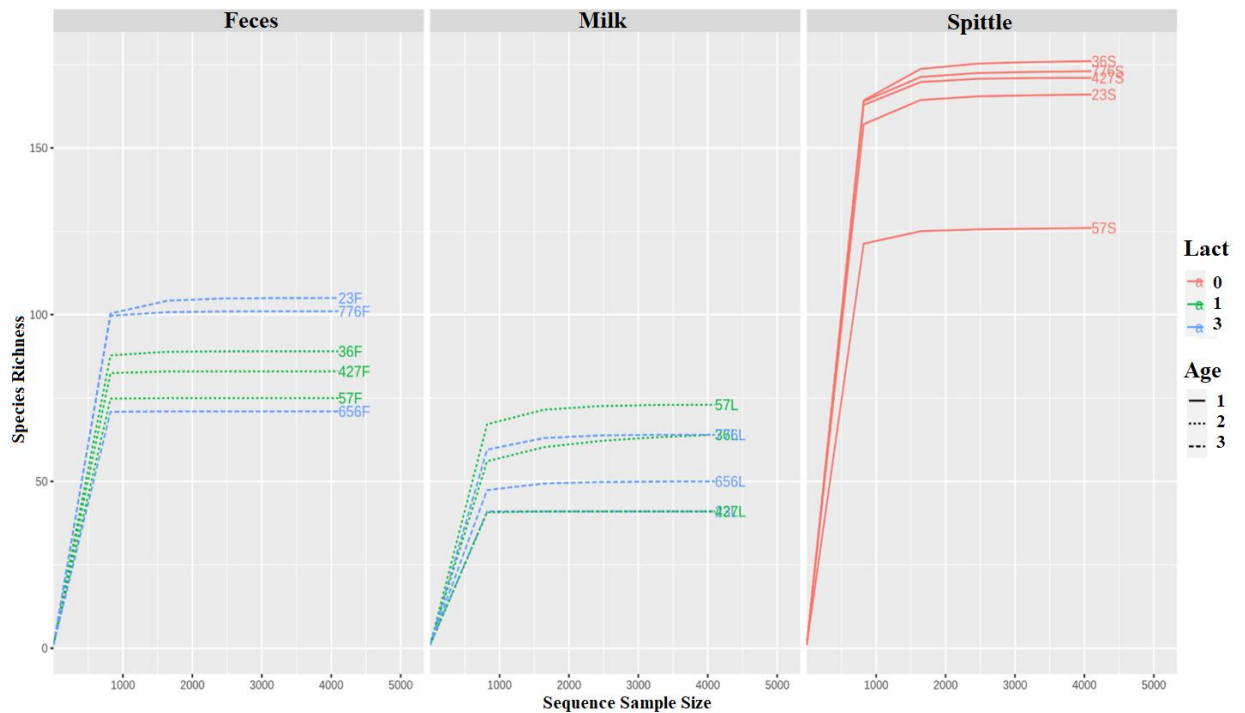
776-F**	Feces	67	101	4.50	0.987
776-M**	Milk	42	64	3.68	0.969
776-S**	Spittle	105	173	4.97	0.991

735 As amostras foram identificadas em letras em sua terminação, sendo M para leite (*milk*), S  
736 para saliva (*spittle*) e F para fezes (*feces*); \*Heifers; \*\*Cows.

737

738

739

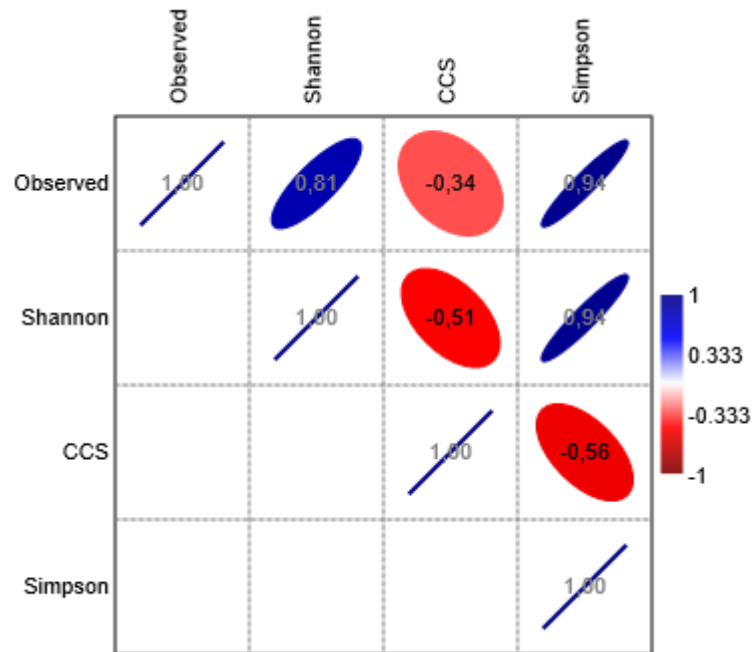


740

741 **Figura 3.** Curva de rarefação das amostras de fezes de leite de búfalas e saliva de seus  
742 respectivos bezerros

743

744



745

746

**Figura Suplementar 1.** Análise da correlação de Pearson entre contagem de células somáticas do leite e os valores dos índices de diversidade alfa.

747

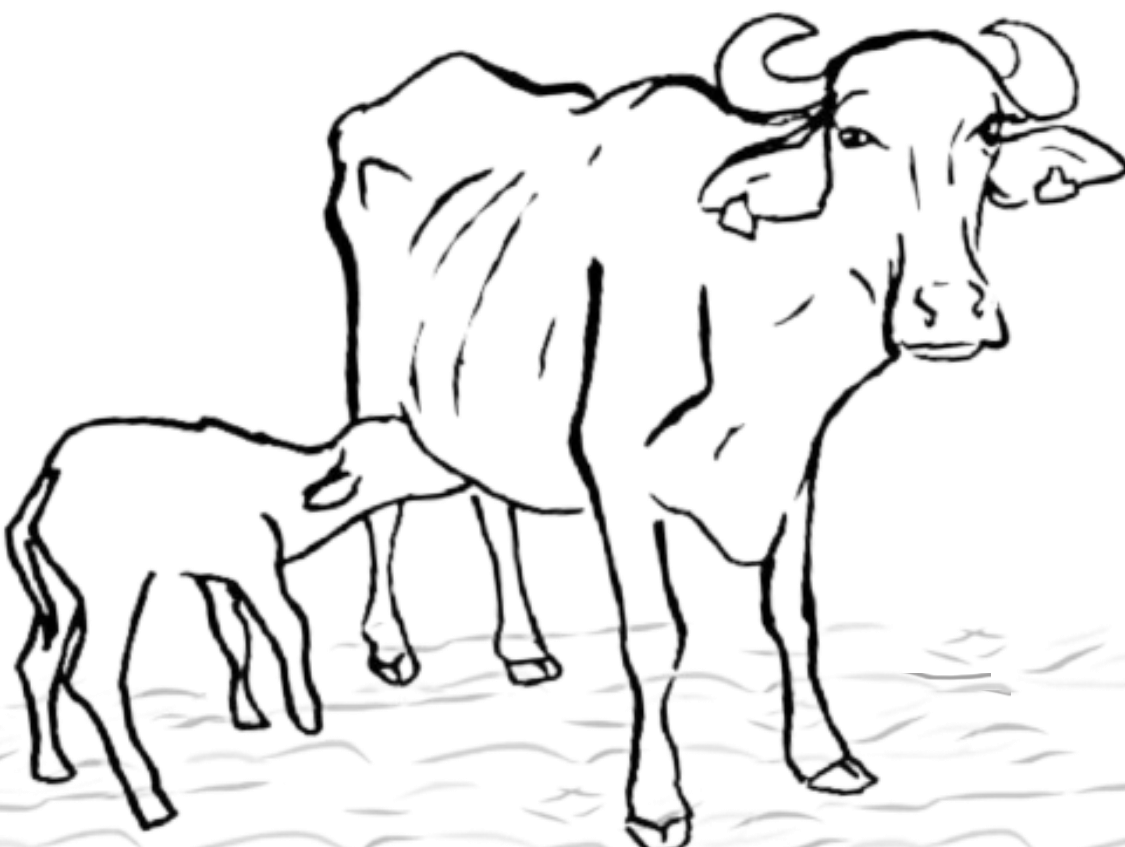
748

749

750

CAPÍTULO 2

**BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES À  
TETRACICLINA E AOS BETA-LACTÂMICOS SÃO  
COMPARTILHADAS ENTRE A MICROBIOTA DE BÚFALAS,  
BEZERROS E O MEIO AMBIENTE, NO MARAJÓ,  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**



1 **Bactérias Gram-negativas resistentes à tetraciclina e aos beta-lactâmicos são compartilhadas entre a**  
2 **microbiota de búfalos, bezerros e o meio ambiente, no Marajó, Amazônia brasileira**

3  
4 **Allana Lais Alves Lima<sup>1</sup>, Oscar Victor Cardenas Alegria<sup>2</sup>, Rosiane do Socorro dos Reis de Sousa<sup>2</sup>,**  
5 **Suania Maria do Nascimento Sousa<sup>2</sup>, Josinete Torres Garcia<sup>2</sup>, Bruno Moura Monteiro <sup>1</sup>, Rommel**  
6 **Thiago Jucá Ramos<sup>2</sup>; Renata Cristina Picão<sup>3</sup>, Walter Martin Roland Oeleman<sup>3</sup>, Hervé Louis Ghislain**  
7 **Rogez<sup>2</sup>, Rinaldo Batista Viana<sup>1</sup>, Joana Montezano Marques<sup>2</sup>**

8 <sup>1</sup>Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil;

9 <sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil;

10 <sup>3</sup>Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de  
11 Janeiro, Brasil;

12 <sup>4</sup>Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brasil.

13  
14  
15 \* **Corresponding:** montezano.j@ufabc.edu.br

16  
17 Tel.: +55 21 99435-4266

18  
19 **Abstract:** The hypothesis was assessed that there would be a correlation between the Gram-negative  
20 microbiota in the feces of buffaloes, when compared across different lactation numbers, calves, and the  
21 environment. To this end, fecal samples were collected from first lactation (heifer - HF) and fourth  
22 lactation (cow - CW) buffaloes, as well as their respective calves (CFH and CFC) from a farm in the  
23 Marajó Archipelago, Pará, Brazil. Soil samples (S) were also collected. The samples were diluted and  
24 plated on selective media supplemented with Ceftriaxone (CRO) or Tetracycline (TET) for bacterial  
25 isolation. Colonies grown on CRO were subjected to selective pressure using the replication method on  
26 plates with Cefepime (CFP) and Imipenem (IMP). Counting, isolation, and identification were performed  
27 using MALDI-TOF. In total, 91 bacterial strains were identified: 37 were resistant to TET, 27 to CFP, and  
28 27 to IMP. The strains were identified as *Escherichia coli* (TET [33]; IMP [7]), *Ochrobactrum*  
29 *intermedium* (TET [4]; CFP [19]; IMP [10]), *Achromobacter xyloxidans* (CFP [5]), and  
30 *Stenotrophomonas maltophilia* (CFP [3]; IMP [10]). Grouping was observed between the resistance  
31 profiles for CFC and CW for the antibiotic IMP; CW, HF, and CFC with group S for the antibiotics TET,  
32 IMP, and CFP, respectively. The results highlight the importance of constant monitoring of the bacterial  
33 resistance profile in these animals and the surrounding soil, as commensal and environmental bacteria can  
34 be indicators of selective pressure and may highlight emerging antimicrobial resistance  
35 agents commonly used.

36  
37 **keywords:** Gram-negative; feces; buffaloes; soil; resistance profile.

## 38 39 **1. Introdução**

40 A espécie *Bubalus bubalis*, também conhecida como búfalo d'água, é considerada um bovino  
41 domesticado e desempenha um papel significativo na produção pecuária mundial, com estimativas de mais  
42 de 200 milhões de cabeças globalmente (Wang et al., 2023). O Brasil abriga o maior rebanho de búfalos  
43 fora da Ásia, com a maior concentração na região do Arquipélago do Marajó, onde esses animais são uma  
44 fonte importante de subsistência local (Lopes Filho et al., 2022).

45 A relação entre humanos, o meio ambiente e outros organismos vivos é explicada pelo conceito de  
46 Saúde Única, que promove a ideia de uma saúde interconectada e interdependente. Assim, quando há um  
47 problema em uma parte deste sistema, outras partes também são afetadas e interagem com o problema,  
48 criando um ciclo prejudicial, como exemplificado pela disseminação da resistência antimicrobiana (Vega  
49 e Dowzicky, 2017).

50 A resistência antimicrobiana (RAM) é um fenômeno que ocorre naturalmente em bactérias, mesmo na  
51 ausência do uso de antimicrobianos. No entanto, o uso desses medicamentos impõe pressão seletiva sobre  
52 os microrganismos, levando à disseminação da RAM entre as bactérias, principalmente por meio de  
53 mutações genéticas e da transferência de elementos genéticos móveis, como os plasmídeos (Abo Oun et  
54 al., 2020).

55 Os antibióticos beta-lactâmicos e as tetraciclinas atuam contra uma variedade de microrganismos. Os  
56 mecanismos de resistência a ambos os antimicrobianos são bem descritos na literatura e podem ser  
57 intrínsecos ou adquiridos (Bonomo et al., 2017; Bahr, Gonzalez e Vila, 2021). No caso dos beta-lactâmicos,  
58 o mecanismo de resistência mais comum entre bactérias Gram-negativas é a degradação do antibiótico pelas  
59 beta-lactamases. Em relação às tetraciclinas, a resistência pode ser observada através da aquisição de  
60 determinantes, com os principais mecanismos incluindo bombas de efluxo e proteção ribossômica,  
61 resultando na inativação do antimicrobiano. Apesar de ser intrínseca, a bioprospecção de cepas resistentes  
62 é relevante na medicina veterinária, já que esse é o antimicrobiano mais comumente utilizado por  
63 veterinários (WOAH, 2021; Messele, Werid e Petrovski, 2023).

64 A transmissão de bactérias resistentes entre búfalos e seus bezerros durante o período de lactação é um  
65 processo chave para entender a propagação da resistência entre gerações dessa espécie, incluindo o  
66 ambiente parental e de pastagem (He et al., 2019). O trato digestivo de animais que recebem antibióticos,  
67 seja para tratamento ou promoção de crescimento, apresenta níveis mais altos de antimicrobianos, criando  
68 um ambiente propício à seleção e manutenção de bactérias resistentes. Nesse contexto, bactérias comensais  
69 expostas podem adquirir e reter genes de resistência (ARGs), que podem então ser disseminados para o  
70 ambiente por meio da troca de material genético entre bactérias comensais e ambientais (Sabino et al.,  
71 2019).

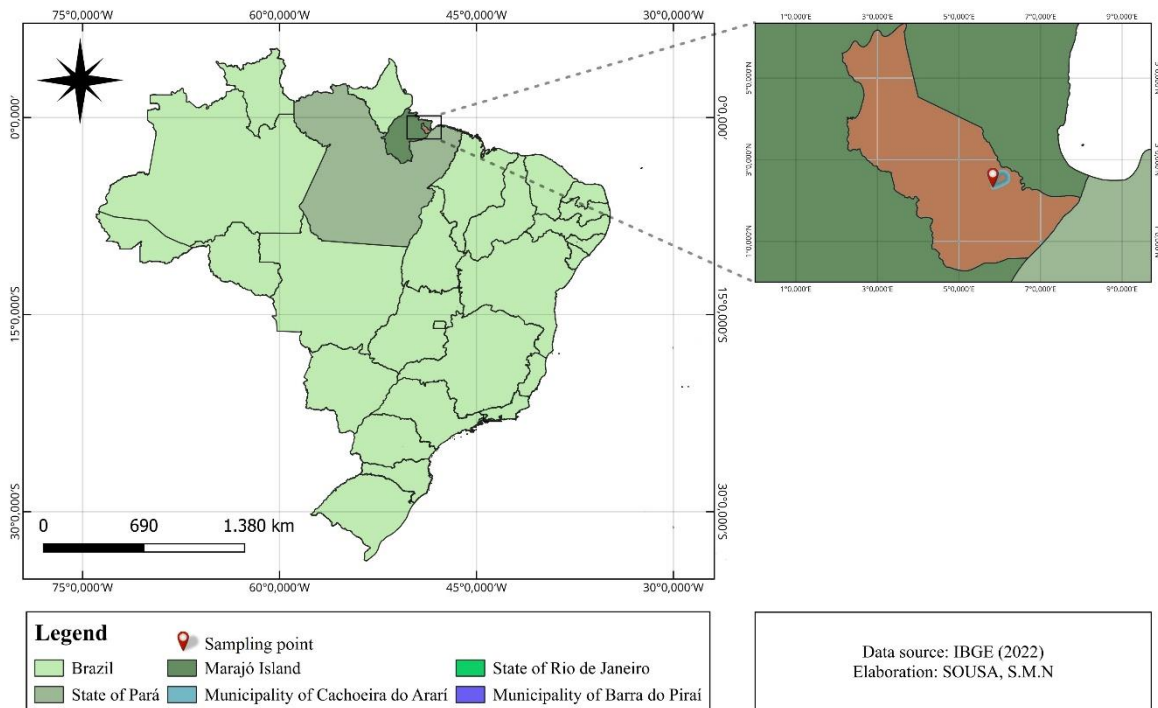
72 Dada a importância desses animais para a economia marajoara, essa questão representa um risco  
73 potencial para a saúde pública local. Portanto, investigar a ocorrência de resistência antimicrobiana e  
74 identificar cepas resistentes, buscando entender possíveis trocas entre os animais e o ambiente, é crucial  
75 para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e prevenção da resistência bacteriana nessa área  
76 (Alonso et al., 2017; Noronha et al., 2023).

77 Apesar da importância da criação de búfalos no Arquipélago do Marajó, no estado do Pará, não há  
78 estudos realizados para investigar a presença de microrganismos resistentes em animais e no solo local.  
79 Diante disso, este estudo testou a hipótese de que há transmissão de bactérias resistentes entre búfalos,  
80 bezerros e o ambiente. O objetivo do estudo é identificar a presença de microrganismos Gram-negativos  
81 resistentes a beta-lactâmicos e tetraciclinas nas fezes de búfalos e seus bezerros, bem como no solo ao redor,  
82 e avaliar possíveis trocas entre os animais e o ambiente.

## 83 **2. Material e Métodos**

### 84 *2.1. Local de coleta*

85 As amostras foram coletadas em uma propriedade localizada no Arquipélago do Marajó, no  
86 município de Cachoeira do Arari (Fig. 1), estado do Pará, Brasil.



87

88 **Fig. 1:** Localização da fazenda onde foram coletadas amostras de fezes e solo, no município de Cachoeira  
 89 do Arari, Arquipélago do Marajó, Pará, Brasil.

90

91 *2.2. Desenho experimental*

92 O rebanho da propriedade é composto por 22 búfalos mestiços das raças Murrah e Mediterrânea. Os  
 93 animais permanecem no mesmo pasto independentemente da idade e são ordenhados duas vezes ao dia (às  
 94 4:00 da manhã e às 16:00 da tarde). Os bezerros ficam com suas mães por uma hora após a ordenha e  
 95 consomem o leite residual. Para a coleta de amostras, foi adotado um delineamento experimental  
 96 inteiramente casualizado. No total, 15 amostras foram coletadas: seis amostras fecais de búfalos de primeira  
 97 (HF) e quarta (CW) lactação, seis amostras fecais de seus respectivos bezerros (novilha [CHF] e vaca  
 98 [CFC]) e três amostras de solo (S). Os animais foram selecionados com base nos seguintes critérios: i)  
 99 Búfalos divididos em dois grupos: 1ª Lactação (n=3) e 4ª Lactação (n=3); ii) Animais com origens genéticas  
 100 semelhantes; iii) Búfalos no mesmo estágio de lactação; e iv) Animais submetidos ao mesmo manejo geral,  
 101 condições nutricionais e práticas de ordenha.

102

103 *2.3. Coleta de Amostras*

104 Amostras biológicas e de solo foram coletadas em agosto, durante a estação seca no Arquipélago do  
 105 Marajó. As fezes foram coletadas da defecação espontânea e colocadas em tubos de coleta estéreis. Para a  
 106 coleta de amostras de solo, três pontos foram selecionados aleatoriamente dentro do pasto onde os animais  
 107 eram mantidos, e 50 gramas foram coletados dos 15 centímetros superiores do horizonte do solo. Essas



108 amostras foram então armazenadas em sacos plásticos estéreis. As amostras foram refrigeradas em uma  
109 caixa de material isotérmico com bolsas de gelo reutilizáveis e transportadas para o Centro de Valoração  
110 de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA) para isolamento bacteriano.

111

#### 112 2.4. Isolamento e Contagem

113 Para isolamento e contagem bacteriana, 0,1 grama de cada amostra foi adicionado a 900 µL de solução  
114 salina estéril a 0,9%. Das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  obtidas, alíquotas de 100 µL foram semeadas em ágar  
115 MacConkey suplementado com Nistatina (48 µg/mL) e Ceftriaxona (4 µg/mL), e em outra placa com  
116 Nistatina (48 µg/mL) e Tetraciclina (16 µg/mL). Para triagem inicial de microrganismos Gram-negativos  
117 resistentes, as placas foram incubadas por 24 horas a 35°C. A contagem de células viáveis foi realizada em  
118 placas onde as contagens de diluição estavam dentro da faixa mínima e máxima contável (30 a 300 unidades  
119 formadoras de colônias [UFC]). Os resultados foram expressos em UFC por grama de fezes ou solo (UFC/g)  
120 com base no cálculo do fator de diluição e apresentados em uma escala logarítmica.

121

#### 122 2.5. Replica plating e identificação por MALD-TOF

123 Colônias bacterianas foram semeadas usando a técnica de *Replica Plating* (Lederberg, 1952) para  
124 testar a resistência a beta-lactâmicos. Colônias cultivadas sob pressão de Ceftriaxona (4 µg/mL) foram  
125 transferidas para um carimbo de veludo e levemente prensadas. A massa bacteriana no veludo foi estampada  
126 em quatro placas: i) sem pressão seletiva, como controle inicial do inóculo; ii) com Cefepima (16 µg/mL,  
127 Sigma); iii) com Imipenem (4 µg/mL; Sigma); e iv) novamente sem antimicrobianos, como controle final  
128 do inóculo. Os resultados foram expressos em UFC/g de fezes ou solo, com base nos cálculos do fator de  
129 diluição, e apresentados em uma escala logarítmica. Três colônias com características macroscópicas  
130 semelhantes de cada placa foram selecionadas para identificação bacteriana usando Matrix-Assisted Laser  
131 Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) de acordo com Tufic-Garutti et al. (2023).

132

#### 133 2.7. Análise estatística

134 As variáveis identificadas neste estudo foram inicialmente avaliadas quanto à normalidade usando  
135 o teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram feitas usando Análise de Variância  
136 (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para contagens bacterianas em fezes de búfalo, fezes de bezerro e  
137 solo. Com base na resistência e identidade das cepas isoladas, uma matriz de presença-ausência (Tabela  
138 Sup.1) foi construída e uma análise de cluster foi realizada usando o método UPGMA com o índice de  
139 similaridade de Jaccard. Essas análises foram realizadas usando o software Past 4.17 (Hammer e Harper,  
140 2001).

141

### 142 3. Resultados

#### 143 3.1 Contagens bacterianas resistentes a CRO e TET

144 Os resultados da contagem bacteriana em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona (CRO) e  
145 tetraciclina (TET) apresentaram valores médios de Log 4,0 e 4,4 para CRO, e Log 3,7 e 2,3 para TET, para  
146 fezes e solo, respectivamente (ver Tabela 1).

147

148

149

150 **Tabela 1.** Contagens de UFC bacterianas determinadas em fezes de búfalos (HF - novilha; CW - vaca,  
151 quarta paridade; CHF - bezerro; CFC - bezerro) e solo (S) em meio com ceftriaxona (CRO) e tetraciclina  
152 (TET).]

	Log CFU/g (fezes e solo)				
	HF	CFH	CW	CFC	Soil
<b>CRO</b>	3,9±0,1	4,0±0,1	4,2±0,2	4,3±0,04	4,1±0,1
<b>TET</b>	2,8±0,8	3,7±0,1	2,7±0,5	3,3±0,5	2,3±0,4

153

154

155 A morfologia das colônias variou em meios suplementados com tetraciclina (TET), cefepima (CFP) e  
156 imipenem (IMP). Um total de 91 colônias foram selecionadas e isoladas para posterior identificação, com a  
157 seguinte distribuição: 16 (17,6%) cepas de HF; 16 (17,6%) de CFH; 14 (15,4%) de CW; 18 (19,8%) de CFC;  
158 e 27 (29,6%) de S. Os diferentes isolados foram designados pelas letras iniciais do tipo de amostra, seguidos  
159 pelo ano de coleta e número da cepa (Tabela 2).

160 Em meios suplementados com TET, 33 cepas de *Escherichia coli* foram identificadas: cinco de HF;  
161 dez de CFH; cinco de CW; oito de CFC; e cinco de S. Além disso, quatro cepas de *Ochrobactrum*  
162 *intermedium* foram identificadas: duas de HF e duas de CFC. Em meios suplementados com CFP, 19 cepas  
163 de *O. intermedium* foram identificadas: três de HF; uma de CFH; seis de CW; duas de CFC; e sete de S.  
164 Cinco cepas de *Achromobacter xylosoxidans* também foram identificadas: duas de HF; uma de CW; uma de  
165 CFC; e uma de S. Cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* também foram isoladas (três): uma de CFH e  
166 duas de S. Em meios suplementados com IMP, dez cepas de *S. maltophilia* foram identificadas: uma de HF;  
167 três de CFH; uma de CW; três de CFC; e duas de S. Além disso, dez cepas de *O. intermedium* foram isoladas:  
168 uma de HF; uma de CFH; e oito de S. Sete cepas de *E. coli* também foram identificadas: duas de HF; uma  
169 de CW; duas de CFC; e duas de S.

170

171 **Tabela 2.** Identificação por MALDI-TOF de cepas bacterianas que apresentam resistência (+) ou  
172 sensibilidade (-) à tetraciclina (TET), cefepima (CFP) e imipenem (IMP), isoladas de fezes de búfalos de  
173 primeira (HF) e quarta lactação (CW), seus respectivos bezerros (novilha [CFH] e vaca [CFC]) e solo de  
174 seu ambiente (S).

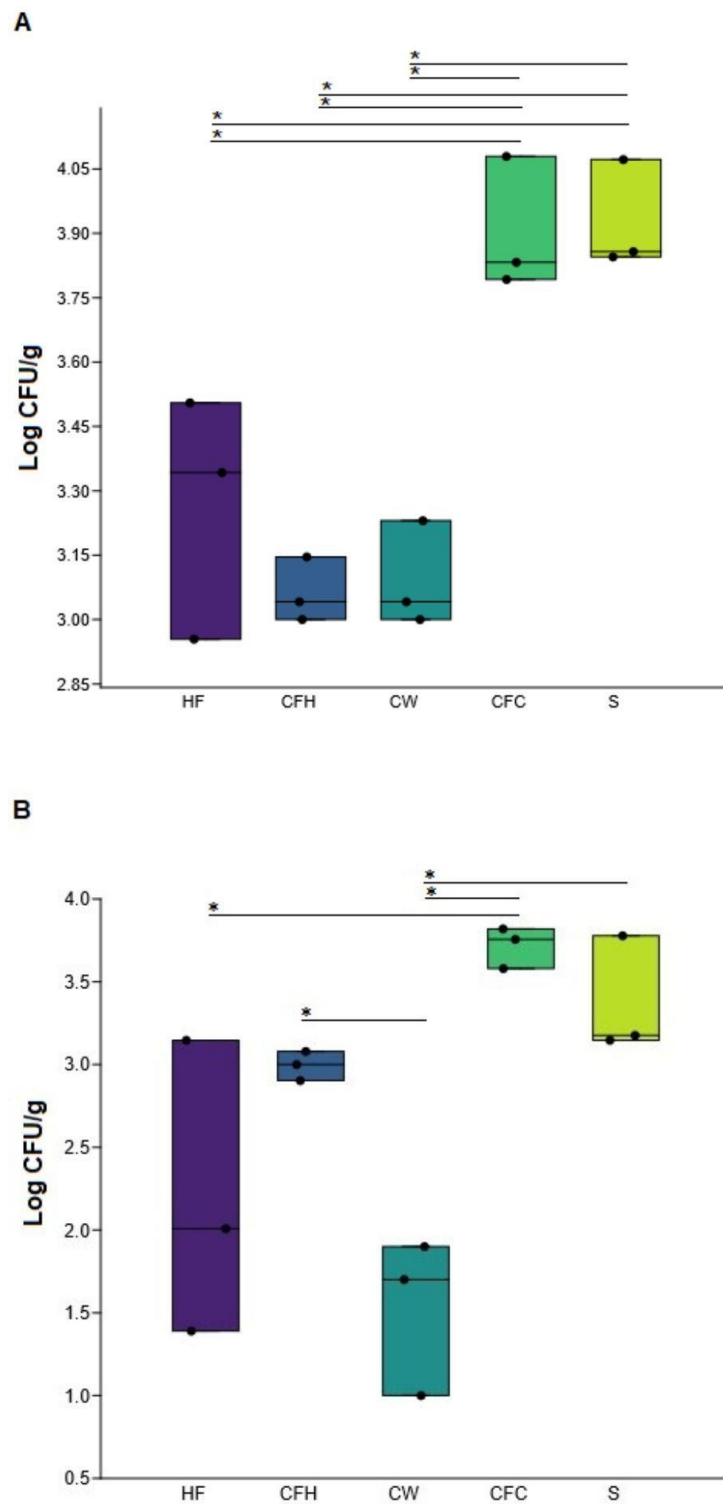
Amostra	Tipo	Identificação	Score MALDI- TOF	Antibióticos		
				TET (16µg/mL)	CFP (16µg/mL)	IMP (4µg/mL)
	HF23-01	<i>E. coli</i>	2.32	+	-	-
	HF23-02	<i>O. intermedium</i>	1.98	+	-	-
<b>HF</b>	HF23-03	<i>E. coli</i>	2.31	+	-	-
	HF23-04	<i>E. coli</i>	2.13	+	-	-
	HF23-05	<i>E. coli</i>	2.32	+	-	-

	HF23-05	<i>O. intermedium</i>	2.34	+	-	-
	HF23-06	<i>E. coli</i>	2.28	+	-	-
	HF23-07	<i>O. intermedium</i>	2.34	-	+	-
	HF23-08	<i>A. xylosoxidans</i>	2.08	-	+	-
	HF23-09	<i>O. intermedium</i>	2.26	-	+	-
	HF23-10	<i>O. intermedium</i>	2.29	-	+	-
	HF23-11	<i>A. xylosoxidans</i>	1.85	-	+	-
	HF23-12	<i>O. intermedium</i>	2.3	-	-	+
	HF23-13	<i>E. coli</i>	2.36	-	-	+
	HF23-14	<i>E. coli</i>	2.26	-	-	+
	HF23-15	<i>S. maltophilia</i>	1.97	-	-	+
<b>CFH</b>	CFH23-01	<i>E. coli</i>	2.19	+	-	-
	CFH23-02	<i>E. coli</i>	2.22	+	-	-
	CFH23-03	<i>E. coli</i>	2.15	+	-	-
	CFH23-04	<i>E. coli</i>	2.37	+	-	-
	CFH23-05	<i>E. coli</i>	2.21	+	-	-
	CFH23-06	<i>E. coli</i>	2.31	+	-	-
	CFH23-07	<i>E. coli</i>	2.24	+	-	-
	CFH23-08	<i>E. coli</i>	2.33	+	-	-
	CFH23-09	<i>E. coli</i>	2.33	+	-	-
	CFH23-10	<i>E. coli</i>	2.35	+	-	-
	CFH23-11	<i>S. maltophilia</i>	1.8	-	+	-
	CFH23-12	<i>O. intermedium</i>	2.31	-	+	-
	CFH23-13	<i>O. intermedium</i>	2.02	-	+	-
	CFH23-14	<i>S. maltophilia</i>	1.73	-	+	-
	CFH23-15	<i>S. maltophilia</i>	1.75	-	-	+
	CFH23-16	<i>S. maltophilia</i>	1.95	-	-	+
<b>CW</b>	CW23-01	<i>E. coli</i>	2.32	+	-	-
	CW23-02	<i>E. coli</i>	2.14	+	-	-
	CW23-03	<i>E. coli</i>	2.27	+	-	-
	CW23-04	<i>E. coli</i>	2.3	+	-	-
	CW23-05	<i>E. coli</i>	2.34	+	-	-
	CW23-06	<i>A. xylosoxidans</i>	1.88	-	+	-
	CW23-07	<i>O. intermedium</i>	2.26	-	+	-
	CW23-08	<i>O. intermedium</i>	2.07	-	+	-
	CW23-09	<i>O. intermedium</i>	2.04	-	+	-
	CW23-10	<i>O. intermedium</i>	2.31	-	+	-
	CW23-11	<i>O. intermedium</i>	2.25	-	+	-
	CW23-12	<i>O. intermedium</i>	1.88	-	+	-
	CW23-13	<i>E. coli</i>	2.14	-	-	+
	CW23-14	<i>S. maltophilia</i>	1.86	-	-	+
<b>CFC</b>	CFC23-01	<i>O. intermedium</i>	1.97	+	-	-
	CFC23-02	<i>O. intermedium</i>	2.14	+	-	-

CFC23-03	<i>E. coli</i>	2.3	+	-	-
CFC23-04	<i>E. coli</i>	2.29	+	-	-
CFC23-05	<i>E. coli</i>	2.32	+	-	-
CFC23-06	<i>E. coli</i>	2.29	+	-	-
CFC23-07	<i>E. coli</i>	2.26	+	-	-
CFC23-08	<i>E. coli</i>	2.28	+	-	-
CFC23-09	<i>E. coli</i>	2.26	+	-	-
CFC23-10	<i>E. coli</i>	2.29	+	-	-
CFC23-11	<i>A. xylosoxidans</i>	1.91	-	+	-
CFC23-12	<i>O. intermedium</i>	1.78	-	+	-
CFC23-13	<i>O. intermedium</i>	2.34	-	+	-
CFC23-14	<i>S. maltophilia</i>	2.03	-	-	+
CFC23-15	<i>S. maltophilia</i>	2.07	-	-	+
CFC23-16	<i>S. maltophilia</i>	1.94	-	-	+
CFC23-17	<i>E. coli</i>	2.2	-	-	+
CFC23-18	<i>E. coli</i>	2.13	-	-	+
S23-01	<i>E. coli</i>	2.23	+	-	-
S23-02	<i>E. coli</i>	2.35	+	-	-
S23-03	<i>E. coli</i>	2.26	+	-	-
S23-04	<i>E. coli</i>	2.3	+	-	-
S23-05	<i>E. coli</i>	2.17	+	-	-
S23-06	<i>O. intermedium</i>	2.26	-	+	-
S23-07	<i>O. intermedium</i>	2.44	-	+	-
S23-08	<i>S. maltophilia</i>	1.89	-	+	-
S23-09	<i>S. maltophilia</i>	2.14	-	+	-
S23-10	<i>O. intermedium</i>	2.34	-	+	-
S23-11	<i>O. intermedium</i>	2.3	-	+	-
S23-12	<i>O. intermedium</i>	1.86	-	+	-
S23-13	<i>O. intermedium</i>	1.76	-	+	-
S23-14	<i>A. xylosoxidans</i>	1.91	-	+	-
S23-15	<i>O. intermedium</i>	2.26	-	+	-
S23-16	<i>E. coli</i>	2.37	-	-	+
S23-17	<i>O. intermedium</i>	2.31	-	-	+
S23-18	<i>O. intermedium</i>	2.23	-	-	+
S23-19	<i>O. intermedium</i>	2.19	-	-	+
S23-20	<i>E. coli</i>	2.39	-	-	+
S23-21	<i>S. maltophilia</i>	1.94	-	-	+
S23-22	<i>S. maltophilia</i>	1.93	-	-	+
S23-23	<i>O. intermedium</i>	2.35	-	-	+
S23-24	<i>O. intermedium</i>	2.13	-	-	+
S23-25	<i>O. intermedium</i>	2.26	-	-	+
S23-26	<i>O. intermedium</i>	2.09	-	-	+
S23-27	<i>O. intermedium</i>	2.25	-	-	+

176 3.1 *Contagens bacterianas de microrganismos resistentes a beta-lactâmicos*

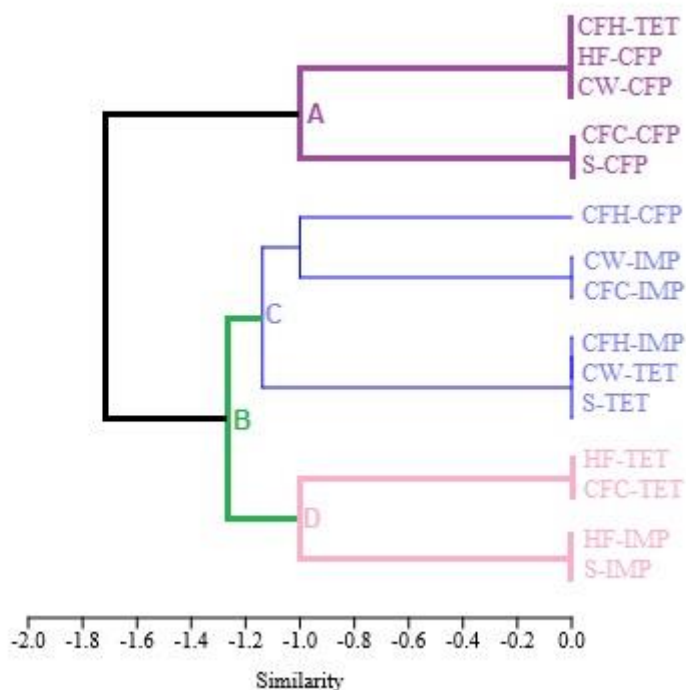
177 A avaliação das contagens bacterianas para isolados resistentes a beta-lactâmicos revelou diferenças  
178 significativas para cefepima (CFP). A análise de variância (ANOVA) indicou uma variação significativa  
179 entre os grupos ( $F = 19,69$ ,  $p = 9,69 \times 10^{-5}$ ). Diferenças significativas foram observadas entre os seguintes  
180 grupos: HF e CFC (Tukey,  $p = 0,006$ ), HF e S (Tukey,  $p = 0,005$ ), CFH e CFC (Tukey,  $p = 0,0008$ ), CFH  
181 e S (Tukey,  $p = 0,0006$ ), CW e CFC (Tukey,  $p = 0,001$ ) e CW e S (Tukey,  $p = 0,0008$ ). Da mesma forma,  
182 para imipenem (IMP), a ANOVA mostrou diferenças significativas entre os grupos ( $F = 16,91$ ,  $p =$   
183  $0,00019$ ). Variações significativas foram encontradas entre CFH e CW (Tukey,  $p = 0,0026$ ), CFC e HF  
184 (Tukey,  $p = 0,011$ ), CFC e CW (Tukey,  $p = 0,0002$ ) e S e CW (Tukey,  $p = 0,0006$ ) (ver Fig. 2).



185  
 186 **Fig 2.** Distribuição das cargas bacterianas isoladas de fezes de búfalos (HF - novilha; CW - vaca, quarta  
 187 paridade; CFH - bezerra; CFC - bezerra) e solo (S) que foram resistentes aos antibióticos utilizados: A -  
 188 CFP (cefepima) e B - IMP (imipenem). \*As barras no topo dos gráficos indicam diferenças significativas  
 189 (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos analisados.  
 190

191 3.4 Análise de Cluster de Perfis de Resistência

192 Com base nos perfis de resistência e sensibilidade das cepas isoladas, uma matriz de presença-ausência  
193 foi construída e uma análise de cluster foi realizada. Dois clusters principais foram identificados: A e B.  
194 No Cluster A, duas subdivisões foram observadas. A subdivisão A1 agrupou perfis de resistência de HF-  
195 CFP, CW-CFP e CFH-TET, enquanto a subdivisão A2 agrupou perfis de CFC-CFP e S-CFP. O Cluster B  
196 foi dividido em duas subdivisões adicionais: C e D. Na subdivisão C, o perfil de resistência de CFH-CFP  
197 não se agrupou com nenhum outro perfil. Além disso, um subgrupo dentro de C incluiu CW-IMP e CFC-  
198 IMP, sugerindo um compartilhamento de cepas resistentes entre gerações. Os perfis CFH-IMP, CW-TET  
199 e S-TET também se agruparam em C, indicando similaridades nos perfis de resistência entre os isolados.  
200 Na Subdivisão D, HF-TET e CFC-TET foram agrupados. Além disso, HF-IMP e S-IMP foram agrupados,  
201 demonstrando similaridade entre os perfis de resistência dos animais e do ambiente, sugerindo uma  
202 interação entre os dois (ver Fig. 3).



203  
204 **Fig. 3.** Agrupamento de perfis de resistência de isolados de fezes de HF (novilha), CW (vaca, quarta  
205 paridade), CFH (novilha bezerra), CFC (vaca bezerra) e solo (S) contra TET (tetraciclina), CFP (cefepima)  
206 e IMP (imipenem), usando o índice de similaridade de Jaccard. As cores indicam os agrupamentos da  
207 seguinte forma: Roxo - Agrupamento A, Verde - Agrupamento B, Azul - Agrupamento C e Rosa -  
208 Agrupamento D.

209  
210 **4. Discussão**

211 O *One Health* enfatiza a colaboração entre diferentes domínios (animal-ambiente-humano) para  
212 abordar problemas complexos que impactam todas essas áreas de forma semelhante. Este estudo aborda o  
213 *One Health* praticamente investigando o compartilhamento de microbiota resistente entre dois fatores

214 (ambiente-animal) e entre gerações da mesma espécie, perpetuando a disseminação de ARGs. Isso  
215 representa uma ameaça significativa à saúde humana, especialmente por meio do consumo de produtos de  
216 origem animal ou contato com ambientes contaminados. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a  
217 realizar uma bioprospecção de cepas Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos e tetraciclina de fezes  
218 de búfalos, seus bezerros e solo em uma propriedade no Arquipélago do Marajó, Amazônia-Pará-Brasil.

219 O solo contém a maior biomassa microbiana da Terra, com bactérias compreendendo uma parte  
220 significativa de sua composição (Bar-On, Phillips e Milo, 2018). Neste estudo, diferenças na carga  
221 bacteriana do solo foram observadas dependendo do antimicrobiano testado. Estudos anteriores indicaram  
222 que fezes de animais utilizadas para enriquecimento do solo, de animais criados em pastagens ou vazamento  
223 de tanques de armazenamento de resíduos, podem contribuir para a disseminação de cepas resistentes  
224 (Kyselková et al., 2015; Young et al., 2015; Wang et al., 2022). Este estudo é pioneiro na bioprospecção  
225 de cepas resistentes de isolados de solo do Arquipélago do Marajó, destacando potenciais rotas de  
226 disseminação de microrganismos resistentes nesta região.

227 Foi observada a presença de bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos e tetraciclina nas  
228 fezes e amostras de solo estudadas. Esses antimicrobianos são comumente utilizados na medicina  
229 veterinária devido ao seu amplo espectro de ação e baixo custo de mercado. Estudos anteriores alertaram  
230 para o surgimento da RAM por meio de pesquisas sobre o resistoma do conteúdo ruminante, onde foi  
231 observada a presença de genes que conferem resistência a uma ampla gama de classes de antimicrobianos  
232 (Liu et al., 2016; Sun et al., 2021).

233 Grande parte da literatura sobre suscetibilidade antimicrobiana em medicina veterinária tem se  
234 concentrado em bactérias patogênicas ou isoladas de casos clínicos, destacando a relevância da avaliação  
235 da microbiota fecal normal resistente a antimicrobianos, pois pode revelar indicadores de pressão seletiva  
236 e ARGs que podem ser transferidos entre microrganismos comensais em animais (Sawant et al., 2007;  
237 Wollein et al., 2023).

238 Em relação aos isolados, foram observados menores valores de Log UFC/g de fezes resistentes ao  
239 imipenem em comparação aos outros antimicrobianos estudados. Isso pode estar associado ao uso ocasional  
240 do imipenem em medicina veterinária, pois é usado apenas em casos de infecções graves ou não responsivas  
241 a outros tratamentos (Sousa et al., 2019; Maciel e Xavier, 2017). Em um estudo que avaliou 67 cepas de  
242 *Klebsiella pneumoniae* de fezes, urina e pulmões de animais selvagens e domésticos, apenas 6% dos  
243 isolados apresentaram resistência ao imipenem, corroborando nossos achados (Sousa et al., 2019).

244 A partir dos resultados, observou-se que a tetraciclina apresentou o maior número de isolados  
245 resistentes identificados. Em 2019, as tetraciclinas ficaram em primeiro lugar, segundo a Organização  
246 Mundial de Saúde Animal, como a classe de antimicrobianos mais utilizada na medicina veterinária  
247 globalmente, com 35,6% dos antimicrobianos empregados (WOAH, 2021). Além disso, em alguns países,  
248 doses subterapêuticas são utilizadas na pecuária como aditivos alimentares para promover o crescimento,  
249 prevenir doenças e melhorar a produtividade de bovinos, aves, suínos, ovinos e caprinos (Gaballah et al.,  
250 2021). É importante ressaltar que, embora a resistência à tetraciclina possa ter uma característica intrínseca,  
251 ela foi avaliada neste estudo por ser o único antibiótico utilizado na fazenda.



252 Foi observado um maior número de isolados resistentes à tetraciclina, o que também corrobora um  
253 estudo realizado em vários países da União Europeia, onde foi avaliada a resistência de enterobactérias  
254 isoladas de galinhas, suínos e bovinos. Os principais resultados mostraram baixos valores ou ausência de  
255 resistência em cepas de *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Salmonella* spp. a  
256 antimicrobianos restritos a ambientes hospitalares humanos. No entanto, altas porcentagens de resistência  
257 foram observadas contra ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima, por serem antimicrobianos  
258 mais antigos e comumente utilizados na medicina veterinária (De Jong et al., 2009).

259 *Escherichia coli* foi a espécie mais isolada neste estudo, com o maior número de isolados em placas  
260 suplementadas com tetraciclina, corroborando um estudo nos Estados Unidos por Agga et al. (2016), que  
261 observou Log UFC/g 2,3 de *E. coli* resistente à tetraciclina em fezes mistas de bovinos de corte e seus  
262 bezerros. Em um estudo conduzido no sul da Itália por Nizza et al. (2010), foram avaliadas 169 amostras  
263 fecais diarreicas de bezerros, com 94 cepas de *E. coli* hemolíticas isoladas, das quais 34 eram resistentes à  
264 tetraciclina. *E. coli* é uma enterobactéria comum que coloniza o trato gastrointestinal de animais e humanos,  
265 considerada uma bactéria oportunista que pode causar infecções endógena e exogenamente. Além disso,  
266 tem implicações potenciais para a saúde de indivíduos imunocomprometidos ou com barreira intestinal  
267 comprometida, capazes de causar manifestações clínicas (Fesseha e Asefa, 2022).

268 Outras espécies isoladas neste estudo foram descritas anteriormente em estudos de medicina  
269 veterinária. *Stenotrophomonas maltophilia*, por exemplo, é considerada um patógeno bacteriano  
270 oportunista amplamente disseminado, capaz de formar biofilmes e exibir resistência a múltiplos  
271 medicamentos, previamente identificado em isolados de leite de ovelhas com mastite clínica (De Almeida  
272 et al., 2009). *Ochrobactrum intermedium* e *Achromobacter xylosoxidans* foram relatados como patógenos  
273 ambientais e nosocomiais, respectivamente, ambos oportunistas e portadores de resistência (Ajoulat et al.,  
274 2014; Stainer et al., 2021).

275 Com base na resistência e sensibilidade das cepas isoladas, a análise de agrupamento mostrou  
276 similaridade entre os perfis de resistência das fezes de búfalos e seus bezerros. Está bem estabelecido que  
277 os animais de produção servem como reservatórios para bactérias resistentes de outros animais e seus  
278 tratadores, representando assim um risco potencial de disseminação aos consumidores (Sivagami et al.,  
279 2020). Um estudo anterior identificou uma potencial rota de compartilhamento microbiano entre o sistema  
280 gastrointestinal e a glândula mamária de vacas através da corrente sanguínea (Young et al., 2015). Portanto,  
281 os resultados observados neste estudo sugerem uma rota de compartilhamento de cepas resistentes entre  
282 búfalos e seus bezerros através da rota mamária.

283 Este estudo observou o agrupamento de perfis de resistência entre animais e solo para tetraciclina e  
284 imipenem, destacando a questão das rotas de compartilhamento de resistência entre animais e solo e vice-  
285 versa. Em relação ao meio ambiente, um dos problemas é a presença de resíduos antimicrobianos e bactérias  
286 portadoras de ARGs, que podem se espalhar pelo solo, águas subterrâneas, rios e lagos, afetando todos os  
287 organismos presentes e chegando aos humanos (Montagner, Vidal e Acayaba, 2017).

288 Nesse contexto, a incorporação do conceito *One Health* destaca a maior gravidade do problema, pois  
289 a saúde do meio ambiente e dos animais impacta diretamente a saúde humana. A resistência pode se  
290 espalhar por meio de atividades agrícolas, de saúde, comerciais e de transporte internacional, levando ao

291 surgimento de microrganismos resistentes em populações humanas e animais, incluindo animais selvagens  
292 que nunca receberam terapia antimicrobiana (Jechalke et al., 2014).

293 Os resultados deste estudo reforçam a importância do monitoramento constante dos perfis de  
294 resistência antimicrobiana na microbiota desses animais e do solo ao redor. A resistência antibiótica  
295 observada em bactérias comensais como *E. coli* e bactérias ambientais isoladas neste estudo pode servir  
296 como indicadores de pressão seletiva e apontar para agentes de resistência emergentes comumente usados  
297 em antimicrobianos afetando todos os organismos presentes e chegando aos humanos (Montagner, Vidal e  
298 Acayaba, 2017).

299

### 300 **Referências**

301

302 AbuOun M, O'Connor HM, Stubberfield EJ, Nunez-Garcia J, Sayers E, Crook DW, Smith RP, Anjum MF  
303 (2020) Characterizing antimicrobial resistant *Escherichia coli* and associated risk factors in a cross-  
304 sectional study of pig farms in Great Britain. *Front Microbiol* 11:861.  
305 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00861>

306

307 Agga GE, Schmidt JW, Arthur TM (2016) Antimicrobial-resistant fecal bacteria from ceftiofur-treated and  
308 nonantimicrobial-treated commingled beef cows at a cow-calf operation. *Microb Drug Resist* 22:598–608.  
309 <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0259>

310

311 Alonso CA, Zarazaga M, Ben Sallem R, Jouini A, Ben Slama K, Torres C (2017) Antibiotic resistance in  
312 *Escherichia coli* in husbandry animals: the African perspective. *Lett Appl Microbiol* 64:318–334.  
313 <https://doi.org/10.1111/lam.12724>

314

315 Aujoulat F, Romano-Bertrand S, Masnou A, Marchandin H, Jumas-Bilak E (2014) Niches, population  
316 structure and genome reduction in *Ochrobactrum intermedium*: clues to technology-driven emergence of  
317 pathogens. *PLoS One* 9:e83376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083376>

318

319 Bahr G, González LJ, Vila AJ (2021) Metallo- $\beta$ -lactamases in the age of multidrug resistance: From  
320 structure and mechanism to evolution, dissemination, and inhibitor design. *Chem Rev* 121:7957–8094.  
321 <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00138>

322

323 Bar-On YM, Phillips R, Milo R (2018) The biomass distribution on Earth. *Proc Natl Acad Sci USA*  
324 115:6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>

325

326 Bonomo RA (2017)  $\beta$ -Lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*  
327 7:a025239. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>

328

329 de Almeida MZP, de Oliveira LGL, Afonso JAB, dos Santos Lázaro N, de Mendonça CL (2009) Influência  
330 da infecção intramamária sobre as características físico-químicas do leite de ovelhas da raça Santa Inês.  
331 Ciênc Anim Bras 10:760-765.  
332

333 De Jong A, Bywater R, Butty P, Deroover E, Godinho K, Klein U, Marion H, Simjee S, Smets K, Thomas  
334 V, Vallé M, Wheadon A (2009) A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use  
335 antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing  
336 animals. J Antimicrob Chemother 63:733–744. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp012>  
337

338 Fesseha H, Asefa I (2022) Review of Escherichia coli infections of veterinary importance. IntechOpen.  
339 <https://doi.org/10.5772/intechopen.106703>  
340

341 Gaballah MS, Guo J, Sun H, Aboagye D, Sobhi M, Muhmood A, Dong R (2021) A review targeting  
342 veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook. Bioresour  
343 Technol 333:125069. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125069>  
344

345 Hammer Ø, Harper DA (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data  
346 analysis. Palaeontol Electron 4:1.  
347

348 He T, Wang R, Liu D, Walsh TR, Zhang R, Lv Y, Ke Y, Ji Q, Wei R, Liu Z, Shen Y, Wang G, Sun L, Lei  
349 L, Lv Z, Li Y, Pang M, Wang L, Sun Q, Fu Y, Wang Y (2019) Emergence of plasmid-mediated high-level  
350 tigecycline resistance genes in animals and humans. Nat Microbiol 4:1450–1456.  
351 <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2>  
352

353 Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in  
354 soil. Trends Microbiol 22:536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>  
355

356 Kyselková M, Jirout J, Vrchotová N, Schmitt H, Elhottová D (2015) Spread of tetracycline resistance genes  
357 at a conventional dairy farm. Front Microbiol 6:536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00536>  
358

359 Lage RVDS, Costa PV, Costa LVD, Vasconcellos L, Silva SVD, Villas-Bôas MHS, Brandão MLL (2021)  
360 Diversidade de cepas de Stenotrophomonas maltophilia isoladas entre 1958 e 2021 e genotipadas por  
361 multilocus sequence typing. Rev Cienc Agr 23:45. <https://doi.org/10.52397/rcubm.v23i45.1036>  
362

363 Lederberg J (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol Rev 32:403–430.  
364 <https://doi.org/10.1152/physrev.1952.32.4.403>  
365

366 Liu JH, Zhang ML, Zhang RY, Zhu WY, Mao SY (2016) Comparative studies of the composition of  
367 bacterial microbiota associated with the ruminal content, ruminal epithelium and in the faeces of lactating  
368 dairy cows. *Microb Biotechnol* 9:257–268. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12345>  
369

370 Lopes Filho WRL, Mota AV, de Mendonça RDC A, Domingue FN, do Rêgo AC, Faturi C (2022) Buffalo  
371 milk production system in the Arari region of the Marajó archipelago, Pará. *Rev Cienc Agr* 65.  
372

373 Maciel AMD, Xavier VF (2017) Utilização de Imipenem em equinos com risco iminente de peritonite.  
374 *Sinapse Multipa*, Periódico eletrônico da PUC-Betim.  
375

376 Messele YE, Werid GM, Petrovski K (2023) Meta-analysis on the global prevalence of tetracycline  
377 resistance in *Escherichia coli* isolated from beef cattle. *Vet Sci* 10:479.  
378 <https://doi.org/10.3390/vetsci10070479>  
379

380 Montagner CC, Vidal C, Acayaba RD (2017) Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil:  
381 cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim Nova* 40:1094-1110.  
382 <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>  
383

384 Nizza S, Mallardo K, Marullo A, Iovane V, De Martino L, Pagnini U (2010) Antibiotic susceptibility of  
385 haemolytic *E. coli* strains isolated from diarrhoeic faeces of buffalo calves. *Ital J Anim Sci* 9:e26.  
386 <https://doi.org/10.4081/ijas.2010.e26>  
387

388 Noronha GN, Hess MK, Dodds KG, Silva AGM, de Souza SM, da Silva JAR, Graças DAD, de Carvalho  
389 Rodrigues TCG, da Silva WC, da Silva ÉBR, Janssen PH, Henry HM, Rowe SJ, de Castro VCG, Lourenço-  
390 Júnior JB (2023) Characterization of the ruminal microbiome of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) kept in  
391 different ecosystems in the Eastern Amazon. *Animals* 13:3858. <https://doi.org/10.3390/ani13243858>  
392

393 Sabino YNV, Santana MF, Oyama LB, Santos FG, Moreira AJS, Huws SA, Mantovani HC. (2019).  
394 Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nature*  
395 *communications*, 10:5252. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>  
396

397 Sawant AA, Hegde NV, Straley BA, Donaldson SC, Love BC, Knabel SJ, Jayarao BM (2007)  
398 Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 73:156–163.  
399 <https://doi.org/10.1128/AEM.01551-06>  
400

401 Sivagami K, Vignesh VJ, Srinivasan R, Divyapriya G, Nambi IM. (2020). Antibiotic usage, residues and  
402 resistance genes from food animals to human and environment: An Indian scenario. *Journal of Environment*  
403 *Chemical Engineering*, 8:102221. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.029>  
404

405 Sousa ATHI, Makino H, Bruno VCM, Candido SL, Nogueira BS, Menezes IG, Dutra V (2019)  
406 Antimicrobial resistance profile of *Klebsiella pneumoniae* isolated from domestic and wild animals. *Arq*  
407 *Bras Med Vet Zootec* 71:584-593.  
408

409 Steiner V, Rosel AC, Ruppitsch W, Allerberger F, Carranza Valencia A, Markovic M, Luckschander-Zeller  
410 N, Szostak MP, Spergser J, Loncaric I, Künzel F (2021) The first bacterial endocarditis due to  
411 *Achromobacter xylosoxidans* in a dog. *Pathogens* 10:1580. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121580>  
412

413 Sun HZ, Peng KL, Xue MY, Liu JX (2021) Metagenomics analysis revealed the distinctive ruminal  
414 microbiome and resistive profiles in dairy buffaloes. *Animal Microbiome* 3:44.  
415 <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00103-6>  
416

417 Vega S, Dowzicky MJ (2017) Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative  
418 organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline  
419 Evaluation and Surveillance Trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16:1-16.  
420 <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0222-0>  
421

422 Wang H, Qi JF, Qin R, Ding K, Graham DW, Zhu YG (2023) Intensified livestock farming increases  
423 antibiotic resistance genotypes and phenotypes in animal feces. *Commun Earth Environ* 4:123.  
424 <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00790-w>  
425

426 Wang X, Li Z, Feng T, Luo X, Xue L, Mao C, Cui K, Li H, Huang J, Huang K, Rehman SU, Shi D, Wu D,  
427 Ruan J, Liu Q (2022) Chromosome-level genome and recombination map of the male buffalo. *GigaScience*  
428 12:giad063. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giad063>  
429

430 WOAHA. World Organisation for Animal Health (2021) List of antimicrobial agents of veterinary  
431 importance. Paris. [https://www.woah.org/en/document/list-of-antimicrobial-agents-of-veterinary-](https://www.woah.org/en/document/list-of-antimicrobial-agents-of-veterinary-importance/)  
432 [importance/](https://www.woah.org/en/document/list-of-antimicrobial-agents-of-veterinary-importance/). Accessed: 09 June 2024.  
433

434 Wollein Waldetoft K, Sundius S, Kuske R, Brown SP (2023) Defining the benefits of antibiotic resistance  
435 in commensals and the scope for resistance optimization. *mBio* 14:e01349-22.  
436 <https://doi.org/10.1128/mbio.01349-22>  
437

438 Young W, Hine BC, Wallace OA, Callaghan M, Bibiloni R (2015) Transfer of intestinal bacterial  
439 components to mammary secretions in the cow. *PeerJ* 3:e888. <https://doi.org/10.7717/peerj.888>  
440  
441  
442  
443

444 **Declarações e Afirmações**

445

446 *Financiamento:* Este artigo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
447 Superior (CAPES) por meio de bolsa de doutorado concedida a AL (número da bolsa 88887.633228/2021-  
448 00).

449

450 *Conflito de interesses:* Os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes a declarar.  
451 *Contribuições dos Autores:* O trabalho foi concebido por RV, JM, BM, RP, OA e AL. AL, RS, SS e JG  
452 foram responsáveis por supervisionar a amostragem. AL, OA, RS, SS e JG cuidaram das análises  
453 microbiológicas. AL, OA, RR, WO e JM foram responsáveis pela interpretação dos resultados. O  
454 manuscrito foi escrito principalmente por AL, HR, OA, WO e JM. Todos os autores aprovaram a versão  
455 final.

456

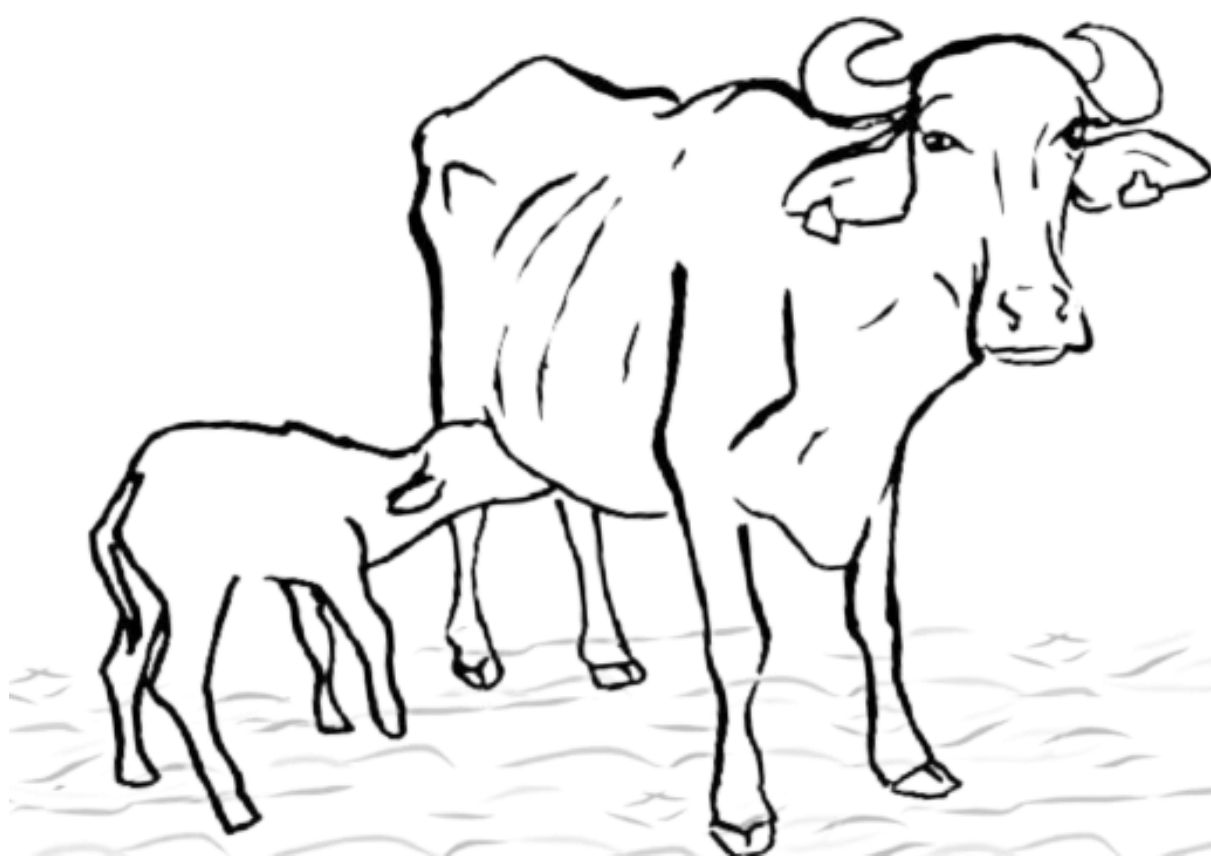
457 *Agradecimentos:* Os autores agradecem ao proprietário dos animais, ao Centro de Compostos Bioativos da  
458 Amazônia - CVACBA e à Universidade Federal do Pará - UFPA pela infraestrutura laboratorial, bem como  
459 ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Médica - LImm e ao Laboratório de Imunobiotecnologia,  
460 ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, onde os experimentos foram conduzidos.  
461 Agradecemos também à CAPES, FAPESPA, CNPq e PROPESP/UFPA, todos do Brasil, pelo apoio  
462 financeiro.

463

464 *Aprovação ética:* Este estudo foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da  
465 Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) aprovado sob o número de registro 6612040821. Todos  
466 os requisitos da Lei Federal Brasileira 11.794/08 (Lei Arouca) foram atendidos, respeitando os Princípios  
467 Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal -  
468 CONCEA.

469

CONCLUSÃO  
GERAL



## **CONCLUSÕES GERAIS**

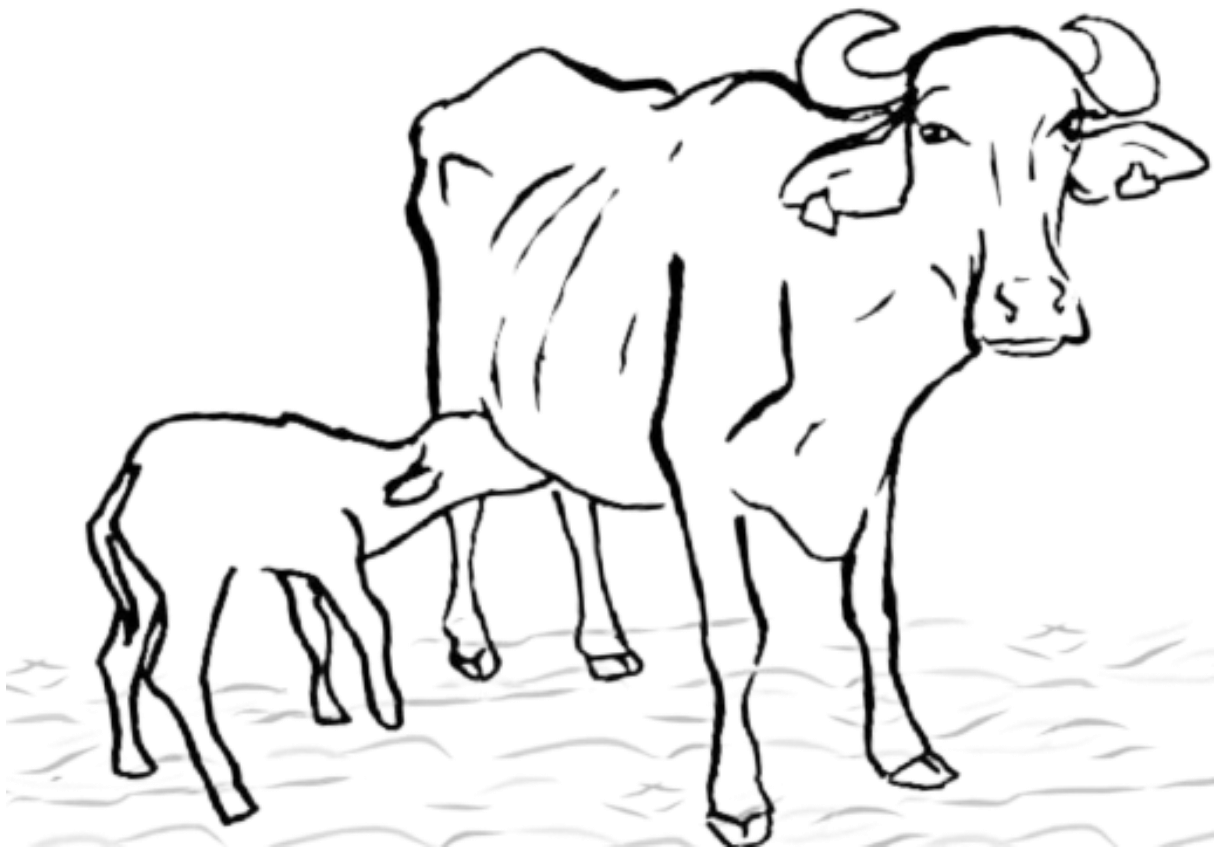
No primeiro artigo, apesar da contagem de células somáticas do leite apresentar diferenças significativas entre novilhas e vacas, os microbiomas, tanto do leite quanto das fezes, mostraram semelhança entre animais de diferentes idades.

Foi possível observar o compartilhamento de famílias no microbioma do leite e das fezes búfalas e saliva de seus bezerros, fortalecendo a ideia de interação de microbiana entre eles.

No segundo artigo, foi observada resistência aos antimicrobianos estudados, frente a cepas Gram-negativas isoladas de fezes de búfalas, bezerros e solo do pasto. Perfis de resistência mostraram similaridade entre animais adultos e bezerros com o solo. Houve também a identificação de similaridade entre os bezerros e suas mães, sugerindo um compartilhamento de cepas resistentes entre gerações e dos animais com o solo.



REFERÊNCIAS  
GERAIS



## REFERÊNCIAS GERAIS

ABDEL-HAMID, M.; HUANG, L.; HUANG, Z.; ROMEIH, E.; YANG, P.; ZENG, Q.; LI, L. Effect of Buffalo Breed on the Detailed Milk Composition in Guangxi, China. **Foods**, v.12, n.8, p.1603, 2023.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. Quem somos. [S. l.]: ABCB, 2023. Disponível em: <https://www.bufalo.com.br/home/acbc/>.

AURICH, S.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; EWERS, C. Prevalence and antimicrobial resistance of bacterial uropathogens isolated from dogs and cats. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1730, 2022.

BAKER, J. L.; MARK WELCH, J. L.; KAUFFMAN, K. M.; MCLEAN, J. S.; HE, X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. **Nature Reviews Microbiology**, v.22, n.2, p.89-104, 2024.

BATY, J. J.; STONER, S. N.; SCOFFIELD, J. A. Oral commensal streptococci: gatekeepers of the oral cavity. **Journal of Bacteriology**, v.204, n.11, 2022.

BECSKEI, Z.; SAVIC, M.; CIRKOVIC, D.; RASETA, M.; PUVACA, N.; PAJIC, M.; PASKAS, S. Assessment of water buffalo milk and traditional milk products in a sustainable production system. **Sustainability**, v.12, n.16, p 6616, 2020.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell** v.157, p. 121–141, 2014.

BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D., CERNAVA, T., VERGÈS, M. C. C., CHARLES, T.; SCHLOTTER, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v.8, p.1-22, 2020.

BORGHESE, A.; MOIOLI, B. Buffalo: Mediterranean Region. *In* Elsevier Public Health Emergency Collection, 2016, Update of Buffalo Mediterranean Region. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd ed.; Borghese, A., Moioli, B., Eds.; **Elsevier Ltd**, p. 780–784, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, DF: Seção 1, 30 nov. 2018.

BUIATTE, V.; FONSECA, A.; ALONSO MADUREIRA, P.; NAKASHIMA VAZ, A. C.; TIZIOTO, P. C.; CENTOLA VIDAL, A. M.; DE AZEVEDO RUIZ, V. L. A comparative study of the bacterial diversity and composition of nursery piglets' oral fluid, feces, and housing environment. **Scientific reports**, v.14, n.1, p.4119, 2024.

BUSH, Karen. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.62, n.10, 2018.

CASTILLO-LOPEZ, E.; DOMÍNGUEZ-ORDÓÑEZ, M. G. Factors affecting the ruminal microbial composition and methods to determine microbial protein yield. Review. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v.10, n.1, 2019.

CATOZZI C, BONASTRE A S, FRANCINO O, LECCHI C, CARLOS E C, VECCIO D, MARTUCCIELLO A, FRAULO P, BRONZE V, CUSCO A, D' ANDREANO S, CECILIANI F. The Microbiota of water buffalo milk during mastitis. **Plos One**, 2017.

CATOZZI, C.; CECILIANI, F.; LECCHI, C.; TALENTI, A.; VECCHIO, D.; DE CARLO, E.; CUSCÓ, A. Milk microbiota profiling on water buffalo with full-length 16S rRNA using nanopore sequencing. **Journal of dairy science**, v.103, n.3, p.2693-2700, 2020.

CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUÑOZ-BERROCAL, M.; JURADO-GÁMEZ, H. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. **Journal Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2885–2889, 2002.

CRAIG W.A., ANDES D.R. Cephalosporins. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Edited by: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. **Elsevier**, p.278-292, 2015.

CURELLO, J.; MACDOUGALL, C. Beyond susceptible and resistant, part II: treatment of infections due to Gram-negative organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v.19, n.3, p.156-164, 2014.

DA SILVA, J. A. R.; GARCIA, A. R.; DE ALMEIDA, A. M.; BEZERRA, A. S.; DE BRITO LOURENÇO JUNIOR, J. Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: A review. **Tropical Animal Health and Production**, v.53, n.3, p.343, 2021.

DOS SANTOS, C. S.; DE ALBUQUERQUE, A. S.; DE MACÊDO CHAVES, R.; BEZERRA, D. C.; MELO, R. S.; DE SOUSA RODRIGUES, V.; MINEIRO, A. L. B. B.; DE SOUZA, J. A. T. Distribuição de partos e indicadores reprodutivos em fêmeas bubalinas no Município de São Mateus—MA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.4, p. 302, 2020.

DURSO, L. M.; HARHAY, G. P.; SMITH, T. P.; BONO, J. L.; DESANTIS, T. Z.; HARHAY, D. M.; CLAWSON, M. L. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. **Applied and environmental microbiology**, v.76, n.14, p.4858-4862, 2010.

FERROCINO, I.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Investigating dairy microbiome: an opportunity to ensure quality, safety and typicity. **Current Opinion in Biotechnology**, v.73, p.164-6, 2021.

GUSTAVSSON, F.; BUITENHUIS, A. J.; JOHANSSON, M.; BERTELSEN, H. P.; GLANTZ M.; POULSEN, N. A.; LINDMARK MÅNSSON, H.; STÅLHAMMAR, H.; LARSEN, L. B.; BENDIXEN C.; et al. Effects of Breed and Casein Genetic Variants on Protein Profile in Milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey Cows. **Journal Dairy in Science**, v. 97, p.3866-3877, 2014.

HARTMANN, M.; FREY, B.; MAYER, J.; MÄDER, P.; WIDMER, F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. **The ISME journal**, v.9, n.5, p.1177-1194, 2015.

HELLWEGER, L. F.; RUAN, X.; SANCHES, S. **A simple model of tetracycline antibiotic resistance in the aquatic environment (with application to the poudre river)**. Center for Urban environmental studies, Departament of civil & environmental engineering, v.481, p.480-497, 2011.

HOLMAN, D. B.; GZYL, K. E. A meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota. **FEMS microbiology ecology**, v.95, n.6, 2019.

IFD. Bulletin of the IDF N° 512/2021: **The World Dairy Situation 2021**. IFD,2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho de Búfalos no Brasil**. 2023. Disponível em:< <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bubalinos/br>>. Acessado em: 12 de maio de 2024.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, 2021.

JORGE, A.M.; ANDRIGUETTO, C.; STRAZZA, M.A.B; et al. Correlação entre *Califórnia Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas no leite de búfalas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

JURJANZ, S.; FEIDT, C.; PÉREZ-PRIETO, L. A.; RIBEIRO FILHO, H. M. N.; RYCHEN, G.; DELAGARDE, R. (2012). Soil intake of lactating dairy cows in intensive strip grazing systems. **Animal**, v.6, n.8, p.1350-1359, 2020.

KABLE, M. E.; SRISENGFA, Y.; LAIRD M.; ZARAGOZA, J.; MCLEOD, J.; HEIDENREICH, J.; MARCO, M. L.; KABLE, C. M. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility, **ASM Journal mBio**, v.7, n.4, 2016.

KAPADIYA, D. B.; PRAJAPATI, D. B.; JAIN, A. K.; MEHTA, B. M., DARJI, V. B., APARNATHI, K. D. Comparison of Surti Goat Milk with Cow and Buffalo Milk for Gross Composition, Nitrogen Distribution, and Selected Minerals Content. **Veterinary World**, v.9, p. 710-716, 2016.

KHEDKAR, C. D.; KALYANKAR, S. D.; DEOSARKAR, S. S. Buffalo Milk. In the Encyclopedia of Food and Health; Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F., Eds.; **Academic Press: Oxford**, p. 522–528, 2016.

LEE, Y. H.; CHUNG, S. W.; AUH, Q. S.; HONG, S. J.; LEE, Y. A.; JUNG, J.; HONG, J. Y. Progress in oral microbiome related to oral and systemic diseases: an update. **Diagnostics**, v.11, n.7, p.1283, 2021.

LI, L. P.; PENG, K. L.; XUE, M. Y.; ZHU, S. L.; LIU, J. X.; SUN, H. Z. An age effect of rumen microbiome in dairy buffaloes revealed by metagenomics. **Microorganisms**, v.10, n.8, p.1491, 2022.

LIDDICOAT, C.; SYDNOR, H.; CANDO-DUMANCELA, C.; DRESKEN, R.; LIU, J.; GELLIE, N. J.; BREED, M. F. Naturally-diverse airborne environmental microbial exposures modulate the gut microbiome and may provide anxiolytic benefits in mice. **Science of the total environment**, v.701, 2020.

LOPES FILHO, W. R. L.; MOTA, A. V.; DE MENDONÇA, R. D. C. A.; DOMINGUE, F. N.; DO RÊGO, A. C.; FATURI, C. Buffalo milk production system in the Arari region of the Marajó archipelago, Pará. **Revista de Ciências Agrárias-Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v.65, 2022.

LUZIATELLI, F.; MELINI, F.; FICCA, A. G.; MELINI, V.; NARDILLI, F.; RUZZI, M. Core microbiome and bacterial diversity of the Italian Mediterranean river buffalo milk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.107, n.5, p.1875-1886, 2023.

MANE, B. G.; CHATLI, M. K. Buffalo milk: Saviour of farmers and consumers for livelihood and providing nutrition. **Agricultural Rural Development**, v.2, p.5-11, 2015.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v.3, p.1-3, 2015.

MINERVINO, A. H. H.; ZAVA, M.; VECCHIO, D.; BORGHESE, A. Bubalus bubalis: A short story. **Frontiers in veterinary science**, v.7, p.570413, 2020.

MYER, P. R.; SMITH, T. P.; WELLS, J. E.; KUEHN, L. A.; FREETLY, H. C. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.

NASCIMENTO, A. J. D. S. N.; DE NARDI JUNIOR, G.; DE OLIVEIRA, P. A.; BARBOSA-FANTIN, B. R.; DANTAS, A. Bubalinocultura no Brasil: principais raças, características e importancia ao agronegócio. **Peer Review**, v.5, n.3, p.19-30, 2023.

NEGLIA, G.; COTTICELLI, A.; VASSETTI, A.; MATERA, R.; STAROPOLI, A.; VINALE, F.; CAMPANILE, G. Buffalo milk and rumen fluid metabolome are significantly affected by green feed. **Scientific Reports**, v.13, n.1, p.1381, 2023.

NETO, O. J. D. A. G.; PEREIRA, D. R.; MOURA, L. S. P.; DE MIRANDA, R. D. C. M. A distribuição dos Bubalinos no mundo, no Brasil, e a realidade atual da espécie no Maranhão. **Conjecturas**, v.22, n.11, p.948-970, 2022.

NGUYEN, F.; STAROSTA, A. L.; ARENZ, S.; SOHMEN, D.; DÖNHÖFER, A.; WILSON D. N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biology Chemical**, v.395, n.5, p.559-75, 2014.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v.17, n.10, p.1791, 2011.

NORONHA, G. N.; HESS, M. K.; DODDS, K. G.; SILVA, A. G. M. E.; DE SOUZA, S. M.; DA SILVA, J. A. R.; LOURENÇO-JÚNIOR, J. D. B. Characterization of the Ruminal Microbiome of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Kept in Different Ecosystems in the Eastern Amazon. **Animals**, v. 13, n.4, p.3858, 2023.

NORONHA, G.N.; HESS, M.K.; DODDS, K.G.; SILVA, A.G.M.E.; DE SOUZA, S.M.; DA SILVA, J.A.R.; GRAÇAS, D.A.D.; DE CARVALHO RODRIGUES, T.C.G.; DA SILVA, W.C.; DA SILVA, É.B.R. Characterization of the Ruminal Microbiome of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Kept in Different Ecosystems in the Eastern Amazon. **Animals**, v.13, n.3858, 2023.

OLIVEIRA, M. N.; JEWELL, K. A.; FREITAS, F. S.; BENJAMIN, L. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; SUEN, G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 307-314, 2013.

RAINARD, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? **Veterinary Research**, v.48, n.25, 2017.

SAHIN, A.; YILDIRIM, A.; ULUTAS, Z. The effects of stage of lactation, parity and calving season on somatic cell counts in Anatolian Water Buffaloes. **Indian Journal Animal Science**, v.51, n.1, p.35-39, 2017.

SAHIN, A.; YILDIRIM, A.; ULUTAS, Z.; UGURLUTEPE, E. The effects of stage of lactation, parity and calving season on somatic cell counts in Anatolian Water Buffaloes. **Indian Journal Animal Research**, v.51, n.1, p. 35-39, 2017.

SALMAN, M. M; NAWAZ, M.; YAQUB, T.; MUSHTAQ, M. H. Exploring the Milk Microbiota of Healthy and Mastitic Nili Ravi Buffalo Using 16S rRNA Gene Base Metagenomic Analysis. **Animals**, v.13, n.2298, 2023.

SANTOS, C. S., ALBUQUERQUE, A. S., CHAVES, R. M., BEZERRA, D. C., MELO, R. S., RODRIGUES, V. S., MINEIRO, A. L. B. B., SOUZA, J. A. T. Distribuição de partos e indicadores reprodutivos em fêmeas bubalinas no Município de São Mateus – MA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.4, p.302- 303, 2016.

SCHMITZ, F. J.; FLUIT, A. C. Mechanisms of bacterial resistance. In: *Infectious diseases*. Third Edition, 2010.

SHARMA, N., SINGH, N. K., & BHADWAL, M. S. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, n.3, p.429-438, 2011.

SHINDE, D. B.; MAHORE, J. G.; GIRAM, P. S.; SINGH, S. L.; SHARDA, A.; CHOYAN, D.; MUSALE, S. Microbiota of Saliva: A Non-invasive Diagnostic Tool. **Indian Journal of Microbiology**, p.1-15, 2024.

SILVA, N., *et al.* Ocorrência de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas em sistema extensivo no estado do Pará, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, supl. 2, p. 839-846, 2014.

SMITH, R. P.; MAY, H. E.; ABUOUN, M.; STUBBERFIELD, E.; GILSON, D.; CHAU, K. K.; ANJUM, M. F. A longitudinal study reveals persistence of antimicrobial resistance on livestock farms is not due to antimicrobial usage alone. **Frontiers in Microbiology**, v.14, 2023.

SONG, W.; KIM, J. S.; KIM, H. S.; YONG, D.; JEONG, S. H.; PARK, M. J.; LEE, K. M. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.55, n.3, p.219-224, 2006.

VANEGAS-MÚNERA, J.M., JIMÉNEZ-QUICENO, J.N. 2020. Antimicrobial resistance in the XXI century: rumors of a post-antibiotic era? **Revista Facultad Nacional de Salud Pública** v.38, n.1, 2020.

VIEIRA, J. N.; TEIXEIRA, C. S.; KUABARA, M. E. U.; DE OLIVEIRA, D. A; A Bubalinocultura no Brasil. **Pubvet**, v.5, p.1003, 2011.

XIN-XIN ZHANG, ZHI-GAO AN, KAI-FENG NIU, CHAO CHEN, TING-ZHU YE, AFTAB SHAUKAT, LI-GUO YANG. Evaluation of type traits in relation to production, and their importance in early selection for milk performance in dairy buffaloes. **Animal, Veterinary**, v.16, n. 11, 2022.

YOSHIZAWA, J. M.; SCHAFER, C. A.; SCHAFER, J. J.; FARRELL, J. J.; PASTER, B. J.; WONG, D. T. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. **Clinical microbiology reviews**, v.26, n.4, p.781-791, 2013.

YOUNG, W.; HINE, B. C.; WALLACE, O. A. M.; CALLAGHAN, M.; BIBILONI, R. Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v.3, n. e888, p.1-17, 2015.

ZHANG, Y.; COLLI, L.; BARKER, J. S. F. Asian water buffalo: domestication, history and genetics. **Animal genetics**, v. 51, n. 2, p. 177-191, 2020.