

## **.Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco**

[*Evaluation of the bacterial microbiota of the artisanal "Coalho" of cheese produced in Agreste Region of the State of Pernambuco*]

R.A. Silva<sup>1,2</sup>, P.A. Bismara<sup>2</sup>, R.B. Moura<sup>2</sup>, J.L. Lima Filho<sup>2</sup>,  
A.L.F. Porto<sup>1,2</sup>, M.T.H. Cavalcanti<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife, PE

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE

### **RESUMO**

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a qualidade microbiológica e o perfil ácido-láctico do queijo de coalho artesanal. Todas as amostras de queijo apresentaram coliformes totais, termotolerantes e presença de *Escherichia coli*, porém com os valores dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente no país. O perfil ácido-láctico estudado mostrou uma microbiota heterogênea, constituída por lactobacilos, lactococos, estreptococos e enterococos, confirmadas as espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*.

Palavras-chave: queijo de coalho artesanal, reação em cadeia da polimerase, bactérias ácido-lácticas

### **ABSTRACT**

*The aim of this study was to evaluate the microbiological quality and lactic-acid profile of artisanal coalho cheese. All cheese samples analyzed showed total coliforms, were thermotolerant, and had Escherichia coli, but all the values were within the standards established by current legislation in the country, and could be considered a food fit for human consumption. The cheese showed a heterogeneous microbiota, being constituted of all tested genus, such as lactobacilli, lactococcus, streptococcus and enterococcus, and confirmed the species: Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Streptococcus thermophilus and Lactococcus lactis.*

*Keywords: artisanal coalho cheese, polymerase chain reaction, lactic-acid bacteria*

### **INTRODUÇÃO**

A produção de queijo de coalho representa uma atividade bastante significativa para a economia regional, visto que em determinadas localidades é a principal fonte de renda e sobrevivência da população (Almeida *et al.*, 2010). No Nordeste do Brasil a maior parte da produção de queijo de coalho é realizada em pequenas e médias queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o que torna essa atividade importante tanto no âmbito social quanto no econômico (Perry, 2004).

De acordo com Almeida *et al.* (2010), o queijo de coalho é uma representação genuína da tradição e cultura do estado de Pernambuco, onde está sendo desenvolvido um trabalho de certificação desse queijo visando a uma identidade própria que irá diferenciá-lo dos demais produzidos na região Nordeste.

As propriedades organolépticas típicas e o aroma particular dos queijos obtidos com leite cru, tais como o queijo de coalho artesanal, estão associados com atributos do próprio leite, relacionados à raça e ao tipo de nutrição das vacas, ao processo de fabricação básico do queijo tradicional e à microbiota natural autóctone,

---

Recebido em 1 de julho de 2011

Aceito em 7 de agosto de 2012

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: mtecvsoares@yahoo.com.br

responsáveis pela fermentação e maturação próprias da região produtora (Beresford *et al.*, 2001; Giannino *et al.*, 2009). O conhecimento sobre essa microbiota ácido-láctica especial é importante para assegurar qualidade, autenticidade e rastreabilidade do produto artesanal, com indicação de origem e proteção de origem controlada (Giannino *et al.*, 2009).

O estudo da diversidade microbiana desses produtos artesanais está sendo realizado com o auxílio de técnicas que utilizam o DNA, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), e independentemente de cultura. A amplificação de regiões específicas por meio de *primer* promove a identificação de gêneros e espécies, garantindo maior rapidez nos resultados (Dolci *et al.*, 2008a; Giannino *et al.*, 2009).

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi analisar a microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal da região Agreste de Pernambuco, quanto à qualidade microbiológica e ao perfil ácido-lático.

## MATERIAL E MÉTODOS

O queijo de coalho artesanal foi coletado em unidades fabris com selo da Adagro-PE (Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco), pronto para a comercialização, nos meses de março e julho de 2008, nos municípios de Venturosa, Correntes, Capoeiras e Arcoverde, e em duas unidades sem registro, situadas em São Bento do Una e Cachoeirinha, todos localizados na região Agreste de Pernambuco. O produto foi acondicionado em caixas isotérmicas e imediatamente transportado para o laboratório, onde estas foram mantidas a 10°C, até o momento das análises.

As amostras de queijo utilizadas foram analisadas quanto à qualidade microbiológica para coliformes totais – AOAC/2002 (Association..., 2002a) e para coliformes termotolerantes – AOAC/2002 (Association..., 2002b).

Para avaliar o perfil das bactérias ácido-láticas das amostras coletadas, os queijos foram dissolvidos em solução citrato trissódico esterilizado, 2% p/v, na proporção de 1g de queijo para 9mL de solução, maceradas

manualmente com a ajuda de um almofariz e pistilo até se obter um homogenato, que foi posteriormente centrifugado a 25.758xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente macerado. Essa operação foi realizada por três vezes. O precipitado encontrado ao final foi utilizado para identificar o perfil de bactérias ácido-láticas com *primer* espécie-específicos (Tab. 1) na técnica de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase, incluindo as etapas de desnaturação inicial a 94°C por 3min, 30 ciclos completos de 1 minuto ao total, divididos em desnaturação a 94°C, anelamento com temperatura variável de acordo com o *primer* usado e extensão a 72°C; e um passo final de extensão a 72°C por 5min. Após a amplificação, o material foi visualizado por meio de eletroforese, preparada na concentração de 1% de agarose dissolvida em tampão TEB (89 mM Trizma base, 89 mM ácido bórico, 20 mM EDTA) pH 8,0, corado com Gel Red (Uniscience do Brasil, São Paulo Ltda.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação da qualidade microbiológica do queijo de coalho estão apresentados na Tab. 2. Todas as amostras de queijos avaliadas apresentaram coliformes totais e termotolerantes, sendo confirmada a presença de *Escherichia coli* em 100% delas. Os coliformes totais variaram no mínimo de 2,82 x 10<sup>2</sup> NMP/g para o queijo do município de Arcoverde e no máximo de 1,09 x 10<sup>3</sup> NMP/g para o queijo de Capoeiras. Os coliformes termotolerantes apresentaram valores no mínimo de 1NMP/g para os municípios de Arcoverde, Correntes e São Bento do Una, e no máximo de 8,78 NMP/g para Cachoeirinha. Entretanto, todos os valores estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente RDC 12 (Brasil, 2001), que apresenta o limite de tolerância para coliformes termotolerantes de 5,0 x 10<sup>2</sup> NMP/g de amostra e 5,0 x 10<sup>2</sup> NMP/g para coliformes totais. Resultados semelhantes foram encontrados por Feitosa *et al.* (2003), que, ao estudarem microrganismos indicadores de higiene em queijos produzidos no Rio Grande do Norte, constataram a presença de coliformes termotolerantes em 36,4% das amostras estudadas, 3 a 7NMP/g, dentro do limite descrito na legislação. Duarte *et al.* (2005), quando estudaram microrganismos indicadores de higiene em queijos de coalho produzidos e

comercializados em Pernambuco, encontraram coliformes termotolerantes em valores acima do aceitável em 44,10% das amostras avaliadas; Oliveira *et al.* (2010), quando estudaram a qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, em Pernambuco, encontraram 80,95% das amostras estudadas com valores

superiores a 500NMP/g, acima do limite estabelecido pela legislação vigente, sendo observada a presença de *E. coli* em 64,29% dessas amostras. Todos os autores citados acima atribuíram os resultados obtidos à falta de condições higiênico-sanitárias adequadas na produção e/ou na comercialização desses produtos.

Tabela 1. *Primers* espécie-específicos usados para caracterizar o perfil bacteriano ácido-láctico dos queijos de coalho produzidos nos municípios estudados na região Agreste do estado de Pernambuco

Primer	Sequência (5' para 3')	Alvo específico	Produto do PCR (pb)	Referência
Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	Enterococos	252	Ke <i>et al.</i> , 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
EM1A	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	<i>Enterococcus faecium</i>	658	Cheng <i>et al.</i> , 1997
EM1B	TATGACAGCGACTCCGATTCC			
E1	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	<i>Enterococcus faecalis</i>	635	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
E2	ACGATTCAAAGCTAACTG			
St1	CACTATGCTCAGAATACA	<i>Streptococcus thermophilus</i>	968	Lick <i>et al.</i> , 1996
St2	CGAACAGCATTGATGTTA			
His1	CTTCGTTATGATTTTACA	<i>Lactococcus lactis</i>	933	Corroler <i>et al.</i> , 1999
His2	CAATATCAACAATTCCAT			
IRL	TTTGAGAGTTTGATCCTGG	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	860	Pu <i>et al.</i> , 2002
PipLraR	CGTCACTGAGGGCTGGAT TGCACTGAGATTGACTTAA	<i>Lactobacillus casei</i>	550	Ward e Timmins, 1999

Tabela 2. Análises microbiológicas dos queijos de coalho artesanais provenientes dos municípios estudados na região Agreste do estado de Pernambuco

Amostra	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)
Arcoverde	2,82x10 <sup>2</sup>	<1
Cachoeirinha	12,59x10 <sup>2</sup>	8,78x10
Capoeiras	1,09x10 <sup>3</sup>	6,99x10
Correntes	1,46x10 <sup>2</sup>	<1
São Bento do Una	7,63x10 <sup>2</sup>	<1
Venturosa	3,8x10 <sup>2</sup>	3,0x10

Com o objetivo de conhecer quais as principais espécies que interagem promovendo o sabor inigualável do queijo de coalho artesanal da região Agreste do estado de Pernambuco, a sua microbiota ácido-láctica foi avaliada. Os resultados obtidos da avaliação da microbiota láctica estão apresentados nas Fig. 1A a 1F. A população bacteriana desse queijo é heterogênea, haja vista que todos os gêneros e espécies

testados foram encontrados, sendo, portanto, o sabor diferenciado presente no produto em decorrência dessa associação microbiana. Além disso, a intensidade das bandas encontradas está relacionada à quantidade de bactérias de cada tipo, pois a própria população bacteriana extraída diretamente do queijo foi usada como amostra para a identificação por biologia molecular.

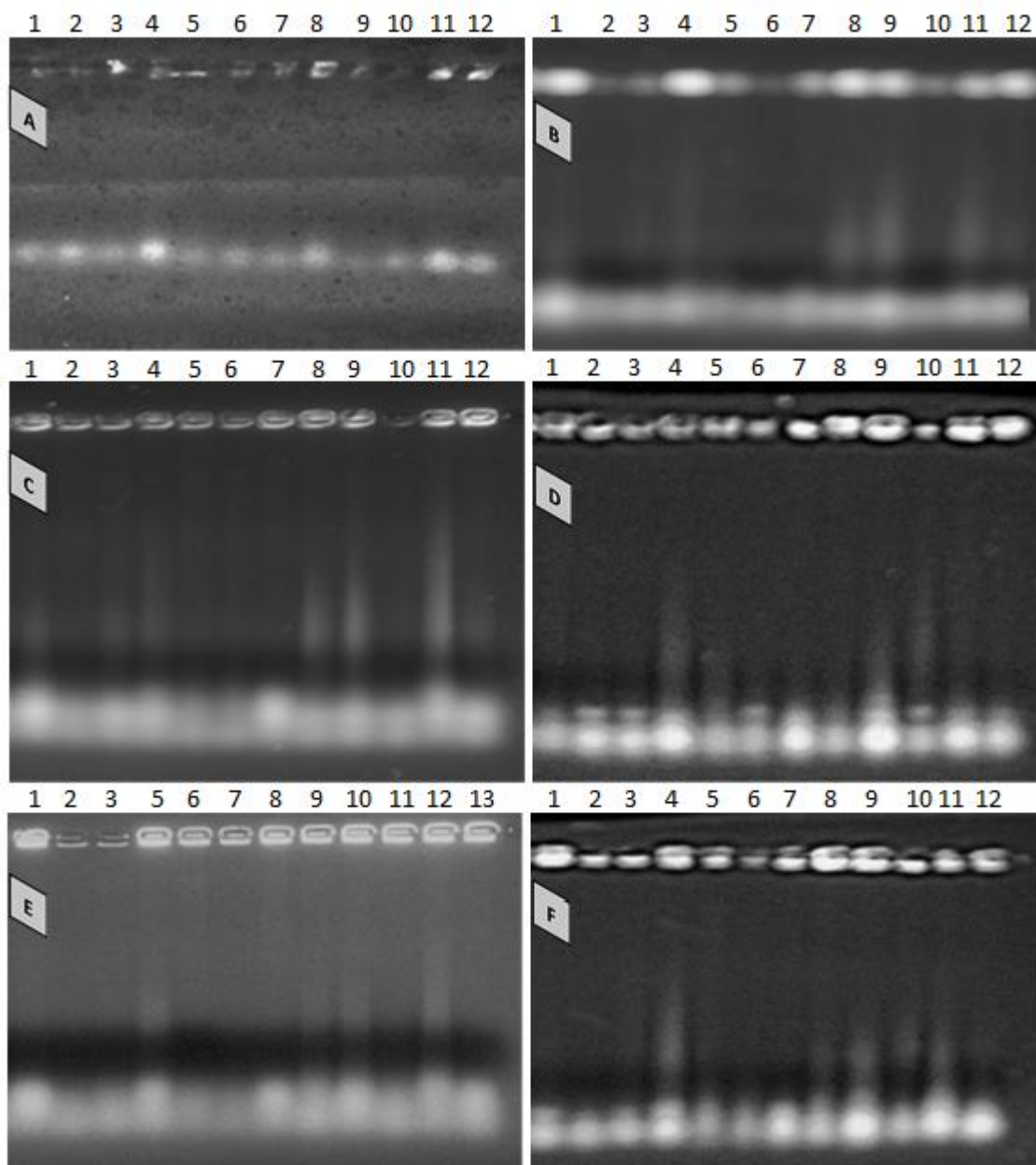


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos em (PCR) reação em cadeia da polimerase. (A) *primer* gênero específico para lactobacilos. (B) *primer* espécie-específico para *Enterococcus faecalis*. (C) *primer* espécie-específico para *Enterococcus faecium*. (D) *primer* gênero específico para Enterococos. (E) *primer* espécie-específico para *Streptococcus thermophilus* e (F) *primer* espécie-específico para *Lactococcus lactis*. Os poços (1-6) março/2008: Cachoeirinha, Arcoverde, São Bento do Una, Capoeiras, Correntes e Venturosa. Os poços (7-12) amostras de julho/2008: Cachoeirinha, Arcoverde, São Bento do Una, Capoeiras, Correntes e Venturosa.

Esse tipo de interação, entre gêneros e espécies, não é privilégio do queijo de coalho, mas está presente em vários produtos artesanais. Assim, de acordo com Ogier *et al.* (2004), vários produtos lácteos representam um ecossistema

microbiano complexo, associados à grande diversidade de sabores, aromas e texturas. Muitas bactérias contribuem para a qualidade organoléptica dos queijos ou leites fermentados.

Tem se estudado a diversidade bacteriana sempre associando um ecossistema complexo às características organolépticas diferenciadas nestes produtos, semelhante ao estudo deste trabalho, em que os principais gêneros de bactérias ácido-láticas estão presentes e formam uma comunidade estrategicamente organizada. Serhan *et al.* (2009), ao estudarem a diversidade bacteriana presente em um queijo artesanal libanês produzido com leite cru de cabra, afirmaram que, entre as bactérias ácido-láticas, os gêneros mais encontrados foram *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e que queijos produzidos com leite cru e seguindo processos tradicionais de fabricação apresentam diversidade microbiológica, que precisa ser conhecida para que haja a manutenção de produtos artesanais típicos com tradição cultural. Vale ressaltar que essa mesma associação foi observada nas amostras de queijo de coalho deste estudo.

A Fig. 1A corresponde aos resultados obtidos para o gênero *Lactobacillus*, obtendo-se confirmação em 100% das amostras analisadas. A presença desse microrganismo é comum em produtos derivados de leite, sendo importante na qualidade organoléptica deles. No estudo de Serhan *et al.* (2009), 44,9% das amostras isoladas e identificadas por métodos clássicos foram *Lactobacillus curvatus* e *L. plantarum*, sendo este último confirmado por eletroforese com gradiente de temperatura (TGGE) como a principal espécie de lactobacilos no queijo Darfiyeh. Na sequência, as Fig. 1B, C e D apresentam os resultados obtidos na eletroforese dos produtos de PCR para *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* e o gênero *Enterococcus*, com 100% de confirmação nas amostras analisadas.

Estes resultados se assemelham aos de vários relatos sobre a análise da microbiota de queijos de origem artesanal em várias partes do mundo, como o queijo São Jorge, produzido em Portugal (Kongo *et al.*, 2007), queijo Raschera, proveniente da Itália (Dolci *et al.*, 2008b), Darfiyeh, encontrado na Líbia (Serhan *et al.*, 2009), queijos espanhóis artesanais de leite de cabra (Martín-Platero *et al.*, 2009), queijo Fontina, originado da Itália (Giannino *et al.*, 2009), e queijo Istriano, presente na Croácia (Fuka *et al.*, 2010). Esses autores sempre relacionaram as espécies do gênero enterococos

aos aspectos organolépticos dos produtos artesanais, ressaltando a participação na maturação dos queijos. Segundo Beresford *et al.* (2001), especialmente nos queijos da região mediterrânea, há efeito forte e positivo sobre o desenvolvimento de aromas e sabores.

A interação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* com outras bactérias ácido-láticas também é importante para a formação dos produtos artesanais, como observaram Kongo *et al.* (2007), que identificaram as espécies de bactérias ácido-láticas dominantes presentes no queijo São Jorge, um queijo típico português. Os resultados indicaram que *Lactobacillus* seguidos pelos *Enterococcus* foram os gêneros dominantes. As espécies mais frequentes foram *Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus*, *E. faecalis* e *E. faecium*. Outro queijo artesanal em que há associação dos enterococos com outras bactérias ácido-láticas é o queijo Darfiyeh, estudado por Serhan *et al.* (2009). Esses autores encontraram os enterococos fazendo parte da microbiota do produto analisado, apresentando esse fato como comum para os queijos da região mediterrânea produzidos com leite cru de várias espécies animais. Esses autores citam o *E. faecium* e o *Lactococcus lactis* subs. *lactis* como os principais microrganismos responsáveis pelas características peculiares desse tipo de queijo. Fuka *et al.* (2010) também encontraram os enterococos participando ativamente da microbiota do queijo Istriano e reconheceram a importância desse gênero como responsável pelo sabor e aroma típicos desse produto.

Os resultados apresentados na Fig. 1E demonstram que em 100% das amostras de queijo testadas para *Streptococcus thermophilus* foi encontrado DNA dessa bactéria. Esse microrganismo também está presente em outros queijos artesanais, tais como no queijo italiano Toma piemontese de denominação de origem. Fortina *et al.* (2003), ao utilizarem o mesmo *primer* descrito neste trabalho, identificaram *S. thermophilus* como componente minoritário da microbiota característica, e Ercolini *et al.* (2008) encontraram no queijo Caciocavallo silano, um queijo italiano artesanal com denominação de origem protegida (PDO), *S. thermophilus* como parte da microbiota específica do produto.

Os resultados obtidos para lactococos mostraram a presença em 100% das amostras testadas

(Fig. 1F), sendo a espécie *Lactococcus lactis* subs. *lactis* confirmada por meio de PCR. Este dado é importante, pois, de acordo com Flórez *et al.* (2006), o *L. lactis* é uma bactéria ácido-láctica usada mundialmente como um organismo iniciador em indústrias lácticas para a fabricação e maturação de queijos e outros produtos fermentados. O desenvolvimento do *L. lactis* no leite proporciona ótimas condições para a formação do coágulo na coagulação do leite, previne o crescimento de bactérias patogênicas e cria condições bioquímicas ideais para a maturação. Além disso, *L. lactis* participa no desenvolvimento da textura e do sabor do queijo por via proteolítica e de sistemas catabólicos de aminoácidos.

A presença de *L. lactis* subs. *lactis* é comum no leite e em produtos frescos como o queijo de coalho, pois, durante o processo de maturação, essas bactérias apresentam dificuldades fisiológicas de sobrevivência em razão de certas condições ambientais, como diminuição da atividade de água e acidificação e proteólise intensas produzidas por outras bactérias do ecossistema. Esse fato foi ressaltado por Dolci *et al.* (2008a), quando avaliaram a dinâmica da microbiota dominante durante o processo de fabricação e maturação do queijo Castelmagno (denominação protegida na origem). Esses autores analisaram amostras do leite, da massa e do queijo em diferentes estágios de maturação, sendo a identificação das espécies realizadas por PCR-DGGE, em que o *L. lactis* subs. *lactis* foi a espécie mais frequentemente encontrada durante o processo de fabricação, enquanto *L. plantarum* e *L. paracasei* foram isolados com maior frequência nos queijos maturados. Entretanto, Dolci *et al.* (2008b), quando estudaram o queijo artesanal italiano Raschera (denominação protegida na origem), encontraram *L. lactis* subs. *lactis* como bactéria principal durante todo o processo de fabricação e maturação. Dessa forma, sugere-se que a presença dessa bactéria ao longo de todo o processo de fabricação e maturação deve ser sempre analisada, pois, dependendo das condições intrínsecas do produto, ela pode ser eliminada.

## CONCLUSÕES

Esse estudo sugere que as características organolépticas do produto estão baseadas em um ecossistema heterogêneo com a interação de

todos os gêneros testados, estando a qualidade sanitária dos queijos de coalho utilizados como amostras dentro da legislação vigente.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA); à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); aos laticínios produtores de queijo de coalho dos municípios estudados do Agreste do estado de Pernambuco; aos técnicos em laticínio Benoit Paquereau e Torquato Marques dos Santos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.L.; JÚNIOR, P.G.F.; GUERRA, J.R.F. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. *RIAE - Rev. Ibero-Americana de Estratégia*, v.9, p.74-97, 2010.
- ASSOCIATION of official analytical chemists-AOAC (991.14). Coliforms and Escherichia coli Counts in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm Count Plate) Methods (3M Microbiology, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA), 2002a.
- ASSOCIATION of official analytical chemists-AOAC (986.33). Bacterial and Coliform Counts in Milk, Dry Rehydratable Film Method (3M Microbiology/3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA), 2002b.
- BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, v.11, p.259-274, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, Resolução RDC n.12, p.1-54, 02/01/2001.
- CHENG, S.; MCCLESKEY, F.K.; GRESS, M.J. *et al.* PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.49-56, 1997.
- CORROLER, D.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.51, p.91-99, 1999.

- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU, K. *et al.* Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *Int. J. Food Microbiol.*, v.122, p.302-311, 2008a.
- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G. *et al.* Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, v.25, p.392-399, 2008b.
- DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B. *et al.* Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado do Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, p.297-302, 2005.
- DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, S.P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.24-27, 1995.
- ERCOLINI, D.; FRISSE, G.; MAURIELLO, G. *et al.* Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of CaciocavalloSilano PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.124, p.164-170, 2008.
- FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico- sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v.23, p.162-165, 2003.
- FUKA, M.M.; ENGEL, M.; SKELIN, A. *et al.* Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.142, p.19-24, 2010.
- FORTINA, M.G.; RICCI, G.; ACQUATI, A. *et al.* Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol.*, v.20, p.397-404, 2003.
- GIANNINO, M.L. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.130, p.188-195, 2009.
- KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F. *et al.* Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.3497-3503, 1999.
- KONGO, J.M.; HO, A.J.; MALCATA, F.X. *et al.* Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *J. Appl. Microbiol.*, v.103, p.1838-1844, 2007.
- LICK, S.; KELLER, M.; BOCKELMANN, W. *et al.* Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its lacZ gene. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.19, p.74-77, 1996.
- MARTÍN-PLATERO, A.M.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. *et al.* Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiol.*, v.26, p.294-304, 2009.
- OGIER, J.C.; LAFARGE, V.; GIRARD, V. *et al.* Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.5628-5643, 2004.
- OLIVEIRA, K.A.; EVÊNCIO NETO, J.; de PAIVA, J.E. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.435-440, 2010.
- PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, v.27, p.293-300, 2004.
- PU, Z.Y.; DOBOS, M.; LIMSOWTIN, G.K. *et al.* Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *J. Appl. Microbiol.*, v.93, p.353-361, 2002.
- SERHAN, M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; BORGES, F. *et al.* Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.*, v.26, p.645-652, 2009.
- WARD, L.J.H.; TIMMINS, M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters Appl. Microbiol.*, v.29, p.90-92, 1999.