

УДК 577.124.23

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ RAPD-PCR ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

I. М. Сливка¹, О. Й. Цісарик¹, Т. Боцер²
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

²Жешувський університет, вул. Соколовська, 26, м. Кольбушово, 36-100, Польща

Гетерогенні властивості молочнокислих бактерій (МКБ) створюють значні труднощі під час їх ідентифікації. Використання генетичних методів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) уможливило швидко та якісно ідентифікувати МКБ. Метою дослідження було ідентифікувати МКБ, виділені із овечого сиру, який традиційно виготовляється в Карпатському регіоні України. Для досягнення цієї мети було використано ряд мікробіологічних і генетично-молекулярних досліджень, а саме культуральні та морфологічні властивості досліджуваних ізолятів МКБ та метод аналізу випадкової ампліфікації поліморфної ДНК (RAPD-PCR). Матеріалом для досліджень був овечий сир буц (бринза до моменту соління), виготовлений в умовах високогірної полонини Путилівського району Чернівецької області. Предметом дослідження були чисті культури МКБ, які були ізольовані із сиру.

Для порівняльного аналізу ампліфікованих фрагментів ДНК досліджуваних штамів МКБ використано референтні штами МКБ. За характером росту колоній і температурними режимами культивування досліджувані штами МКБ віднесли до родини Lactobacteriaceae та Streptococcaceae. Враховуючи морфологічні властивості ізолятів МКБ, їх віднесли до роду Lactobacterium, Lactococcus і Streptococcus.

Між досліджуваними штамами МКБ були знайдені значні відмінності у електрофоретичній рухомості, які заключалися у відсутності подібних, спільних фрагментів ДНК, а також знайдено в певних спектрах незначне число ідентичних фрагментів ДНК. Відсутність подібних профілів ДНК вказує на гетерогенність властивостей ізольованих МКБ та внутрішньовидову їх різноманітність.

Метод RAPD-PCR є доцільним щодо визначення родової спорідненості ізолятів МКБ та виявлення внутрішньовидових змін, але недостатнім для видової та штамової ідентифікації МКБ.

Ключові слова: МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, ГЕНОТИПУВАННЯ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, АМПЛІФІКАЦІЯ, ПОЛІМОРФІЗМ

THE APPLICATION OF THE RAPD-PCR METHOD FOR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA

I. M. Slyvka¹, O. Y. Tsisaryk¹, T. Bocer²
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj, Pekarska st., 50, Lviv, 79010, Ukraine

²University of Rzeszow, Sokolowska st., 26, Kolbuszowa, 36-100, Poland

The heterogeneous properties of lactic acid bacteria (LAB) create a significant difficulties in their identification. The use of genotypic methods based on polymerase chain reaction (PCR) has opened new possibilities for precise and rapid identification of LAB. Our purpose was to identify LAB isolated from ewe's cheese that is traditionally produced in the Carpathian region of Ukraine. A number of microbiological and molecular genetic studies, such as cultural and morphological properties of the isolates LAB and the method of analysis random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) have been used to achieve this purpose. The material for researches was ewe's cheese butts (brine cheese before ripening) produced in the alpine mountain valley of Putyla district of Chernivtsi region. A pure cultures LAB, which were isolated from the cheese, served as subject of the research.

The reference strains of LAB we used for the comparative analysis of amplified fragments of DNA of the investigated strains of LAB. The investigated strains of LAB were taken to family Lactobacteriaceae and

Streptococcaceae under the nature of growth of colonies and the temperature conditions of cultivating and to the genus *Lactobacterium*, *Lactococcus* and *Streptococcus* under the morphological properties of isolates.

The considerable differences in electrophoretic movable were found between the investigated strains of LAB that consisted in the absence of similar, general fragments of DNA, and also a small number of identical DNA fragments were found in some spectra. The absence of an identical DNA profiles indicates heterogeneity properties of isolated LAB and their intraspecific diversity.

RAPD-PCR method is appropriate to identify generic affinity isolates of LAB detection and intraspecific changes but not sufficient for species and strains identification of LAB.

Keywords: LACTIC ACID BACTERIA, GENOTYPING, POLYMERASE CHAIN REACTION, AMPLIFICATION, POLYMORPHISM

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА RAPD-ПЛР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

И. Н. Сливка¹, О. И. Цисарык¹, Т. Боцер²
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

¹Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов 79010, Украина

²Жешувский университет, ул. Соколовская, 26, г. Кольбушово, 36-100, Польша

Гетерогенность свойств молочнокислых бактерий (МКБ) создает значительные трудности при их идентификации. Использование генотипических методов с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) открыло новые возможности для четкой и быстрой идентификации МКБ. Целью исследования было идентифицировать МКБ, выделенные из овечьего сыра, который традиционно изготавливается в Карпатском регионе Украины. Для достижения этой цели был использован ряд микробиологических и генетически молекулярных исследований, а именно культуральные и морфологические свойства исследуемых изолятов МКБ и метод анализа случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD-PCR). Материалом для исследований был овечий сыр буц (брынза до момента соления), изготовленный в условиях высокогорья Путилского района Черновицкой области. Предметом исследования служили чистые культуры МКБ, которые были изолированы из сыра. Для сравнительного анализа амплифицированных фрагментов ДНК исследуемых штаммов МКБ использовано референтные штаммы МКБ.

По характеру роста колоний и температурными режимами культивирования исследуемые штаммы МКБ отнесли к семейству *Lactobacteriaceae* и *Streptococcaceae*. Учитывая морфологические свойства изолятов МКБ их отнесли к роду *Lactobacterium*, *Lactococcus* и *Streptococcus*. Между исследуемыми штаммами МКБ были найдены значительные различия в электрофоретической подвижности, которые заключались в отсутствии подобных, общих фрагментов ДНК, а также найдено в определенных спектрах незначительное число идентичных фрагментов ДНК. Отсутствие подобных профилей ДНК указывает на гетерогенность свойств изолированных МКБ и внутривидовой их разнообразие.

Метод RAPD-PCR является целесообразным по определению родового родства изолятов МКБ и выявления внутривидовых изменений, но недостаточным для видовой и штаммовой идентификации МКБ.

Ключевые слова: МОЛОЧНОКИСЛИЕ БАКТЕРИИ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, АМПЛИФИКАЦИЯ, ПОЛИМОРФИЗМ

Швидкий розвиток технологій вивчення структури ДНК створив численні методи для використання генетичних маркерів з метою характеристики природних популяцій мікроорганізмів і дослідження еволюційних зв'язків між ними. Генетичне маркування полягає в поєднанні рестрикційного аналізу з

наступним електрофоретичним розділенням фрагментів. Сучасніші методи генетичного маркування ДНК ґрунтуються на використанні продуктів полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Одним з таких методів є аналіз випадкової ампліфікації поліморфної ДНК-RAPD (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA*). Цей

метод досить простий, вимагає малих кількостей ДНК і не потребує попереднього вивчення поліморфізму ДНК конкретного виду чи популяції мікроорганізмів для синтезу специфічних праймерів, оскільки ампліфікація проводиться з використанням одного довільного праймера [1, 2].

RAPD-PCR — метод, який дає змогу проводити аналіз генома без точного знання його послідовностей та ідентифікувати мікроорганізми на родовому та видовому рівні. Метод заснований на полімеразній ланцюговій реакції, що проводиться на геномній ДНК [3]. На відміну від стандартної полімеразної ланцюгової реакції використовується один праймер, зазвичай довжиною від 10 до 20 пар нуклеотидів. Залежно від способу диференціації можна застосовувати більше праймерів. Ці праймери з довільною послідовністю, як правило, ініціюють ампліфікацію фрагментів ДНК у різних областях генома одночасно [4].

У методі RAPD-PCR приєднання праймерів, а саме перші п'ять циклів ПЛР проходять при зниженій температурі. Це дає можливість приєднувати праймер до ділянок, які не повністю комплементарні, що підвищує ймовірність ампліфікації фрагменту ДНК. Отриманий продукт ПЛР розділяється в агарозному або поліакриламідному гелі і отримані профілі ДНК порівнюються, що дає змогу визначити подібність між досліджуваними організмами та побудувати філогенетичне дерево.

МКБ належать до групи мікроорганізмів, які є складовою частиною пробіотичних продуктів, які позитивно впливають на здоров'я людини. Вони широко використовуються в харчовій промисловості, зокрема у молочній, під час виробництва кисломолочних продуктів, сирів, кисловершкового масла, формуючи їх смак і консистенцію. Також вони допомагають підтримувати свіжість продуктів шляхом пригнічення патогенної мікрофлори, що дає змогу зменшувати кількість штучних консервантів.

З метою запобігання втрати біорізноманіття МКБ і втрати різноманітності кисломолочних продуктів та сирів, важливою є ідентифікація молочнокислої мікрофлори із традиційних продуктів. Свою увагу ми зосередили на традиційному овечому сирі — бринзі, виробництво якого набуло значного поширення у багатьох країнах світу. Бринза вважається національним харчовим продуктом болгар, румунів, молдаван, а також українців [5]. Бринзу традиційно виготовляють в українських Карпатах, однак її мікрофлора не досліджена. Для виконання цього завдання необхідно використовувати нові методи вивчення властивостей МКБ, які відображають взаємовідносини штамів на рівні роду, виду, підвиду.

Метою дослідження було диференціювати молочнокислі бактерії за генетичними ознаками, які виділені із овечого сиру. Для досягнення цієї мети було використано метод RAPD-PCR.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень був овечий сир буц (бринза, до моменту соління), виготовлений в умовах високогірної полонини Путильського району Чернівецької області. Із дослідного зразка сиру було ізольовано 28 чистих культур МКБ.

Визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacterium* проводили за ГОСТ 10444.11-89 «Продукти харчові. Методи виявлення молочнокислих мікрорганізмів». Для ізоляції чистих культур МКБ використовували метод посіву десятикратних розведень досліджуваного матеріалу на тверді поживні середовища *MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)* та *M17*, що містили 2 % агару. Метод виявлення молочнокислих паличок базувався на їх здатності розвиватися на поживному середовищі *MRS*. Для ізоляції лактококів використовували середовище *M17*. Поживні середовища були приготовані на основі дистильованої води і

стерилізовані в автоклаві при температурі 121 °С, тиску 1 атм, протягом 15 хв. Інкубацію лактобактерій здійснювали в анаеробних та мікроаерофільних умовах за температури +38 °С, інкубацію лактококів при температурі +25 °С та +42 °С. Після інкубування на твердих поживних середовищах окремі КУО МКБ переносили у рідке поживне середовище *MRS* та *M17* для нарощення біологічної маси для подальшої ізоляції геномної ДНК бактерій.

Ізоляцію геномної ДНК проводили, використовуючи набір *Genomic Mini* фірми

A&A Biotechnology згідно з інструкцією виробника. Визначення концентрації і чистоти ізольованої ДНК проводили на спектрофотометрі *NanoDrop 2000* фірми *Thermo Scientific*.

Ампліфікацію ДНК виконано на основі ПЛР з використанням праймера *1254* (*Sigma-Aldrich*). Нуклеотидна секвенція стартера *1254*, який використаний для RAPD-PCR була 5'- CCGCAGCCA -3'.

Складові реакційної суміші для RAPD-PCR наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Складові реакційної суміші під час постановки RAPD-PCR

Складові компоненти	Кількість (мкл)	Кінцеве розведення
H ₂ O дист.	32,68	–
dNTP	6	1,2 мМ
Буфер 10x	5	1x
Полімераза Taq 5 У/мкл	0,32	0,32
Стартер 1254	2	2,5 мМ
Матриця	4	5,6-15,2 нг/мкл
Об'єм реакційної суміші	50	–

Ампліфікацію виконували за допомогою термоциклера *Mastercycler Gradient* фірми *Eppendorf*, беручи до уваги температуру плавлення праймера і

літературні дані щодо умов проведення RAPD-PCR. Для ампліфікації ДНК було застосовано режими, що представлено в таблиці 2.

Таблиця 2

Режими проведення RAPD-PCR

Етап	Температура (°С)	Час (хв.)	Кількість циклів
Денатурація	94	5	4
Приєднання стартера	36	5	
Елонгація	72	5	
Денатурація	94	1	30
Приєднання стартера	36	1	
Елонгація	72	2	
Кінцеве подовження	72	10	1

Електрофорез в агарозному гелі здійснено в апараті фірми *Bio-Rad*. Приготовлено 1,5 % агарозний гель і розведення буферу 1xTBE (TrisHCl, H₃BO₃, EDTA). Для візуалізації ДНК в агарозний гель додавали бромистий етидій (EtBr) у розрахунку 0,5 мг/мл. Фотографування виконували у транслюмінаторі *G-Box* (*Syngene*). Кількість ампліфікованого ДНК визначали на основі маркера молекулярної маси *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (*Fermentas*).

Для порівняльного аналізу ампліфікованих фрагментів ДНК

використано референтні штами МКБ із колекції Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności (промислової мікробіології і продовольства) Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Rzeczpospolita Polska). У роботі використано 12 штамів МКБ: *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 6; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1267; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*; *Lactobacillus plantarum* 295/1; *Lactobacillus brevis* 211; *Enterococcus faecalis*; *Lactobacillus plantarum* 21; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*;

Lactobacillus acidophilus 43/15;
Lactobacillus brevis 32; *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides*.

Результати й обговорення

Вперше ізолювано і проведено аналіз бактеріальної мікрофлори овечого сиру методом RAPD-PCR.

За морфолого-культуральними властивостями МКБ відносилися до родини *Lactobacteriaceae* та *Streptococcaceae* та трьох родів *Lactobacterium*, *Lactococcus* і *Streptococcus*.

Молочнокислі палички росли на щільному живильному середовищі *MRS* при температурі +38 °С, формуючи білі або сіруваті колонії, діаметром від 1 мм до 5 мм, інколи лінзоподібної або зіркоподібної форми. Поверхня колоній була переважно гладенькою і блискучою

(S-форма), проте в окремих випадках спостерігали шорсткі колонії (R-форми).

Для лактококів відзначали характерний ріст на щільному поживному середовищі *M17* при температурі +25 °С та +42 °С у вигляді округлих і човникоподібних колоній. На поверхні середовища утворювалися округлі колонії з рівними краями, а човникоподібні колонії дещо вросли в агар.

У препаратах, пофарбованих за Грамом, виявляли прямі чи злегка зігнуті Грам позитивні палички, зазвичай, розташовані поодинокі або ж короткими ланцюжками, без ознак споро- чи капсулоутворення.

Для подальшої роботи відібрано 28 чистих культури МКБ. Із відібраних культур ізолювано геномну ДНК. Концентрацію та чистоту ізолюваної ДНК представлено у таблиці 3.

Таблиця 3

Результати визначення ступеня чистоти і концентрації ізолюваної геномної ДНК із досліджуваних культур МКБ

№ ізоляту МКБ	Концентрація ДНК нг/мкл	Чистота ДНК A260/A280	№ ізоляту МКБ	Концентрація ДНК нг/мкл	Чистота ДНК A260/A280
1	84,7	1,81	15	93,7	1,69
2	83,6	1,80	16	185,4	1,63
3	72,4	1,81	17	87,3	1,78
4	113,4	1,82	18	145,2	1,69
5	96,6	1,66	19	53,6	1,73
6	87,5	1,78	20	122,2	1,62
7	77,0	1,78	21	189,7	1,60
8	94,4	1,80	22	134,0	1,62
9	84,3	1,76	23	103,8	1,75
10	164,1	1,61	24	78,9	1,83
11	79,5	1,76	25	87,6	1,67
12	86,8	1,81	26	107,3	1,78
13	95,6	1,77	27	73,4	1,86
14	76,6	1,81	28	82,6	1,68

Результати, отримані за допомогою RAPD-PCR, дали можливість встановити ступінь спорідненості між досліджуваними МКБ. Профілі ампліфікації досліджуваних ізолятів МКБ, що отримані під час електрофорезу, представлено на рисунку 1.

Генотипування з високою роздільною здатністю, проведене за допомогою гель-електрофорез в пульсуючому полі (ГЕПП), показало значний ступінь гетерогенності всередині досліджуваних штамів МКБ. Кожний окремий ізолят МКБ характеризувався

унікальним фінгерпринтом, який полягає в різній кількості фрагментів ДНК і їх молекулярній масі, а, отже, і розташуванні в гелі. Це демонструє високу ступінь гетерогенності ізолюваних штамів, які було розподілено на 8 груп.

На рисунку 2 представлені профілі ампліфікації ДНК референтних штамів МКБ, отримані при ГЕПП. ГЕПП референтних штамів МКБ проведено для порівняння із отриманими профілями ДНК досліджуваних штамів МКБ.

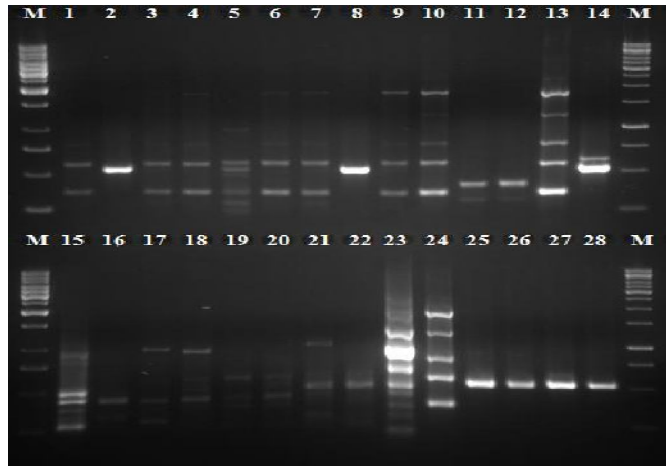


Рис. 1. Електрофоретичне розділення продуктів RAPD-PCR. М — маркер молекулярної маси (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*). Доріжки № 1–28 досліджувані зразки МКБ

Аналіз результатів дає можливість стверджувати, що бактеріальна флора, яка бере участь у виробництві досліджуваного сиру, досить різноманітна. Вдалося отримати 8 різних генетичних профілів, що, ймовірно, вказує на існування восьми груп бактерій. Досліджувані зразки, які віднесені

до певних груп, представлено в таблиці 4. Порівнюючи отримані генетичні профілі ДНК досліджуваних МКБ із профілями ДНК референтних штамів МКБ під час застосування RAPD-PCR, не вдалося відшукати спільних електрофоретичних зразків.

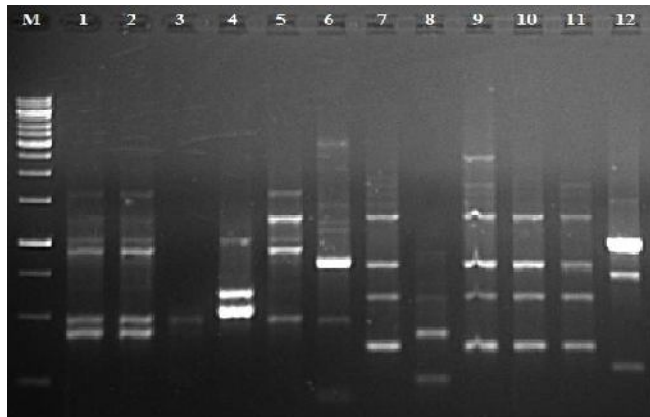


Рис. 2. Електрофоретичне розділення продуктів RAPD-PCR. М — маркер молекулярної маси (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*). Доріжки № 1–12 референтні штами МКБ. 1 — *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, 2 — *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, 3 — *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1267, 4 — *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, 5 — *Lactobacillus plantarum* 295/1, 6 — *Lactobacillus brevis* 211, 7 — *Enterococcus faecalis*, 8 — *Lactobacillus plantarum* 21, 9 — *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 10 — *Lactobacillus acidophilus* 43/15, 11 — *Lactobacillus brevis* 32, 12 — *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*

Таблиця 4

Групи досліджуваних зразків МКБ, що мають подібні генетичні профілі під час використання RAPD-PCR

Номер групи, що мають подібний генетичний профіль	Номери доріжок електрофоретичних знімків, що мають схожі генетичні профілі
I	1,3,4,6,7,9,10,13,14
II	2,8,14,21,22,25,26,27,28
III	11,12,16
IV	17,18
V	19,20
VI	5
VII	15
VIII	23

Це свідчить про те, що із досліджуваного матеріалу були ізольовані інші штами МКБ.

Між досліджуваними штамми МКБ були знайдені значні відмінності в електрофоретичній рухомості, які заключалися у відсутності подібних, спільних фрагментів ДНК, а також знайдено в певних спектрах незначне число ідентичних фрагментів ДНК. Відсутність подібних профілей ДНК вказує на гетерогенність властивостей ізольованих МКБ та внутрішньовидову їх різноманітність.

Висновки

Ідентифікація представників різних видів мікроорганізмів за допомогою RAPD-PCR сьогодні доволі широко застосовується у вивченні різноманітності штамів біфідобактерій і МКБ, які були ізольовані із шлунково-кишкового тракту людини. Оскільки, молочнокисла флора, яка ізольована із овечого сиру Карпатського регіону України, не вивчена абсолютно, то використання методу RAPD-PCR вважаємо доцільним.

Бактеріальна флора в аналізованому матеріалі є досить різноманітна, а метод RAPD-PCR недостатній для конкретної ідентифікації ізолятів МКБ. Використовуючи метод випадкової ампліфікації поліморфної ДНК МКБ, вдалося отримати генетичні профілі ДНК, які за їх подібністю можна об'єднати у 8 груп. Це, в свою чергу, свідчить про можливість ізоляції 8 різних видів МКБ. Метод RAPD-PCR є доцільним під час визначення родової спорідненості ізолятів МКБ, але недостатній під час визначення видової та штамової приналежності культур МКБ.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на те, щоб детальніше дослідити ізоляти МКБ та застосувати

додаткові методи молекулярної діагностики. Одним із таких методів є аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (RFLP-PCR) та секвенування гену 16S рРНК, що дозволить диференціювати групи ізольованих мікроорганізмів.

1. Laschevskyy V. V., Kovalenko N. K. Oprydenenie vudovoj prynadlezhnosti shtamov roda *Lactobacillus* s ispolzyvaniem RAPD-typirovania [Determination of the species of the genus *Lactobacillus* strains using RAPD-typing]. *Microbiologicheskyy zhurnal — Microbiological journal*, 2004, vol. 66, no 4, pp. 3–13 (in Ukrainian).

2. Kovalenko N. K., Laschevskyy V. V. Primeneniya metoda polymeraznoj tsepoj reaktsii (PCR) dlja identyfikatsij molochnyh bakterij [Application of the polymerase chain reaction (PCR) for identification of lactic acid bacteria]. *Molochna promyslovist' — Dairy Industry*, 2003 vol. 1, no 4, pp. 24–25 (in Ukrainian).

3. Khan S., Mirza K. J., Abdin M. Z. Authentication of the medicinal plant *Senna angustifolia* by RAPD profiling. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2011, 18, pp. 287–292.

4. Tingej S. V., del Tufo J. P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers *Plant Physiol*, 1993, 101, pp. 349–352.

5. Byrda L. R. Fyzyko-chimichni pokaznyky moloka ovets' ykrainskoi hirskokarpatskoi porody za ryznych ymov ytrumannja [Physical and chemical properties of sheep milk Ukrainian Carpathian mountain rocks in different welfare] *Naukovo-tehnichnij bjuletен — Scientific and Technical Bulletin*, 2008, no. 9, pp. 13–17 (in Ukrainian).

6. Hébert. E. M., Raya R., Tailliez. P., Giroi G. S. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 59, pp. 19–27.

7. Bouton Y., Guyot P., Beuvier E. and Grappin R. Use of PCR- based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese Ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 76, pp. 27–38.

8. Mannu L., Comunian R. and Scintu M.F. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 2000, 10, pp. 383–389.