

*Е.Н. Бирюк, к.с.-х.н., Ю.С. Тарашкевич, Н.Н. Фурик, к.т.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* С ПОМОЩЬЮ ПЦР

*A. Biruk, Y. Tarashkevich, N. Furik
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

GENETIC TYPING OF *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* USING PCR

e-mail: biohimbel@rambler.ru, julia10095@mail.ru, furik_nn@tut.by

Изучены возможности использования RAPD-ПЦР с праймерами: *ERIC1R-1*, *ERIC2-1*, *BOXA1R*, *BOXA2R* и Rep-ПЦР с праймерами *P15*, *P16*, *XD8*, *XD9*, RAPD-*mes*, $(GTG)_5$ для выявления генетической гетерогенности 9 штаммов и 8 изолятов *Leuconostoc mesenteroides*. В результате филогенетического анализа, полученного при типировании лейконостоков, выделены три кластера культур с высоким уровнем бутстрап-поддержки. Полученные результаты свидетельствуют о возможности выявлять генетические различия по профилю генерируемых ампликонов среди штаммов *Leuconostoc mesenteroides* с помощью комбинированного использования методов Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР.

We studied the possibility of using RAPD-PCR with primers: *ERIC1R-1*, *ERIC2-1*, *BOXA1R*, *BOXA2R* and Rep-PCR with primers *P15*, *P16*, *XD8*, *XD9*, RAPD-*mes*, $(GTG)_5$ to identify genetic heterogeneity of 9 strains and 8 isolates of *Leuconostoc mesenteroides*. Three clusters of cultures with a high level of bootstrap support were identified as a result of phylogenetic analysis obtained when typing *Leuconostoc*. The obtained results indicate the possibility of revealing genetic differences in the profile of the generated amplicons among *Leuconostoc mesenteroides* strains using the combined methods of Rep-PCR and RAPD-PCR.

Ключевые слова: *Leuconostoc mesenteroides*; генотипирование; RAPD-PCR; Rep-PCR; праймеры.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*; genotyping; RAPD-PCR; Rep-PCR; primers.

Введение. Бактерии рода *Leuconostoc* – важная в технологическом отношении группа молочнокислых бактерий, входящая в состав заквасочных культур для производства кисломолочного масла, творога, сыров с низкой температурой второго нагревания. Род *Leuconostoc* объединяет девять видов. В молочной промышленности наибольшее значение имеют два вида: *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*, который включает три подвида: *dextranicum*, *mesenteroides*, *cremoris* [1, 2]. В производстве сыров с низкими температурами второго нагревания, сыров типа Рокфор и кисломолочных сыров обычно используют *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. При совместном развитии с лактококками лейконостоки стабилизируют содержание диацетила, снижают уровень ацетоина, увеличивают уровень уксусной кислоты и этанола, способствуют снижению накопления горьких пептидов в сырах. От других видов и подвигов сливочный лейконосток отличает низкая метаболическая активность, повышенная чувствительность к внешним факторам и очень сложные питательные потребности, особенно в аминокислотах. Бактериофаги лейконостоков практически не распространены на сыродельных заводах. Кроме того, лейконостоки начинают размножаться после свертывания молока, когда условия для репродукции бактериофагов неблагоприятны. В связи с этим, закваски с лейконостоками обеспечивают более стабильное формирование рисунка в сырах [3].

Однако, для создания устойчивых бактериальных консорциумов необходимо использование штаммов, имеющих низкий уровень внутривидового генетического родства. Использование таких культур в составе консорциумов для бактериальных заквасок стабилизирует их производственно-ценные свойства, что в свою очередь, обеспечивает гарантированное получение ферментированных продуктов высокого качества.

По сравнению с традиционными способами видовой детекции, установление видовой принадлежности с помощью ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и степенью достоверности, что обосновывает актуальность применения данных методов [4–8]. Молекулярно-генетические методы, основанные на особенностях нуклеотидного состава ДНК микроорганизмов, позволяют не только провести видовую идентификацию исследуемых бактерий, но и дают возможность получить индивидуальные генотипические характеристики каждого штамма. Именно молекулярно-биологические методы составляют базу геномного фингерпринтинга. В настоящее время разработаны различные методики ДНК-типирования, основанные на полимеразной цепной реакции: specific PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR, PCR-RFLP, AFLP и др. [9, 10].

К методам типирования микроорганизмов предъявляют ряд требований: они должны быть стабильными, обладать выраженной типизирующей способностью, дискриминативностью и позволять дифференцировать 2 неродственных изолята, произвольно выбранных из популяции изучаемого вида, а также быть воспроизводимыми. В связи с небольшой трудоемкостью и стоимостью исследований в практических лабораториях перспективно использование различных вариантов ПЦР типирования, основанных на случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD-ПЦР), либо амплификации повторяющейся экстрагенной палиндромной ДНК (Rep-ПЦР). Эти методы основаны на использовании коротких праймеров, число и расположение сайтов связывания таких неспецифических праймеров различается среди бактерий разных видов и различных штаммов одного вида, что позволяет по профилю образуемых в ПЦР фрагментов выявлять генетическое различие/сходство микроорганизмов [11].

Цель наших исследований – изучить возможности использования RAPD- и Rep-ПЦР для выявления генетической гетерогенности штаммов *Leuconostoc mesenteroides*.

Материалы и методы исследований. Исследования по генотипированию культур *Leuconostoc mesenteroides* проводили в отделе биотехнологий РУП «Институт мясо-молочной промышленности». В работе использовали 9 коллекционных штаммов лейконостоков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов (423 МН-ODG, 412 МН-ODG, 417 МН-ODG, 430 МН-ODG, 418 МН-ODG, 426 МН-ODG, 427 МН-ODG, 410 МН-ODG, 413 МН-ODG) и 7 изолятов лейконостоков, выделенных из природных источников и идентифицированных методом секвенирования последовательности гена 16S rRNA. Образцы p1427/1-1-3-3 и p1427/3-4-2 были выделены из клевера узколистного; образец p1464/2-1-3-2 – из плодов яблони, образцы p1465/1-5-2, p1465/3-2-2-1, p1465/3-5-3-1, p1465/4-5-1-1 также выделены из плодов яблони.

Бактериальные культуры выращивали в жидкой среде МРС. Выделение ДНК из бактериальных клеток проводили с использованием коммерческого набора «АртДНК MiniSpin» (ООО «АРТБиоТех») согласно инструкции производителя. Для проведения амплификации использовали реактивы и праймеры производства ОДО «Праймтех».

При проведении Rep-ПЦР использовали праймеры: ERIC 1R-1, ERIC 2-1, BOXA1R, BOXA2R (таблица 1). Амплификацию осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X AM-буфер с MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 60 пкМ праймера, 1ед. *Taq*-полимеразы и матрицу ДНК. В отрицательный контроль матрицу не добавляли. Оптимизированный протокол амплификации с праймерами ERIC 1R-1 и ERIC 2-1 включал следующие стадии: начальная денатурация 5 минут при 95°C; первый этап включал 4 цикла: 95°C – 1 мин, 40°C – 5 мин, 68°C – 8 мин; а второй этап – 30 циклов: 94°C – 30 сек, 51°C – 1 мин, 72°C – 2 мин. Оптимизированный протокол амплификации с праймерами BOXA1R, BOXA2R включал следующие стадии: начальная денатурация 5 минут при 95°C; первый этап включал 4 цикла: 95°C – 1 мин, 40°C – 5 мин, 68°C – 8 мин; второй этап – 30 циклов: 94°C – 1 мин, 65°C – 2 мин, 72°C – 2 мин. В обоих случаях реакции завершали элонгацией при 72°C в течение 5 мин.

Таблица 1 – Праймеры, использованные для Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР.

Праймер	Последовательность
ERIC 1R1	5'-TAGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'
ERIC 2-1	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
BOXA2R	5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3'
RAPD-mes	5'-AAGAGCCCGT-3'
P15	5'-CTGGGCACGA-3'
P16	5'-TCGCCAGCCA-3'
XD8	5'-CAAGGCATCC-3'
XD9	5'-GAAGTCGTCC-3'
(GTG) ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

Источник данных: из открытых источников.

При проведении RAPD-ПЦР использовали праймеры P15, P16, XD8, XD9, RAPD-mes, (GTG)₅ (табл. 1). Амплификацию осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X AM-буфер с MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 20 пкМ праймера, 1ед. *Taq*-полимеразы и матрицу ДНК. В отрицательный контроль матрицу не добавляли. С праймерами P15, P16 реакцию начинали плавлением ДНК при 95°C в течение 5 мин., затем следовало 40 циклов: 94°C – 30 сек, 40°C – 30 сек, 72°C – 1 мин. С праймерами XD8, XD9 реакцию начинали плавлением ДНК при 95°C в течение 5 мин., затем следовало 40 циклов: 94°C – 1 мин, 40°C – 1 мин, 72°C – 2 мин. В обоих случаях завершали реакцию элонгацией при 72°C в течение 7 мин. Амплификацию с праймером (GTG)₅ начинали плавлением ДНК при 95°C в течение 7 мин., первый этап включал в себя 4 цикла: 95°C – 2 мин, 36°C – 2 мин, 72°C – 8 мин; а второй этап – 30 циклов: 94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин. Завершали реакцию элонгацией при 72°C в течение 5 мин. Амплификацию с праймером RAPD-mes начинали плавлением ДНК при 95°C в течение 7 мин., первый этап включал в себя 4 цикла: 94°C – 5 мин, 36°C – 5 мин, 72°C – 5 мин; а второй этап – 30 циклов: 94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 2 мин. Завершали реакцию элонгацией при 72°C в течение 10 мин.

Продукты амплификации смешивали с интеркалирующим красителем UView 6x Loading Dye (Bio-Rad) и разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием 1X TAE буфера. Для документирования результатов

электрофореза использовали систему GelDoc XR+ (Bio-Rad). Размеры фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в геле, в качестве маркера молекулярного веса использовали М1Кб (ОДО «Праймтех»).

Кластерный анализ полученных ПЦР-профилей осуществляли с помощью программы TREECON for Windows (version 1.3b) [12]. Бинарные матрицы исходных данных создавали вручную после визуализации гелей, обозначая присутствие фрагмента как 1, а его отсутствие – 0. Анализ осуществляли методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Бутстрап вычисляли по выборке из 100 деревьев. Критерием устойчивости кластера считали значение бутстрапа выше 50.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе наших исследований было проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК 9 коллекционных штаммов лейконостоков и 7 изолятов лейконостоков, для подтверждения их видовой принадлежности. Исследуемые штаммы лейконостоков оказались близки ко всем трем подвидам вида *Leuconostoc mesenteroides*: *mesenteroides*, *dextranicum* и *cremoris*. Все исследуемые культуры также были идентифицированы как *Leuconostoc mesenteroides* с помощью видоспецифичной ПЦР с использованием пары праймеров Lmes-f (5'-AACTTAGTGTCGCATGAC-3') и Lmes-r (5'-AGTCCGAGTTACAGACTACAA-3'). Подвиды *mesenteroides* и *dextranicum* были отделены от подвида *cremoris* с помощью специфичной ПЦР с использованием пары праймеров Ldex-f (5'-ТАСТТААТСГСАССААССА-3') и Ldex-r (5'-TTGCCATGTATTGACCATCA-3').

Для выявления внутривидовой генетической гетерогенности исследуемых культур лейконостоков на следующем этапе проводили ПЦР со случайными праймерами (RAPD-ПЦР) и амплификацию консервативных повторяющихся последовательностей (Rep-ПЦР). Метод RAPD-ПЦР основывается на использовании низкой температуры отжига и одного праймера размером 10 нуклеотидов, имеющего неспецифическую последовательность, благодаря чему праймер связывается со множеством комплементарных участков ДНК и, в случае их близкого расположения друг к другу, амплифицирует их. Инсерции и делеции в ДНК приводят к исчезновению или появлению сайта связывания праймера, что сопровождается появлением изменений в профиле ампликонов [13]. Праймеры ERIC, соответствующие последовательностям Rep-повторов *E. coli*, успешно используют для анализа меж- и внутривидовых различий бактериальных геномов. Генетические перестройки приводят к тому, что в ходе Rep-ПЦР с праймерами ERIC могут образовываться профили ампликонов, которые отличаются не только у разных видов микроорганизмов, но и у представителей одного вида [14].

Схема генотипирования исследуемых нами бактерий с помощью Rep-ПЦР состояла из проведения амплификации с использованием праймеров ERIC 2-1, ERIC IR1 BOXA1R и BOXA2R, электрофоретического разделения синтезированных продуктов и анализа полученных ампликонов. При разделении продуктов амплификации и последующем визуальном анализе полученных электрофореграмм было выявлено от 2 до 12 ПЦР-фрагментов различной длины (таблица 2). Наибольшее разнообразие фрагментов образовывалось в реакциях с праймерами ERIC IR1 и ERIC 2-1 – 11 и 12 фрагментов соответственно. Следует также отметить, что образцы p1427/1-1-3-3 и p1427/3-4-2 (выделенные из одного природного источника – клевера узколистного) при использовании праймера ERIC IR1 формируют различные профили фрагментов. Также различные профили отмечены у образцов p1465/3-2-2-1, p1465/3-5-3-1, p1465/4-5-1-1, p1465/1-5-2 (выделены из яблока) при амплификации с праймерами ERIC IR1 и ERIC2-1.

Использование праймера BOXA1R оказалось неинформативным поскольку приводило к получению идентичных профилей у всех культур за исключением

одного штамма (427 МН-ODG). При использовании праймера BOXA2R образовывались идентичные профили, за исключением образцов 410 МН-ODG, p1427/1-1-3-3 и p1427/3-4-2, что свидетельствует о непригодности данного праймера для внутривидовой дифференциации лейкопостоков.

Таблица 2 – Количество фрагментов, полученных при типировании лейкопостоков с помощью Rep-ПЦР

Количество типов фрагментов			
ERIC IR1	ERIC2-1	BOX A1R	BOX A2R
11	12	2*	3*

*-отсутствуют полиморфные фрагменты

Источник данных: собственная разработка.

Схема генотипирования исследуемых бактерий с помощью RAPD-ПЦР включала амплификацию с праймерами P15, P16, XD8 и XD9, (GTG)₅, RAPD-mes, электрофоретическое разделение синтезированных продуктов и анализ полученных профилей. При визуальном анализе RAPD-профилей, было выявлено от 1 до 13 фрагментов ДНК (таблица 3). Использование праймера P15 оказалось неинформативным поскольку приводило к получению идентичных профилей у всех культур за исключением двух штаммов (417 МН-ODG и 410 МН-ODG).

Таблица 3 – Количество фрагментов ДНК, полученных при RAPD-ПЦР

Праймер	Количество типов фрагментов
P15	6
P16	12
XD8	13
XD9	1*
(GTG) ₅	6
RAPD-mes	8

*-отсутствуют полиморфные фрагменты

Источник данных: собственная разработка.

Для объективной оценки генетического родства исследуемых культур проводили кластерный анализ результатов генотипирования с помощью программы TREECON for Windows (version 1.3b) [12]. Результаты анализа представлены на рисунках в виде филогенетических деревьев (рисунки 1–4).

Наибольшее количество устойчивых кластеров в филогенетическом дереве было получено при использовании праймера ERIC 2-1. Профили, полученные с помощью ERIC IR-1 оказались более однородными, а структура деревьев, построенных на их основании – менее достоверной (рисунок 1).

При использовании для амплификации праймеров (GTG)₅, RAPD-mes, XD 8, P15, P16 стабильно выделялись два устойчивых кластера: кластер из изолятов p1427/1-1-3-3, p1427/3-4-2 с уровнем бутстрапа 93-100; и второй кластер изолятов: p1465/3-2-2-1, p1465/3-5-3-1, p1465/4-5-1-1, p1465/1-5-2, p1464/2-1-3-2 с уровнем бутстрапа 57-100 (рисунки 2–3).

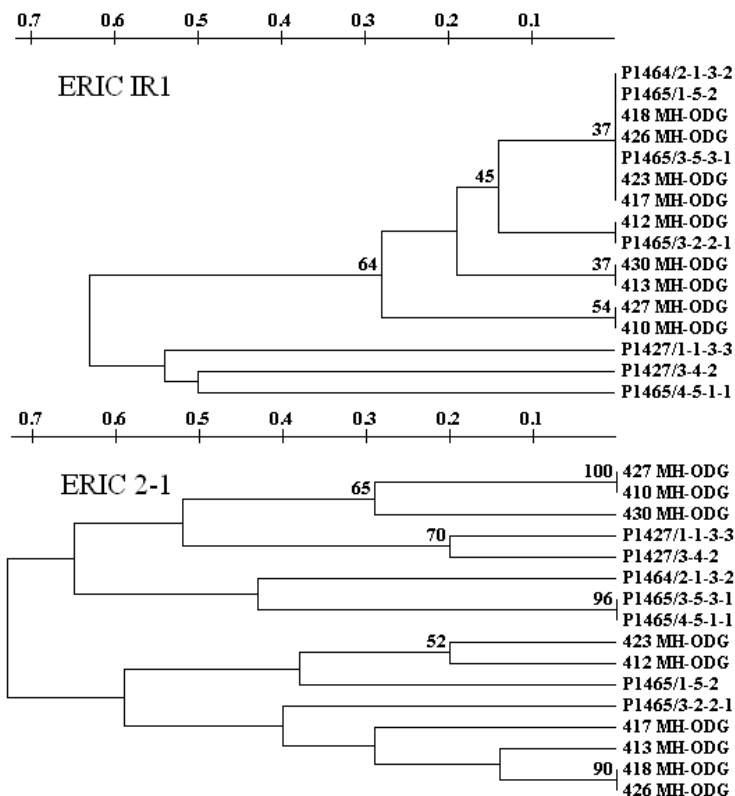


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, полученное при типировании лейкоцестов с помощью Rep-ПЦР
 Источник данных: собственная разработка.

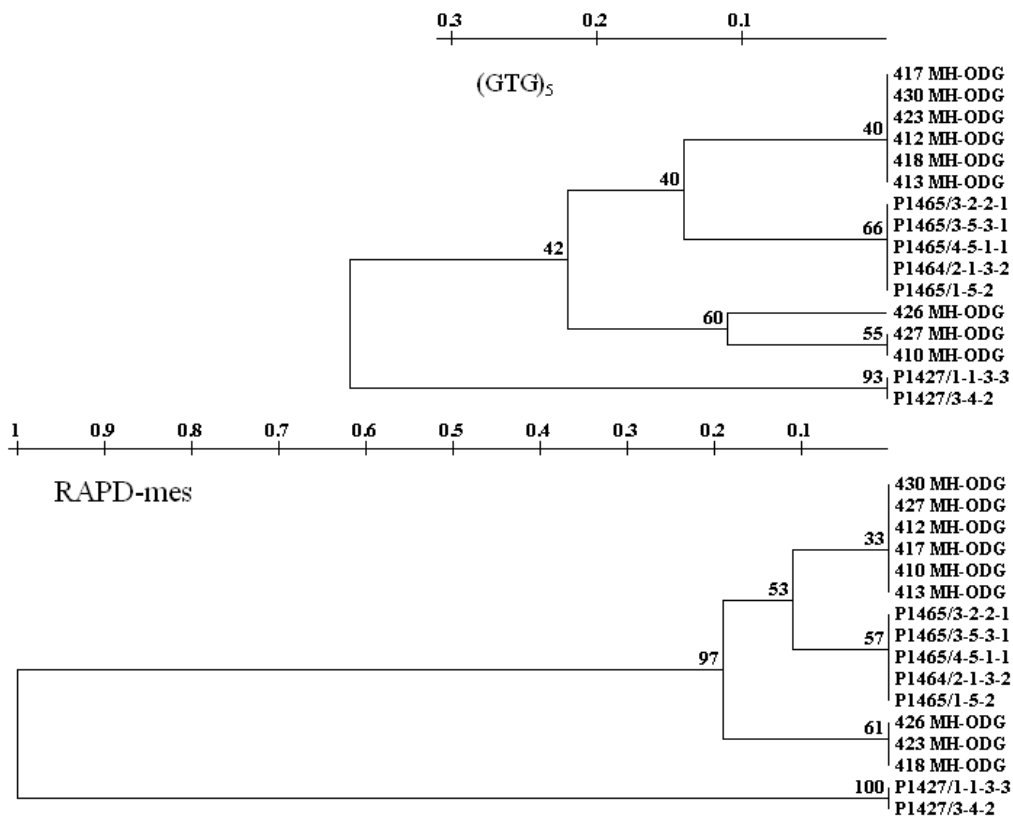


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, полученное при типировании штаммов лейкоцестов с помощью RAPD-ПЦР с праймерами (GTG)₅ и RAPD-mes

Источник данных: собственная разработка.

При типировании культур лейконостоков с помощью RAPD-ПЦР с праймером RAPD-mes штаммы 426 МН-ODG, 423 МН-ODG и 418 МН-ODG формируют отдельный устойчивый кластер (значение бутстрапа 97). При использовании праймеров P15 и P16 все 9 коллекционных штаммов формируют отдельный устойчивый кластер с уровнем бутстрап-поддержки 67 и 96 соответственно. Однако при использовании праймера XD8 три штамма 427 МН-ODG, 430 МН-ODG и 410 МН-ODG формируют отдельные филогенетические ветви с высоким уровнем бутстрапа (53-94). Исследуемые образцы различались также по числу уникальных (характерных только для одного образца) ампликонов.

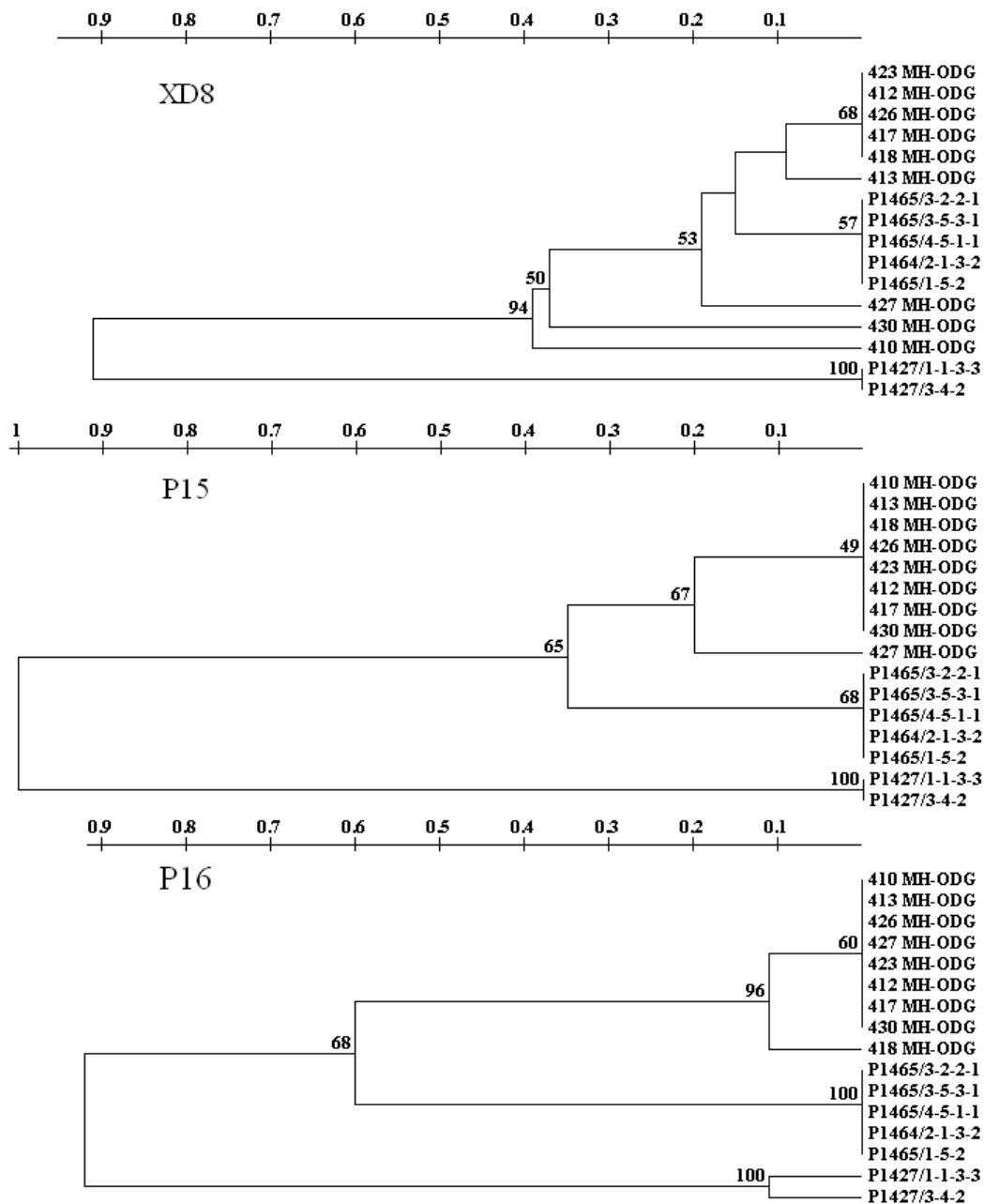


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, полученное при типировании штаммов лейконостоков с помощью RAPD-ПЦР
Источник данных: собственная разработка.

Анализ суммарного филогенетического дерева, полученного при типировании лейконостоков с помощью RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР, позволил выделить три кластера с высоким уровнем бутстрап-поддержки (84-100). Микроорганизмы внутри каждой группы генетически схожи между собой. В отдельный кластер вошли два изолята p1427/1-1-3-3 и p1427/3-4-2. Второй кластер сформирован из пяти изолятов, полученных из двух природных образцов: p1465/3-2-2-1, p1465/3-5-3-1, p1465/4-5-1-1, p1465/1-5-2, p1464/2-1-3-2. Третий кластер сформирован из коллекционных лейконостоков, внутри данного кластера можно выделить отдельный кластер из трех штаммов: 430 МН-ODG, 427 МН-ODG и 410 МН-ODG (рисунок 4).

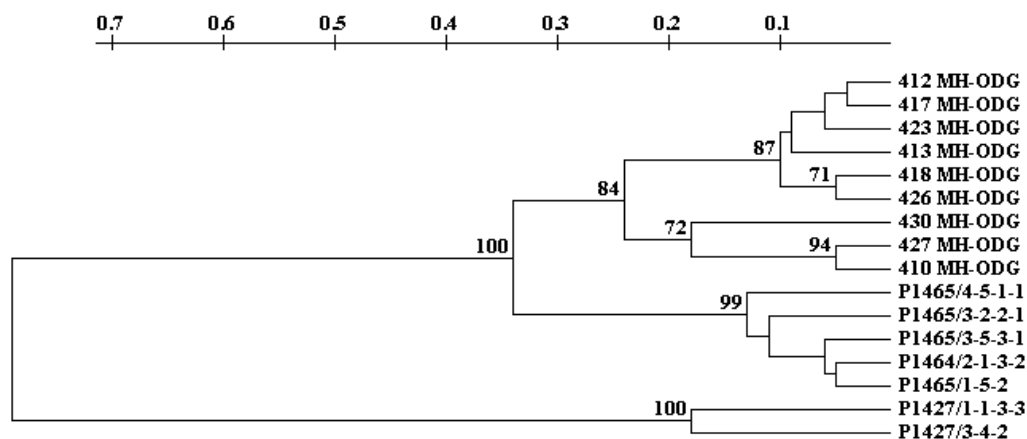


Рисунок 4 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании штаммов лейконостоков с помощью RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР

Источник данных: собственная разработка.

Заключение. В результате проведенных исследований при генотипировании лейконостоков с помощью RAPD-ПЦР установлено что культуры, выделенные из одного природного источника, имеют идентичные ПЦР-профили, однако культуры полученные из разных природных источников, значительно различаются по числу ампликонов. В случае с Rep-ПЦР, при использовании праймеров ERIC IR1 и ERIC2-1 все исследуемые культуры имеют различные профили ампликонов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности выявлять генетические различия по профилю генерируемых ампликонов среди штаммов *Leuconostoc mesenteroides* с помощью комбинированного использования методов Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР.

Список использованных источников

1. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов / П.П. Степаненко // Сергиев Посад: ООО «Все для Вас – Подмосковь». – 1999. – 415 с.

2. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology / eds. M. Goodfellow [et al.]. – New York, NY: Springer New York, 2012.

3. Шергин, Н.А. Улучшение качества сыров группы голландского путем совершенствования отбора лейконостоков в закваски: дисс. ... канд. технич. наук: 05.18.04. – Углич, 1985. – 246 с.

1. Stepanenko, P.P. Mikrobiologija moloka i molochnyh produktov [Microbiology of milk and dairy products] / P.P. Stepanenko // Sergiev Posad: ООО «Vse dlja Vas – Podmoskov'e». – 1999. – 415 s.

3. Shergin N.A. Uluchshenie kachestva syrov grupy gollandskogo putem sovershenstvovaniya otbora lejkonostokov v zakvaski [Improving the quality of Dutch group cheeses by improving the selection of leuconostocks in sourdough]: diss. ... kand. tehnic. nauk: 05.18.04. – Uglich, 1985. – 246 s.

4. Соловьева, И.В. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы / И.В. Соловьева [и др.] // МедиАль. – 2014. – Т. 12. – № 2. – С. 29–44.
5. Точилина, А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*: дис...канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07. – Нижний Новгород, 2009. – 148 с.
6. Chentouf, H.F. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk / H.F. Chentouf, B. Zineb // Afr. J. Microbiol. Res. – 2013. – Vol. 7. - № 23. – pp. 2961–2969.
7. Dimic, G. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables / G. Dimic // Acta Period. Technol. – 2006. – № 37. – pp. 3–11.
8. Schillinger, U.A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation / U. Schillinger, B. Boehringer, S. Wallbaum, L. Caroline, A. Gonfa, M. Huch (née Kostinek), W. H. Holzapfel, C. M.A.P. Franz// FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 286. – № 2. – pp. 222–226.
9. Alegría, Á. Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses / Á. Alegría, S. Delgado, A. Belén Flórez, B. Mayo // Dairy Sci. Technol. – 2013. – Vol. 93. – № 6. – pp. 657–673.
10. Fatma, C. H. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk / C. H.Fatma, Z. Benmecherrhene // Afr. J. Microbiol. Res. – 2013. – Vol. 23. – № 7. – pp. 2961–2969.
11. Слизень, В.В. Генетическое типирование *Salmonella enterica* с помощью ПЦР / В.В. Слизень, Ж.Ф. Циркунова, Е.И. Гудкова, О.Ч. Глаз. // Медицинский Журнал. – Т. 3. – № 49. – С. 93–97.
12. Van de Peer, Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Bioinformatics. – 1994. – Vol. 10. – № 5. – pp. 569–570.
13. Mathis, D.L. Variation in *Salmonella* Enteritidis RAPD-PCR Patterns May Not Be Due to Genetic
4. Solov'eva, I.V. Biologicheskie svojstva laktobacill. Perspektivy ispol'zovanija v laboratorijah Rospotrebnadzora jekspress-metodov amplifikacii nukleinovyh kislot (MANK) pri kontrole kachestva pishhevyyh produktov, BAD k pishhe, lekarstvennyh form, soderzhashhih laktobacilly [Biological properties of lactobacilli. Prospects for using Express methods of amplification of nucleic acids (mana) in laboratories of Rospotrebnadzor for quality control of food products, dietary SUPPLEMENTS, and dosage forms containing lactobacilli]/ I.V. Solov'eva [i dr.] // MediAl'. – 2014. – Т. 12. – № 2. – С. 29–44.
5. Tochilina, A.G. Biohimicheskaja i molekularno-geneticheskaja identifikacija bakterij roda *Lactobacillus* [Biochemical and molecular genetic identification of *Lactobacillus* bacteria]: dis...kand. biol. nauk: 03.00.04, 03.00.07. – Nizhnij Novgorod, 2009. – 148 s.
11. Slizen', V.V. Geneticheskoe tipirovanie *Salmonella enterica* s pomoshh'ju PCR [Genetic typing of *Salmonella enterica* using PCR]/ V.V. Slizen', Zh.F. Cirkunova, E.I. Gudkova, O.Ch. Glaz. // Medicinskij Zhurnal. – Т. 3. – № 49. – С. 93–97.

Differences / D.L. Mathis, R.D. Berghaus, M.D. Lee, J.J. Maurer // Avian Dis. – 2011. – Vol. 55. - № 4. – pp. 620-625.

14. Saxena, M.K. Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR / M.K.Saxena, V.P. Singh, B.D. Lakhcharua, G.Taj, B. Sharma // Res. Vet. Sci. – 2002. – Vol. 73. – № 3. – P. 313–314.