

## 改良 PCA 培养基检测鸡肉胴体中的污染细菌

张弛<sup>1</sup> 向文良<sup>2</sup> 孙焯琨<sup>1</sup> 杨虎<sup>1</sup> 杨志荣<sup>1</sup> 孙群<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学生命科学学院 四川 成都 610064)

(2. 西华大学生物工程学院 四川 成都 610039)

**摘要:** 通过添加鸡肉浸液改良经典 PCA 培养基获得模拟鸡肉营养条件的近自然的 CEA 培养基, 用于检测鸡肉中对营养要求苛刻的污染细菌。根据添加不同浓度的新鲜鸡肉浸液所获得菌落总数的变化获得最佳添加浓度, 并利用生化特性及 16S rRNA 序列对仅生长于 CEA 培养基的细菌进行了鉴定。在 CEA 培养基上获得的细菌数量和多样性都显著高于 PCA 培养基 ( $P < 0.05$ ), 且分离到 3 株无法在 PCA 培养基上生长的细菌, 经鉴定其与 *Enterococcus faecalis*、*Rothia mucllaginosa*、*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* 的相似性分别为 99%、96%、99%。*E. faecalis* 因产生生物胺而被认为是肉品中的腐败菌, 后两者则均是条件致病菌株, 他们的存在对鸡肉产品的安全可能造成隐患。该方法中的近自然培养法能提高对微生物数量和种类的检测灵敏度, 特别适于对营养要求苛刻的污染细菌的检出。

**关键词:** 鸡肉, 难培养, 近自然培养, 16S rRNA 序列分析

## Using Modified PCA Medium to Detect Difficult Cultivable Bacteria from Chicken Carcasses

ZHANG Chi<sup>1</sup> XIANG Wen-Liang<sup>2</sup> SUN Ye-Kun<sup>1</sup> YANG Hu<sup>1</sup>  
YANG Zhi-Rong<sup>1</sup> SUN Qun<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China)

**Abstract:** Investigation of microbial spoilage in meats is usually hindered by the lack of suitable growth media and protocols to characterize the causative agents. A near-native medium of chicken extract agar (CEA), developed by the addition of sterile chicken extract into conventional plate count agar (PCA), was utilized to detect difficult cultivable bacteria on chicken carcasses. Suitable additive concentration was selected. Bacteria absent on conventional PCA medium but recovered by CEA were identified based on morphology, biochemical features and 16S rRNA gene sequencing. The colony form unit (CFU) was significantly greater ( $P < 0.05$ ) and microflora more diversified on CEA than on PCA. CEA containing 3.0% (*W/V*) chicken extract gave the highest microbial enumeration at 64 CFU/g, almost twice that in PCA. Three species of bacteria absent on conventional PCA medium were recovered

by CEA. According to their morphology and biochemical features, three bacteria recovered were identified as *Enterococcus* sp., *Rothia* sp., and *Staphylococcus* sp., respectively. The bacterial identification was confirmed by 16S rRNA sequence analysis with the similarity being 99% for both *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, and 96% for *Rothia mucllaginosa*. Three bacteria recovered by CEA are considered as either spoilage (*Enterococcus* sp.), opportunistic pathogen (*Rothia* sp.), or pathogen (*Staphylococcus* sp.) in foods, thus to cause problems associated with food safety.

**Keywords:** Chicken, Difficult cultivable, Near-native medium, 16S rRNA

严格的卫生标准对肉类产品的加工过程提出了越来越高的要求,但一些微生物还是不可避免地混入原料肉及其制品中<sup>[1]</sup>。新鲜的胴体因为具有丰富的营养以及较适合的 pH 条件,为微生物的生长提供了方便,因而更易腐败<sup>[2]</sup>。造成肉产品污染的微生物主要有致病菌和腐败菌两种。致病菌往往引起食源性疾病,危害人体健康,如 *Salmonella* sp.、*Staphylococcus aureus* sp.等<sup>[3]</sup>。腐败菌则引起肉产品的变质,如 *Pseudomonas* sp.、*Acinetobacter* sp.、*Moraxella* sp.、*Aeromonas* sp.、*Enterobacter* sp.等<sup>[4]</sup>。

现在人们对微生物生态的研究主要采用培养或非培养的方法,依赖于DNA的非培养法以其巨大的优势已成为目前研究的主要手段<sup>[5]</sup>。但一些学者指出,因通用引物的特异性不能适用于所有细菌,以及在总量中占据比例小于1%的细菌不易被检出等原因,非培养法并不能完全反应微生物的多样性,甚至与培养法获得的结果相悖<sup>[6]</sup>。而且非培养法高成本、高技术的特点使其难以普及,因此传统培养的方法作为其补充依然备受重视,但是传统培养基成分与微生物生长环境营养的差别限制了微生物的生长繁殖能力,必须加以改进,例如耐高渗酵母的培养需要有别于传统培养基的高盐高糖培养基<sup>[7]</sup>。

本文的目的是通过改进传统培养基,设计一种近自然培养基以最大程度地恢复鸡肉胴体中污染菌的生长活性,并对得到的难培养菌进行分离鉴定,进一步确定鸡肉污染菌的种类,为预防肉类食品的腐败和食品安全提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 鸡肉浸液琼脂(CEA)培养基的制作

50 g 鸡肉用 IKA A11 分析研磨机绞碎后,加入 100 mL 蒸馏水,4°C 浸泡过夜。然后用 0.20 μm 微孔滤膜过滤除菌得到无菌鸡肉浸提液(50%, *W/V*)。分

别取浸提液 3、4、5、6、7 mL 用无菌水补至 10 mL,稀释成 15%、20%、25%、30%、35% 系列浓度待用。

PCA 培养基:胰蛋白胨 5 g, 酵母提取物 2.5 g, 葡萄糖 1 g, H<sub>2</sub>O 1000 mL, 琼脂 2%。改良 CEA 培养基:将灭菌冷却至约 55°C 的 PCA 培养基按每平板 18 mL 倾倒平板,立即加入鸡肉浸液 2 mL 混合均匀,冷却凝固。

### 1.2 微生物计数

待检的鸡肉胴体采样参照国标 GB/T 4789.17-2003 并稍作修改。在各地点随机采取 3 份样品,每份 250 g,分装于无菌袋中真空封口,于 2°C-4°C 保温箱中 4 h 内带回实验室检测。将 25 g 鸡肉样品无菌研磨作为原液,按照 GB/T4789.2-2003 的规定,使用 PCA 培养基及含有不同浓度鸡肉浸液的改良 CEA 培养基进行菌落总数测定,比较菌落总数的变化,选择最有利于细菌生长的鸡肉浸液添加量以备后用。结果采用 SPSS 13.0 进行统计分析。

### 1.3 利用 CEA 培养基分离样品中的难培养污染菌

将 CEA 培养基中生长的所有菌落编号后,分别对应转入 2 个已分区并编号的 PCA 和 CEA 培养基平板,35°C 培养 48 h,观察其生长情况。分离纯化出只在 CEA 培养基中生长的菌落,观察其菌落形态并进一步镜检细胞。

### 1.4 Biolog 分析

采用 Biolog 公司的通用培养基(BUG + B)和革兰氏阳性微孔板 GP2 (由该公司提供)进行测试,使用 MicrostationTMV4.2 系统和 GP2 数据库进行分析。

### 1.5 16S rRNA 序列分析

按 Wilson 等的方法<sup>[8]</sup>进行菌株染色体 DNA 抽提。采用细菌 16S rRNA 通用引物,正向引物为 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为

5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应条件: 94°C 2 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后回收、纯化, 纯化后的片段与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取阳性克隆子质粒经双酶切和 PCR 验证后得到含有 16S rRNA 片段的重组菌, 送上海英骏公司测序, 拼接获得 16S rRNA 全长序列。

将测序获得的 16S rRNA 序列提交 GenBank 进行 BLAST 相似序列检索, 使用 ClustalX 1.83 软件进行序列分析, 再用 MEGA 4.0 软件包构建进化树。利用其中的 Kimura 2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-joining 法构建系统发生树, 1000 次随机抽样, 计算自引导值 (Bootstrap) 以评估系统发生树的置信度。

## 2 结果

### 2.1 培养基改良及细菌计数

对 PCA 及含有不同浓度鸡肉浸提液 CEA 培养基中的微生物菌落数进行统计 (图 1)。PCA 培养基中的平均菌落数为 38 CFU/g, 含有 1.5% 鸡肉浸液 CEA 培养基中的平均菌落数则为 46 CFU/g, 与 PCA 相比有显著增加 ( $P < 0.05$ ), 含 3.0% 鸡肉浸液 CEA 培养基中的平均菌落数为 64 CFU/g, 达到最高水平, 鸡肉浸液浓度的继续增加并未使菌落数有所增加。初步确定 CEA 培养基中添加的鸡肉浸液最佳终浓度为 3.0% (W/V), 后续实验即使用该添加浓度制备 CEA 培养基。

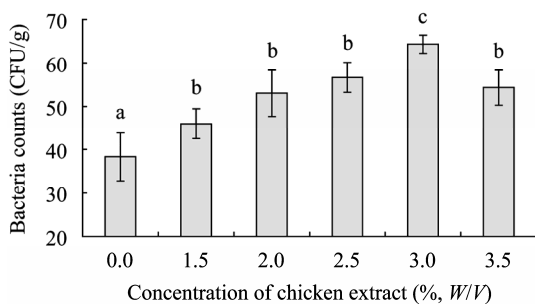


图 1 改良 CEA 培养基中鸡肉浸液浓度对细菌菌落总数的影响

Fig. 1 Effect of chicken extract concentration in modified CEA medium on microbial counts

Note: a-c: Differ ( $P < 0.05$ ). Each point represents the mean value from three replicates. Vertical bars denote standard deviation.

### 2.2 分离鉴定难培养菌

共挑取 CEA 计数平板中的 133 株细菌, 平行接种于 2 个 PCA 和 CEA 培养基平板后, 发现有 3 株细菌只能生长于营养较丰富的 CEA 培养基, 在 PCA 培养基中生长缓慢甚至不生长 (图 2)。



图 2 仅在改良培养基 CEA 上生长的 3 株细菌的菌落形态  
Fig. 2 Colony of three isolates only growing on modified CEA medium

挑取 3 株细菌用 CEA 平板进行纯化分离, 并对菌落及细胞形态进行初步观察 (表 1)。分别将 3 株菌命名为 CMA33、CMC18 以及 CMC19。

表 1 改良 CEA 培养基分离获得 3 株菌的形态学特征  
Table 1 The morphological properties of three strains isolated from modified CEA medium

特点 Characteristics of colony	菌株名称 Strains		
	CMA33	CMC18	CMC19
革兰氏染色 Gram staining	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>
菌体形态 Shape	球菌	杆菌	球菌
芽孢 Endospore	无	无	无
菌落形态 Form	圆形	不规则	圆形
菌落颜色 Color	乳白	粉红	白色
菌落隆起度 Elevation	凸起	凸起	扁平
边缘形状 Margin	整齐	不整齐	整齐
表面状态 Texture	平滑	粗糙	平滑
透明度 Optical property	不透明	不透明	半透明

### 2.3 Biolog 鉴定

将3株细菌在Biolog微平板中培养24 h, 检测其对板孔中95种碳源的利用情况, 结果如表2所示。经Biolog自动分析系统判定, CMA33和CMC19分别属于肠球菌属和葡萄球菌属, 其可能性均为99%, 相似性分别为0.910、0.900。CMC18属于罗氏菌属, 可能性为87%, 相似度为0.576。

### 2.4 16S rRNA 序列分析

经PCR扩增得到长度为1.5 kb左右的16S rRNA片段, 经全序列测定后与GenBank中已知序列比对, 发现CMA33与*Enterococcus faecalis*相似性高达99%, CMC18与*Rothia mucllaginosa*相似性为96%, 而CMC19与葡萄球菌的一个亚种*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*相似性高达99%。将3株菌的序列与*Enterococcus* sp.、*Rothia* sp.、*Kocuria* sp.和*Staphylococcus* sp.相关标准菌株进行比对, 得到3株菌在分类学中的地位(图3)。由图3可见, *Enterococcus*属下的*E. faecalis* ATCC 19433与CMA33在进化关系上具有最高相似性。CMC18在序列比对中显示出与*Rothia*和*Kocuria*属较高的同源性, 但在进化关系上CMC18与*R. nasimurium* sp. nov. CCUG 35957相似性最高, 而CMC19与*S. saprophyticus* subsp. ATCC 15305相似性较高。

## 3 讨论

由于实验室用培养基与微生物原本生活的食品中的营养成分不同, 部分食品中存在的细菌难以在培养基上生长<sup>[9]</sup>, 所以使用培养法检测鸡肉中难培养的污染菌需要特殊的营养条件。美国微生物检测标准通常使用PCA培养基在35°C培养温度下培养48 h, 该法被称为标准平板计数(SCP), 但这种方法并不能完整反映样品中微生物的数量与种类, 部分微生物由于营养不足生长缓慢而在检测时被遗漏。本研究设计出一种模拟鸡肉营养环境的培养基, 通过减少微生物转接过程中的适应压来优化微生物的生长。结果表明, 在传统PCA培养基的基础上加入鸡肉浸液, 提高了培养法检出微生物数量和种类的灵敏度。在细菌计数实验中, 可检出菌落数与添加鸡肉浸液终浓度之间存在一定的正比例关系, 但在鸡肉浸液终浓度达3.0% (W/V)后趋于平缓甚至略有下降, 这可能是由于这些寡营养微生物在迅速置于富营养状态时, 其初期的快速生长会产生大量的、微生物自身难以调节的过氧化物、超氧化物和羟基自由基等毒性物质, 该类物质的快速、过量积累会破坏细胞内膜结构, 导致细胞死亡, 所以含高浓度营养物质的培养基并不一定有利于微生物生长<sup>[10-11]</sup>,

表2 3株菌在Biolog微平板上对95种碳源的利用情况  
Table 2 Utilization of 95 carbon substrates by three strains determined by Biolog microplate

碳源 Carbon substrates	菌株名称 Strains			碳源 Carbon substrates	菌株名称 Strains			碳源 Carbon substrates	菌株名称 Strains		
	CMA33	CMC18	CMC19		CMA33	CMC18	CMC19		CMA33	CMC18	CMC19
水 H <sub>2</sub> O	-	-	-	α-甲基-D-半乳糖 α-Methyl-D-Galactoside	-	-	-	L-苹果酸 L-Malic Acid	w	-	-
α-环糊精 α-Cyclodextrin	+	w	-	β-甲基-D-半乳糖 β-Methyl-D-Galactoside	-	-	-	丙酮酸甲酯 Pyruvic Acid	+	w	-
®-环糊精 ®-Cyclodextrin	w	w	-	3-甲基-D-乳糖 3-Methyl-D-Glucose	-	+	w	琥珀酸甲酯 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	-	-	-
糊精 Dextrin	+	+	+	α-甲基-D-葡萄糖苷 α-Methyl-D-Glucoside	-	+	-	丙酸 Propionic Acid	-	-	-
淀粉 Glycogen	-	-	-	β-甲基-D-葡萄糖 β-Methyl-D-Glucoside	+	+	+	丙酮酸 Pyruvic Acid	+	w	+
菊糖 Inulin	-	-	-	α-甲基-D-甘露糖 α-Methyl-D-Mannoside	-	-	-	琥珀酰胺酸 Succinamic Acid	-	-	-
甘露聚糖 Mannan	-	+	-	6-O-D-吡喃葡萄糖酰- D-呋喃果糖 Palatinose	-	+	w	琥珀酸 Succinic Acid	-	-	-
吐温 40 Tween 40	-	-	w	D-洛酮糖 D-Psicose	+	-	w	酰基-L-乳酸胺谷氨酸 N-Acetyl-L-Lactamide Glutamic Acid	-	-	-
吐温 80 Tween 80	-	-	w	棉子糖 D-Raffinose	-	-	-	L-丙氨酸胺 L-Alaninamide	-	-	-
											待续

续表 2											
N-乙酰基-D-半乳糖	+	w	w	L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	-	-	D-丙氨酸 D-Alanine	-	-	-
N-乙酰基-D-葡萄糖	+	-	-	D-核糖 D-Ribose	+	+	-	L-丙氨酸 L-Alanine	-	-	-
苦杏仁苷 Amygdalin	w	-	-	水杨苷 Salicin	+	+	-	L-丙氨酰甘氨酸 L-Alanyl-Glycine	-	-	-
L-树胶醛糖 L-Arabinose	-	-	-	景天庚酮聚糖 Sedoheptulosan	-	-	w	L-天冬酰胺酸 L-Asparagine	-	-	-
D-阿拉伯糖 D-Arabitol	-	-	-	D-山梨醇 D-Sorbitol	w	-	w	L-谷氨酸 L-Glutamic Acid	-	-	-
熊果苷 Arbutin	+	+	w	水苏糖 Stachyose	-	-	-	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-Glutamic Acid	-	-	-
D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	w	+	蔗糖 Sucrose	+	+	-	L-焦谷氨酸 L-Pyroglutamic Acid	-	-	-
D-果糖 D-Fructose	+	+	+	D-塔格糖 D-Tagatose	w	-	-	L-丝氨酸 L-Serine	-	-	-
L-海藻糖 L-Fucose	-	-	-	D-海藻糖 D-Trehalose	+	+	+	丁二胺 Putrescine	-	-	-
D-半乳糖 D-Galactose	+	-	-	松二糖 Turanose	-	+	-	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	-	w	-
D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic Acid	-	-	-	木糖醇 Xylitol	-	-	-	丙三醇 Glycerol	+	-	-
龙胆二糖 Gentiobiose	+	w	w	D-木糖 D-Xylose	-	w	w	腺苷 Adenosine	+	w	w
D-葡萄糖酸 D-Gluconic Acid	-	-	-	醋酸 Acetic Acid	-	w	w	2'-脱氧腺苷 2'-Deoxy Adenosine	+	w	w
$\alpha$ -D-葡萄糖 $\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	$\alpha$ -羟基丁酸 $\alpha$ -Hydroxy butyric Acid	-	-	-	肌苷 Inosine	+	w	w
m-肌醇 m-Inositol	w	-	-	$\beta$ -羟基丁酸 $\beta$ -Hydroxy butyric Acid	-	-	-	胸苷 Thymidine	+	w	w
$\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-Lactose	-	-	-	$\gamma$ -羟基丁酸 $\gamma$ -Hydroxy butyric Acid	-	-	-	尿苷 Uridine	+	+	+
乳果糖 Lactulose	-	-	-	p-羟基苯乙酸 p-Hydroxy-phenylacetic Acid	-	-	-	5'-单磷酸腺苷 Adenosine-5'-Monophosphate	-	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	w	$\alpha$ -酮戊二酸 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	-	-	-	5'-单磷酸胸苷 Thymidine-5'-Monophosphate	-	-	-
麦芽三糖 Maltotriose	+	+	w	$\alpha$ -酮戊酸 $\alpha$ -Ketovaleric Acid	+	-	-	5'-单磷酸尿苷 Uridine-5'-Monophosphate	-	-	-
D-甘露醇 D-Mannitol	+	-	-	乳酰胺 Lactamide	-	-	-	6-磷酸-D-果糖 D-Fructose-6-Phosphate	w	-	-
D-甘露糖 D-Mannose	+	-	w	D-乳酸甲酯 Methyl Ester	-	-	-	1-磷酸- $\alpha$ -D-葡萄糖 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	-	-	-
D-松三糖 D-Melezitose	+	+	-	L-乳酸 L-Lactic Acid	-	w	-	6-磷酸-D-葡萄糖 D-Glucose-6-Phosphate	-	-	-
D-蜜二糖 D-Melibiose	-	-	-	D-苹果酸 D-Malic Acid	-	-	-	D-L- $\alpha$ -磷酸甘油 D-L- $\alpha$ -Glycerol-Phosphate	-	-	-

注: +: 利用; -: 不利用; w: 部分利用.

Note: +: Positive; -: Negative; w: Weak.

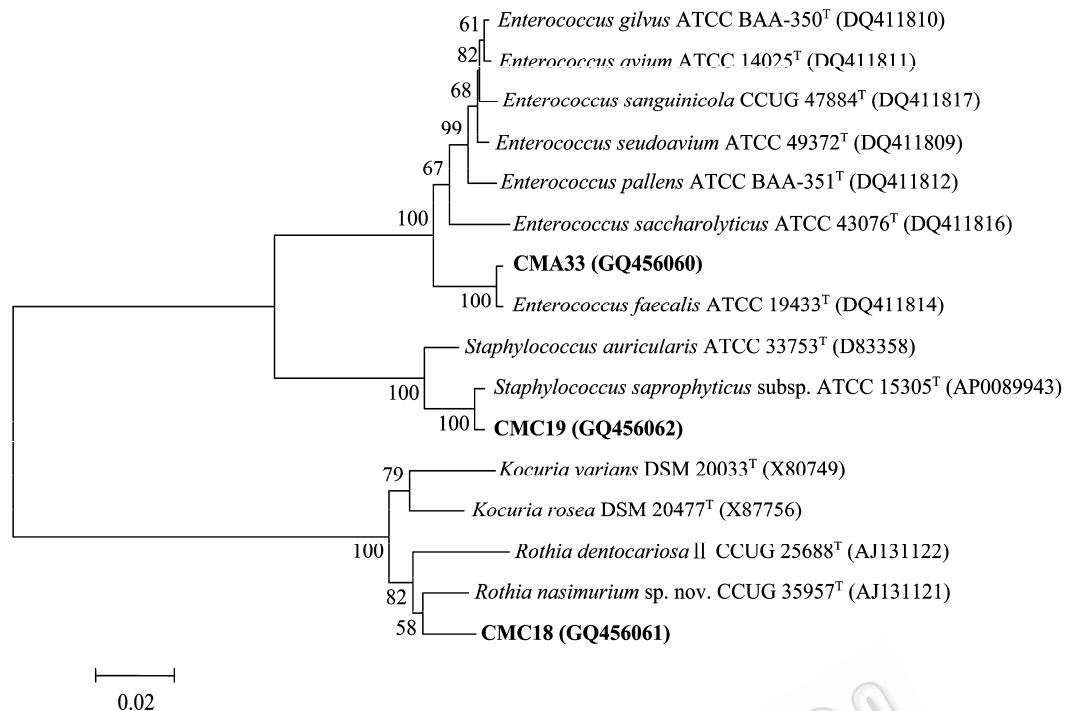


图3 基于16S rRNA序列CMA33、CMC18、CMC19的系统发育树

Fig. 3 Phylogeny tree based on the polygenetic analysis of 16S rRNA sequences showing the position of strains CMA33, CMC18, CMC19

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 1000 replications. The numbers on the tree indicate bootstrap values greater than 50%. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Bar: 0.02 sequence divergence.

而适当降低营养物质浓度可减弱这种不利影响。事实上,许多研究小组也都观察到了这一现象,如Aagot等发现低浓度基质的培养基培养出的细菌在数量和种类上均多于高浓度基质的培养基,但营养浓度过低时会使培养出的微生物数量反而下降<sup>[12]</sup>。

*Pseudomonas* sp.、*Brochothrix thermosphacta*、*Aeromonas* sp.、*Moraxella* sp.、*Staphylococcus* sp. 和 *Arthrobacter* sp.被认为是引起肉产品腐败的主要细菌。本研究发现 *Enterococcus faecalis*、*Rothia mucllaginosa* 和 *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* 存在于鸡肉胴体造成鸡肉产品的污染。*Enterococcus* sp.、*Rothia* sp.、*Staphylococcus saprophyticus* 均需要复杂的营养条件才能生长,但其最低营养需求目前还并不清楚。对作为奶酪等食品生产中风味形成不可缺少的功能菌 *Enterococcus* sp., 近来也存在着很大争议<sup>[13-14]</sup>, 因为其中部分菌株能够分解蛋白产生酪胺、组胺和色胺,这些胺类物质也正是导致肉品风味改变的一种指标。*Rothia* sp.能够利用葡萄糖生成乳酸、醋酸,也会引起肉产

品风味的改变,同时它还是引起败血症和心膜炎的条件致病菌<sup>[15]</sup>。*Staphylococcus* sp. 经常在蛋白质含量高的真空包装食品中被发现<sup>[16]</sup>, *S. epidermidis*、*S. hominis*、*S. sciuri*、*S. capitis*、*S. warneri*、*S. intermedius* 和 *S. lentus* 曾被发现是真空包装虹鳟鱼的主要腐败菌。

在我室另一项采用 ARDRA 非培养法对鸡肉中微生物生态的研究中发现,非培养法虽然使鸡肉中细菌的多样性得到更好的呈现,但采用该近自然培养法检测出的 *Enterococcus faecalis*、*Rothia mucllaginosa*、*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *Saprophyticus* 3种菌却未被检出(数据未发表),3种细菌只用培养法被检出说明,只依赖基于DNA技术的非培养法并不能完整地反映鸡肉中细菌的多样性,用培养法做补充能够更好地展示食品中污染微生物的多样性。

#### 4 结论

本研究采用近自然培养法,模拟鸡肉中的天然

营养条件培养鸡肉胴体中的污染微生物, 获得了高于传统培养方法的菌落总数, 并得到 3 株在传统培养基上无法生长的难培养菌, 且他们均为腐败菌或条件致病菌。该研究表明, 近自然培养法能够恢复对营养要求苛刻细菌的生长活力, 弥补传统培养方法的不足, 从而为研究细菌导致的肉类腐败提供更精确的依据。

## 参 考 文 献

- [1] Mcevoy JM, Doherty AM, Finnerty M, *et al.* The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Applied Microbiology*, 2000(30): 390–395.
- [2] Dainty RH, Mackey BM. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 1992(73): 103–114.
- [3] Mark P, Wayne S, Eric E. Considering the complexity of microbial community dynamics in food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 2004(90): 171–179.
- [4] John S. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 2000(17): 329–340.
- [5] Brightwell G, Clemens R, Adam K, *et al.* Comparison of culture-dependent and independent techniques for characterisation of the microflora of peroxyacetic acid treated, vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*, 2009(26): 283–288.
- [6] Florez A, Mayo B. Fungal diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 2006(10): 165–171.
- [7] Baross JA. Halophilic and osmophilic microorganisms// Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 2001: 187–193.
- [8] Wilson F. Preparation of genomic DNA from bacteria//Janssen K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates, 1994: 241–242.
- [9] Neviani E, Lindner JDD, Bernini V, *et al.* Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. *Food Microbiology*, 2009(26): 240–245.
- [10] Bloomfield SF, Stewart GS, Dodd CE, *et al.* The viable but nonculturable phenomenon explained? *Microbiology*, 1998(144): 1–3.
- [11] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Biology of Microorganisms*. The Nine Edition. New Jersey: Prentice-Hall, 2002: 158–161.
- [12] Aagot N, Nybroe O, Nielsen P, *et al.* An altered pseudomonas diversity is recovered from soil by using nutrient-poor pseudomonas-selective soil extract media. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001(67): 5233–5239.
- [13] Settanni L, Valmorri S, Suzzi G, *et al.* The role of environmental factors and medium composition on bacteriocinlike inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2008(25): 722–728.
- [14] Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, *et al.* Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 2000(20): 381–385.
- [15] Boudewijns M, Magerman K, Verhaegen J, *et al.* *Rothia dentocariosa*, endocarditis and mycotic aneurysms: case report and review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection*, 2003(9): 222–229.
- [16] Lyhs U, Bjorkroth J, Hyytia E, *et al.* The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C or 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 1998(45): 135–142.