

研究报告

鲜鸡蛋蛋壳表面细菌多样性分析

石一¹,李文涓¹,史伟¹,李欢²,张思若²,张欢³,刘东立¹,马国柱¹

(1. 陕西省疾病预防控制中心,陕西 西安 710054; 2. 西安交通大学医学部,
陕西 西安 710061; 3. 西安交通大学第二附属医院,陕西 西安 710004)

摘要:目的 了解鲜鸡蛋蛋壳表面菌落构成及其随时间的变化情况。方法 收集榆林、汉中和西安三个地市不同养殖场的鲜鸡蛋,于不同的时间点进行试验,采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis,PCR-DGGE) 和胶回收测序的方法对细菌构成多样性和样品间相似性进行分析。结果 与榆林组和西安组比较,汉中组的 Shannon 多样性指数和 Dice 相似性系数差异有统计学意义 ($P < 0.05$),菌落构成主要为厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria),葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 为优势菌属。结论 不同地区蛋壳表面的细菌存在多样性和复杂性,而存放初期和末期菌落的相似度较高。

关键词: 变性梯度凝胶电泳;鸡蛋;细菌;菌群

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2020)04-0374-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.04.005

Diversity of bacteria on fresh eggshell surface

SHI Yi¹, LI Wenjuan¹, SHI Wei¹, LI Huan², ZHANG Siruo², ZHANG Huan³,
LIU Dongli¹, MA Guozhu¹

(1. Shaanxi Center for Disease Control and Prevention, Shaanxi Xi'an 710054, China;
2. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Shaanxi Xi'an 710061, China; 3. The Second
Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Shaanxi Xi'an 710004, China)

Abstract: Objective To understand the composition of microbiota on the surface of fresh eggshell and its change over time. **Methods** The samples were collected from three cities and tested at different time points. The diversity and similarity of bacteria were analyzed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and sequencing method. **Results** The Shannon index and Dice index of bacteria on eggshell surface of Hanzhong were statistically significant different from Yulin and Xi'an. The bacteria were mainly Firmicutes and Actinobacteria, and the dominant genera were *Staphylococcus*, *Streptomyces* and *Lactobacillus*. **Conclusion** There were different bacteria on the surface of eggshell in different areas, but the microbiota in the early and late stage of storage time was very similar.

Key words: Denaturing gradient gel electrophoresis; eggshell; bacteria; microbiota

鸡蛋含有丰富的营养,是人们获取蛋白质的重要途径之一。根据世界粮农组织统计,我国是最大的鸡蛋生产国,其次为美国和印度^[1]。2014 年我国的禽蛋产量已经达到 2 893.89 万吨^[2]。禽蛋消费以鲜蛋为主,约占总消费的 90% 以上^[3]。随着贮藏时间的增加,因为鸡蛋富含水分和营养成分,极易

导致变质和腐败。蛋壳表面的微生物会透过气孔进入蛋内,从而引起鸡蛋的腐败变质。如果蛋壳上污染了致病菌,可能会引起食物中毒。由于在形成过程中或之后在流通领域和加工厂环境不同,鲜蛋受微生物污染的种类和严重程度各异^[4]。

传统分离培养由于培养基的限制会造成一定程度的偏倚^[5],随着分子生物学和分子生态学的迅速发展,大量新方法和新技术产生并被广泛应用,人们对自然界的理解和认识达到了前所未有的广度和深度。其中,以 16S rRNA 基因为靶分子进行细菌的系统进化研究^[6]和各种环境内的微生物群落结构组成研究,包括污水处理系统^[7]、沼气发酵池^[8-9]、植物根部土壤^[10]、口腔^[11]、肠道^[12]以及发

收稿日期:2020-03-16
基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目(2016SF-051);陕西省科技资源开放共享平台项目(2016FWPT-12)
作者简介:石一 男 主管技师 研究方向为病原微生物与生物检验 E-mail: 9134363@qq.com
通信作者:马国柱 男 副主任技师 研究方向为病原微生物与生物检验 E-mail:1377083969@qq.com

酵食品^[13]等也得以迅速发展和深入。聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术可以将大小相同但碱基序列不同的核酸片段分离,因此常作为研究微生物菌落结构的手段^[14]。

本研究采用 PCR-DGGE 的方法,分析了采集自陕西省三个地市不同养殖场的鲜鸡蛋,观察蛋壳表面细菌的多样性以及随时间的动态变化情况,以期为后期研究鸡蛋微生物污染和储存保鲜提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

选取榆林市 (YL 组)、汉中市 (HZ 组)、西安市 (XA 组) 三个地市,分别挑选一家具有代表性的蛋鸡养殖场进行取样,采集当天生产的鸡蛋,每个养殖场收集 30 枚鸡蛋,共 3 个批次。所有样品均遵循无菌采样的要求,存放于 25 ℃ 恒温培养箱,采样当天为 d0,并于后续第 14 天 (d14)、第 28 天 (d28)、第 42 天 (d42) 和第 56 天 (d56) 4 个时间点分别使用一次性棉拭子收集蛋壳样品。将采样拭子于无菌生理盐水中充分浸湿后,均匀擦拭蛋壳表面。所有棉拭子保存于-40 ℃ 冰箱,等待提取核酸。

1.1.2 主要仪器与试剂

Veriti96 梯度 PCR 仪 (美国 ABI), DGGE 变性梯度凝胶电泳仪、Powerpac 通用电泳仪、Gel Doc XR System 凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad, Thermo 通用型微生物培养箱。

DNA 核酸提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit (上海凯杰公司), PCR 试剂 (大连 TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

使用 DNA 核酸提取试剂盒 (51304), 采用改良的核酸提取方法提取样品 DNA。将采样棉拭子头剪入 1.5 mL 离心管中。加入 180 μ L 溶菌酶 (浓度 20 mg/mL), 涡旋振荡混匀于 37 ℃ 金属浴 30 min。加入 25 μ L 蛋白酶 K, 200 μ L AL 缓冲液, 涡旋振荡混匀于 56 ℃ 金属浴过夜。短暂离心, 将离心管中液体全部吸出转移至一新的 1.5 mL 离心管中。加 200 μ L 无水乙醇, 振荡混匀, 剩余步骤参照说明书进行。

1.2.2 巢式 PCR 扩增

首先选取 16S rRNA 基因全长引物 27F/1492R 对样品核酸进行扩增, 然后选取 16S rRNA 基因 V3 区引物 341F/534R 进行二次扩增。为了使巢式 PCR 产物在 DGGE 电泳中有较好的分离率, 扩增时

在 341F 的 5' 末端添加 GC 夹。

首轮反应体系 (25 μ L) 包括: 2.5 μ L 10 \times buffer, 上下游引物各 0.5 μ L, 0.5 μ L dNTP, 2.5 μ L MgCl₂, 0.2 μ L *Taq* DNA, 4 μ L 模板, 14.3 μ L ddH₂O。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。第二轮扩增体系 (50 μ L): 5 μ L 10 \times buffer, 上下游引物各 1 μ L, 1 μ L dNTP, 5 μ L MgCl₂, 0.4 μ L *Taq* DNA, 4 μ L 模板, 32.6 μ L ddH₂O。采用 Touchdown 反应程序: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 1 min, 65 ℃ 退火 1 min (之后每 2 个循环退火温度降低 1 ℃ 直至 55 ℃), 72 ℃ 延伸 1 min, 共 20 个循环; 95 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 10 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。2% 琼脂糖、0.5 \times TBE 凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 DGGE 电泳

按照电泳仪说明书, 配制 30% 和 65% 两种变性聚丙烯酰胺胶溶液。取两种变性胶溶液各 16.5 mL, 分别加入 120 μ L 10% 过硫酸铵和 50 μ L 四甲基乙二胺 (TEMED), 利用蠕动泵将胶溶液均匀打入提前安装好的垂直玻璃胶板中。向电泳槽中加入 1 \times TAE 缓冲液预热至 60 ℃。拔掉梳子装上胶板, 150 V 预电泳 30 min。取 15 μ L 第二轮 PCR 产物与 3 μ L 6 \times loading buffer 混合后上样。60 V 电泳 60 min, 随后调整电压至 90 V, 13~14 h 电泳过夜 (保持电泳温度在 60 ℃)。EB 染色 20 min, 使用凝胶成像系统拍照保存图像。

1.2.4 图像分析

使用 Quantity One 软件检测电泳图谱中各样品的条带数、灰度值等, 计算 Shannon 多样性指数。采用非加权配对算术平均 (UPGMA) 法进行聚类分析, 并计算 Dice 相似性系数。各计量资料结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析的方法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.5 条带回收及测序

选取 DGGE 凝胶上的共有条带和差异性条带进行切胶回收测序。在紫外灯下切下所选的条带 (尽量去除多余的凝胶), 切好的胶条用 20 μ L DEPC 水洗三遍, 浸泡于 20 μ L DEPC 水中 4 ℃ 过夜。吸取 5 μ L 浸泡液作为模板, 采用首轮 PCR 的方法用不含 GC 夹的 V3 区引物进行扩增, 产物送公司测序。

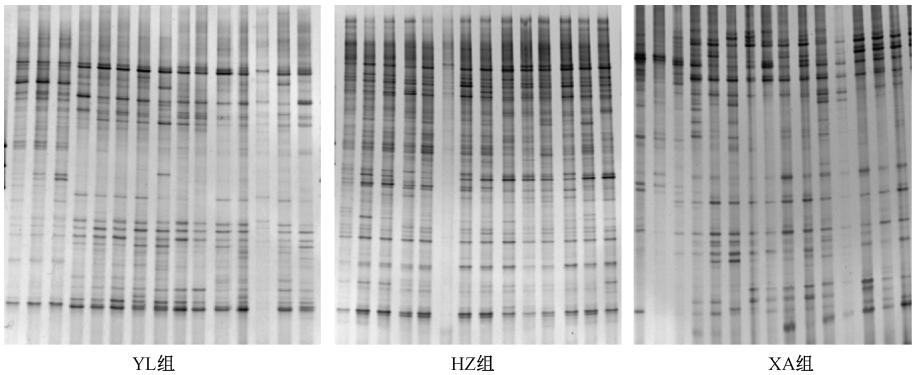
2 结果

2.1 PCR-DGGE 图谱比较

YL 组、HZ 组、XA 组的 PCR-DGGE 变化图谱如图 1 所示, 不同组别电泳条带数以及条带位置有所

不同,说明蛋壳表面细菌存在多样性和复杂性。组内样品间存在相同位置的条带,提示不同组别可能存在相同的细菌。有些条带贯穿整个观察周期,说明蛋壳表面细菌具有一定的稳定性。每组样品大

多由 20~30 条带组成,5~10 条较亮的条带为优势条带。从图谱中还可以发现,YL 组和 XA 组的电泳条带数和亮度随着时间变化而变化,呈现出先增加再减少的趋势。



注:泳道每 3 个为一组平行,从左到右依次为 d0、d14、d28、d42、d56

图 1 三个地区的 PCR-DGGE 电泳图谱

Figure 1 PCR-DGGE electrophoretic profiles of three regions

2.2 Shannon 多样性指数比较

根据 PCR-DGGE 条带灰度计算每组样品内的 Shannon 多样性指数结果显示,YL 组最低为 2.40,最高为 3.33,其中 d28 时最高;HZ 组最低为 1.79,最高为 3.64;XA 组最低为 2.20,最高为 3.33,HZ 组和 XA 组均为 d14 时最高(见表 1)。将 YL 组、HZ 组和 XA 组比较发现,HZ 组 Shannon 多样性指数最高,与其他组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2,表明 HZ 组样品蛋壳表面细菌构成较为复杂。

表 1 三个地区样品不同时间点的 Shannon 多样性指数

Table 1 Shannon diversity of samples from three regions at different time points			
存放时间	YL 组	HZ 组	XA 组
d0-1	3.18	3.30	3.00
d0-2	3.09	3.53	2.83
d0-3	3.18	3.56	2.89
d14-1	3.00	3.50	3.26
d14-2	3.30	3.64	3.33
d14-3	3.18	1.79	3.14
d28-1	3.14	3.50	3.09
d28-2	3.33	3.56	2.83
d28-3	3.22	3.47	3.09
d42-1	2.89	3.33	3.18
d42-2	3.00	3.43	3.30
d42-3	3.26	3.40	2.20
d56-1	2.40	3.47	3.00
d56-2	3.14	3.40	3.04
d56-3	3.26	3.30	3.14

表 2 不同地区细菌群落多样性和相似性比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of diversity and similarity of bacterial communities in different regions				
项目	YL 组	HZ 组	XA 组	P 值
条带数	22.73±4.25	30.29±7.57	21.13±4.75	0.00
Shannon 多样性指数	3.10±0.23	3.35±0.46	3.02±0.28	0.03
Dice 相似性指数	58.36±12.01	61.73±16.01	50.47±9.08	0.00

2.3 Dice 相似性系数和 UPGMA 聚类分析

使用 Quantity One 软件根据 UPGMA 法对三组菌群的相似性进行聚类分析,结果见图 2。从 UPGMA 聚类图发现,d0 时三组样品均能较好地聚类在一起,d14、d28 和 d42 时表现出一定的差异,d56 时 HZ 组和 XA 组又重新聚在一起,提示初期和末期菌群可能较为相似。使用 Dice 相似性系数确定各组间样品的相似性水平,结果显示 HZ 组 Dice 相似性系数平均值最高,与其他两组比较差异有统计学($P<0.01$),见表 2。

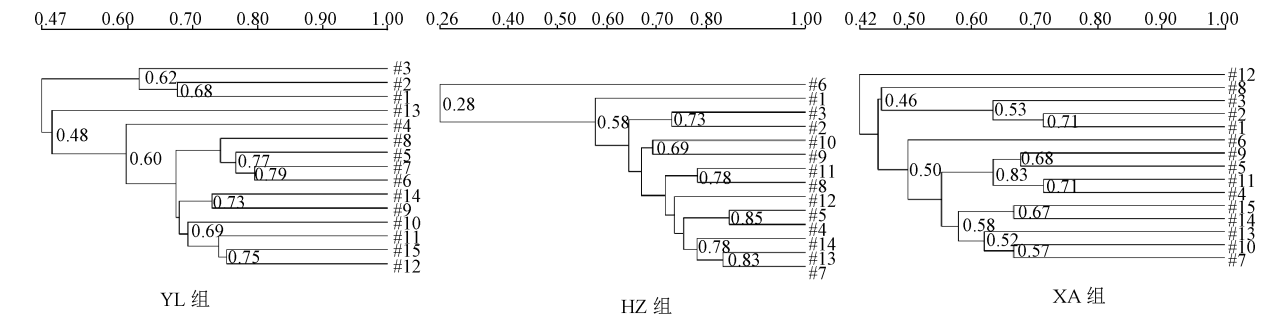
2.4 切胶回收测序结果

为了确定三组样品具体的细菌构成,在 DGGE 凝胶上尽可能选择更多的条带进行切胶回收测序,经 16S rRNA V3 区扩增单向测序后一共得到 123 条序列,通过美国生物信息中心(NCBI)数据库进行 BLAST 比对。由于扩增产物只有 193 bp,并且需要去除引物结合区约 20 bp 测序质量较差的碱基,因此测序结果只能确定至属(表 3)。

HZ 组条带数平均值最多,与其他两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。根据测序结果图谱上相同位置的电泳条带比对结果为同一菌属,说明不同样品间存在相同的细菌并具有一定的稳定性。同时相同位置电泳条带的测序结果一致也间接反映了 DGGE 图谱的可靠性。根据测序结果,三组的优势细菌主要归属于厚壁菌门和放线菌门,葡萄球菌属、链霉菌属和乳酸杆菌属在三组中的比例均较高。

3 讨论

蛋壳表面的微生物主要有两种来源:一种是



注: #1~#3 为 d0; #4~#6 为 d14; #7~#9 为 d28; #10~#12 为 d42; #13~#15 为 d56; HZ 组未分析#15

图 2 PCR-DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析结果

Figure 2 Results of UPGMA cluster analysis of PCR-DGGE

表 3 切胶回收测序结果

Table 3 Sequencing results of gel recycling

种类		YL 组 (n = 40)	HZ 组 (n = 39)	XA 组 (n = 44)
厚壁菌门 (Firmicutes)	乳酸杆菌属 (<i>Lactobacillus</i>)	8 (20.00%)	10 (25.64%)	6 (13.64%)
	葡萄球菌属 (<i>Staphylococcus</i>)	12 (30.00%)	12 (30.77%)	16 (36.36%)
	罗姆布齐亚菌属 (<i>Romboutsia</i>)	—	5 (12.82%)	—
放线菌门 (Actinobacteria)	链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>)	10 (25.00%)	12 (30.77%)	18 (40.91%)
	微球菌属 (<i>Micrococcus</i>)	4 (10.00%)	—	—
	棒状杆菌属 (<i>Corynebacterium</i>)	4 (10.00%)	—	4 (9.09%)
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	醇杆菌属 (<i>Sphingobacterium</i>)	2 (5.00%)	—	—

注:—表示未比对到该菌属

来源于自身,即鸡蛋在形成和产出过程中禽类本身的肠道微生物;另一种则是鸡蛋在贮存和运输过程中受到环境微生物的污染^[4]。在欧洲、美国和日本,由鸡蛋引起的大肠埃希菌和肠炎沙门菌食物中毒事件屡见报道,因此很多国家规定,鸡蛋产出后必须经过清洗、消毒才能上市销售^[15]。欧盟食品安全局则认为鸡蛋清洗后会破坏蛋壳外部的表皮层,也会增加沙门菌的污染,因此不建议清洗。

从构造看,鸡蛋壳外膜和内膜是防止微生物入侵引起腐败变质的屏障,但是这种屏障作用有一定的限度^[16]。蛋壳表面的菌群多种多样,并且只有一小部分是致病菌,一些正常菌群的增加似乎起到了避免鸡蛋被致病菌定植、防止鸡蛋腐败变质的作用^[17-18]。

从三个地市的 DGGE 图谱可以看出,不同地市蛋壳表面细菌存在多样性和复杂性。对雀形目鸟类进行过类似的研究,成年雀形目鸟类由于地理位置、饮食和季节的不同,其泄殖腔微生物群落存在差异^[19],因此蛋壳表面微生物群落差异可能与地理位置有关。汉中市地处陕西省南部,气候湿润,有利于细菌的生长繁殖,这可能是 HZ 组的 Shannon 多样性指数高于 XA 组和 YL 组的原因。另外,蛋壳表面微生物群落也可能受到饲料供应和鸡品种的影响,例如抗生素饲料补充剂可能会影响鸡肠道微生物群落结构^[20-21],这可能也是造成不同地区间样品存在差异的原因。

从 DGGE 条带的分布和数量还可以看出,样品

条带数随着观察时间的变化而变化,具体表现为先增加后减少,聚类分析发现 HZ 组和 XA 组存放初期 (d0) 和存放末期 (d56) 相似度较高,能够较好地聚类在一起。之前通过培养的方法对蛋壳表面菌落数进行分析^[22],这可能与菌落数的先增加后减少有关。

根据切胶测序的结果,三个地市蛋壳表面的细菌以厚壁菌门和放线菌门为主,但菌属构成各有不同,葡萄球菌属、链霉菌属和乳酸杆菌属在不同地市样品中的比例均较高。鸡盲肠中最主要的细菌门类为厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门,其余为放线菌门^[23]。其中厚壁菌门和变形菌门包括了大部分产臭味三甲胺的细菌^[24]。乳酸菌是禽类在孵化后最先在肠道出现的菌群,当禽类开始进食时,乳酸菌可在嗦囊和肠道迅速定植,从而维持动物肠道微生态平衡^[25]。另有报道^[4]蛋内发现的细菌主要有葡萄球菌、链球菌、大肠埃希菌、变形杆菌、假单胞菌属、沙门菌属等,而葡萄球菌、大肠埃希菌均能使禽蛋引起各种不同的腐败变质情况。本次观察到的链霉菌可能为研究鸡蛋有关腐败微生物奠定一定的理论基础。

近年来,随着高通量测序技术的发展,研究食品中微生物群落构成变得越来越简便易行,其特点是能够在极低的水平检测微生物的种类,相信在不久的将来借助宏基因组测序技术一定会为动态检测、监测食品中微生物菌群变化提供更多更有价值的生物学信息。

参考文献

[1] SUWANNARACH N, KAEWYANA C, YODMEEKLIN A, et al. Evaluation of *Muscodor cinnamomi* as an egg biofumigant for the reduction of microorganisms on eggshell surfaces and its effect on egg quality [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 244 (12) : 52-61.

[2] 李文博,徐桂云,郑江霞,等. 不同品种鲜蛋品质差异分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (5) : 2038-2041.

[3] 薛艳蓉,茂文,赵瑞生,等. 鸡蛋在储存过程中微生物及蛋白质的变化研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2017, 38 (8) : 67-69.

[4] 宾冬梅,钟金凤. 蛋壳及禽蛋中微生物的来源与腐败变质 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006 (3) : 45-47.

[5] ROUGER A, TRESSE O, ZAGOREC M. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics [J]. Microorganisms, 2017, 5 (3) : 1-16.

[6] WOESE C R. Bacterial evolution [J]. Microbiological Reviews, 1987, 51 (2) : 221-271.

[7] LYDMARK P, ALMSTRAND R, SAMUELSSON K, et al. Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot waste water treatment plant [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9 (9) : 2220-2233.

[8] MALIN C, ILLMER P. Ability of DNA content and DGGE analysis to reflect the performance condition of an anaerobic biowaste fermenter [J]. Microbiological Research, 2008, 163 (5) : 503-511.

[9] KIM T W, LEE J H, KIM S E, et al. Analysis of microbial communities in doen jang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131 (2/3) : 265-271.

[10] KIM M C, AHN J H, SHIN H C, et al. Molecular analysis of bacterial community structures in paddy soils for environmental risk assessment with two varieties of genetically modified rice, Iksan 483 and Milyang 204 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18 (2) : 207-218.

[11] SIQUEIRA J F, ROAS I N, DEBELIAN G J, et al. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects [J]. Journal of Endodontics, 2008, 34 (12) : 1457-1461.

[12] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science, 2005, 308 (5728) : 1635-1638.

[13] MAO P, HU Y L, LIAO T T, et al. Microbial diversity during fermentation of sweet paste, a Chinese traditional seasoning, using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27 (4) : 678-684.

[14] 杜丽平,刘艳,焦媛媛,等. PCR-DGGE 分析木瓜酵素自然发酵过程中微生物的多样性 [J]. 现代食品科技, 2017, 33 (8) : 80-87.

[15] 张志栋. 供给侧改革背景下饲料粮市场供需形势分析与展望 [J]. 中国猪业, 2017, 12 (2) : 13-15.

[16] 高玉时,张小燕,葛庆联,等. 鸡蛋不同保存方法品质变化规律的研究 [J]. 中国食物与营养, 2011, 17 (3) : 24-27.

[17] GRIZARD S, DINI-ANDREOTE F, TIELEMAN B I, et al. Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation [J]. Ecol Evol, 2014, 4 (7) : 1140-1157.

[18] COOK M I, BEISSINGER S R, TORANZOS G A, et al. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection [J]. Ecol Lett, 2005, 8 (5) : 532-537.

[19] KLOMP J E, MURPHY M T, BARTOS S S, et al. Cloacal microbial communities of female spotted towhees *Pipilo maculatus*: microgeographic variation and individual sources of variability [J]. J Avian Biol, 2008, 39: 530-538.

[20] BARUG D, JONG J D, KIES A K, et al. Antimicrobial growth promoters: where do we go from here? Molecular basis for AGP effects in poultry [M]. Wageningen Academic Publishers, 2006: 149-163.

[21] LU J, HOFACRE C L, LEE M D. Emerging technologies in microbial ecology aid in understanding the effect of monensin in the diets of broilers in regard to the complex disease necrotic enteritis [J]. J Appl Poult Res, 2006, 15 (1) : 145-153.

[22] 石一,张铮,吴守芝,等. 2016 年陕西省部分地市养殖场鲜鸡蛋微生物污染情况调查 [J]. 医学动物防制, 2017, 33 (7) : 709-713.

[23] WEI S, MORRISON M, YU Z T. Bacterial census of poultry intestinal microbiome [J]. Poult Sci, 2013, 92 (3) : 671-683.

[24] LONG C, WANG J, ZHANG H J, et al. Effects of dietary rapeseed meal supplementation on cecal microbiota in laying hens with different flavin-containing monooxygenase 3 genotypes [J]. Poult Sci, 2017, 96 (6) : 1748-1758.

[25] 王文梅,许丽,马卓,等. 乳酸菌制剂的作用机理及其在禽类生产中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44 (3) : 146-150.