

# 鸡蛋壳表面细菌数量及种群多样性分析

陈力力<sup>1,2</sup>, 杨伊磊<sup>1</sup>, 青文哲<sup>2</sup>, 刘焱<sup>1,2</sup>, 娄爱华<sup>1,2</sup>

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128)

(2. 食品科技和生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 采用 GB 4789.2-2010 菌落总数计数及 Miseq 测序分析物种多样性及群落结构的方法, 对蛋鸡场鸡蛋壳表面细菌数量及种群结构进行研究。结果检测 8 组样品的菌落总数为  $3.79 \pm 0.67 \sim 5.06 \pm 0.75$  Log CFU/eggshell  $\pm$  SD; 获得的 163214 条优化序列分属于变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 及蓝菌门 (Cyanobacteria)。8 组样品普遍存在假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、埃希氏-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*)、泛菌属 (*Pantoea*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 细菌; 而各样品分别以假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、埃希氏-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 以及肠球菌属 (*Enterococcus*) 的相对丰度最大, 依次为 67.89%、36.15%、68.08%、40.12%、21.59% 和 26.98%。试验结果表明鸡蛋壳表面细菌数量大、种群多, 不同样品间存在相似性差异。鸡蛋腐败变质可能与鸡蛋壳表面细菌种群有关, 有待进一步研究。

**关键词:** 鸡蛋壳; 菌落总数; 细菌多样性

文章编号: 1673-9078(2015)10-74-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.013

## Aerobic Plate Count and Bacterial Diversity on the Surface of Eggshells

CHEN Li-li<sup>1,2</sup>, YANG Yi-lei<sup>1</sup>, QING Wen-zhe<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1,2</sup>, LOU Ai-hua<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The aerobic plate count (APC) and the bacterial population structure and diversity on the eggshell surface were studied on the basis of GB 4789.2-2010 and 16SrDNA sequence analysis using the Illumina Miseq Platform. The results showed that the APC values of eight samples ranged from  $3.79 \pm 0.67$  to  $5.06 \pm 0.75$  log CFU/eggshell  $\pm$  SD. The 163214 sequences of the eight samples belonged to Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria and Cyanobacteria, among which *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia-Shigella*, *Pantoea*, and *Pseudomonas* were dominant in eight samples. In each sample, *Pseudomonas*, *Escherichia-Shigella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, and *Enterococcus* showed the highest relative abundance, which were 67.89%, 36.15%, 68.08%, 40.12%, 21.59%, and 26.98%, respectively. The experimental results demonstrated that there were several bacteria and large bacterial populations present on the eggshell surface, and there were abundance differences for the given bacteria among different egg samples. Egg spoilage may be related to the presence of these bacteria on the eggshell surface and this aspect needs to be studied further.

**Key words:** eggshell; aerobic plate count; bacterial diversity

鸡蛋富含人体所需的优质蛋白质、多种氨基酸、矿物质、维生素等营养物质, 是天然营养食品之一, 然而丰富的营养物质也是微生物滋生的温床。鸡体健康状况较差时, 生殖器官的抗菌能力减弱, 来自肠道或肛门中的病原菌可通过卵巢污染鸡蛋; 鸡蛋经泄殖腔产出时, 会受到排泄物中细菌的污染; 鸡蛋在贮藏和销售环节也会受到环境微生物的污染, 由此导致微生物在鸡蛋表面生长繁殖。鸡蛋表面的黏液层虽对微生物的侵入有一定自卫能力, 但是随着贮存时间延长

收稿日期: 2014-12-14

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303084)

作者简介: 陈力力(1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物学

及温度变化, 这种能力逐渐减弱。人们认为污染蛋壳表面的微生物可以通过渗透侵入蛋内, 导致蛋内容物细菌污染, 并把这种方式称为水平感染途径<sup>[1]</sup>, 蛋壳异常如较薄、壳表面孔增多时更有利于菌体侵入, 蛋壳的半透明物质可增加细菌的穿透力<sup>[2-3]</sup>。进一步研究表明随着蛋壳表面微生物数量增多, 蛋壳微生物渗透侵入造成蛋内容物污染的风险加大, 尤其是肠杆菌科细菌的污染<sup>[4]</sup>。鸡蛋表面的微生物侵入蛋内不仅可改变蛋内容物的结构形态, 而且可使蛋内的主要营养成分发生分解, 使蛋白变稀、系带液化断裂、蛋黄膜失去弹性而破裂、蛋黄与蛋白相混、色泽变黑、产生大量的硫化氢等臭味气体, 造成鸡蛋腐败变质, 影响鸡

蛋的保质期,更为严重的是致病菌所引起的食物中毒对人体健康带来危害。

随着人们生活水平的提高,鸡蛋的微生物污染问题已经越来越引起了重视,在31个国家的食品微生物限量标准中,已有18个国家规定鸡蛋中不得检出沙门氏菌<sup>[5-6]</sup>,我国国家制定了相应的蛋卫生标准(GB2740、GB/T 5009.47等);人们采取物理化学方法在鸡蛋上市前进行清洗、消毒等洁蛋处理,控制鸡蛋表面微生物指标<sup>[7-8]</sup>;研发应用大肠杆菌、沙门氏菌快速检测方法,控制污染鸡蛋上市,避免其对人体健康造成影响。由于鸡蛋表面微生物来源广泛,其污染程度受温度、湿度、养殖规模等环境因素及饲料等的影响,具有种群的复杂性和多样性,为此本研究在采用国标法测定鸡蛋壳表面菌落总数的同时,进行样品的Miseq测序,分析物种多样性及群落结构,以及分析鸡蛋表面细菌对鸡蛋腐败变质的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2013年9月至2014年4月,从湖南省长沙、常德、岳阳、益阳4地市8个规模化养鸡场现场随机采集新鲜鸡蛋,采集时根据鸡场规模,参照2013年国家“兽药残留抽样检测技术操作要点”的抽样办法,各鸡场无菌操作抽取鸡蛋50-80枚作为检测样品,所有样品蛋分别装入无菌采样袋中,密封,编号,10-20h内检测处理。

### 1.2 试剂与主要仪器

PCA培养基(北京陆桥技术有限责任公司);细菌基因组DNA提取及PCR扩增试剂盒等(北京全式金生物技术有限公司);无菌采样袋(229 mm×140 mm)北京士博瑞科技有限公司;ABI GeneAmp® 9700型PCR仪(爱普拜斯公司);QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司);Miseq仪(Illumina公司)。

### 1.3 样品细菌菌落总数的测定

分别向上述装有样品蛋的无菌采样袋中加入100 mL 无菌生理盐水,常温条件下置超声波清洗器中处理50 s,获取洗蛋水作为样品(两个鸡蛋的洗蛋水合为一份)并10倍梯度稀释,取稀释倍数为 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 的样品匀液按照《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》GB 4789.2-2010中的平板计数法进行菌落总数计数,最后取各鸡场检测样品菌落总数的平均值,以

CFU/个鸡蛋蛋壳报告结果。

### 1.4 样品总 DNA 提取及 PCR 扩增

以各鸡场洗蛋水混合液作为样品,使用EasyPure Genomic DNA Kit (H30909)试剂盒抽提样品基因组DNA,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测;根据Miseq测序区域(V4+V5),采用合成带有barcode的特异引物Primer 515F: GTGCCAGCMGCCGCGG及Primer 907R: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT进行细菌16 S rRNA V4+V5区PCR扩增,PCR扩增反应体系及反应参数如下:

TransGen AP221-02; TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20μL 反应体系		PCR 反应参数
a. 5×FastPfuBuffer	4.0 μL	a. 1×(2 min at 95 °C)
b. 2.5 mM dNTPs	2.0 μL	b. 25×(30 s at 95 °C; 30 s at 55 °C; 30 s at 72 °C)
c. Forward Primer(5μM)	0.4 μL	
d. Reverse Primer(5μM)	0.4 μL	c. 5 min at 72 °C, 10 °C
e. FastPfu Polymerase	0.4 μL	
f. TemplateDNA	10 ng	
g. 补ddH2O 至	20.0 μL	

### 1.5 Miseq 测序及数据分析

所得PCR产物经切胶纯化后(Qiagen胶回收试剂盒),用NanoDrop 2000(Thermo Fisher Scientific Inc. USA)测定浓度,参照电泳初步定量结果,将PCR产物用QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量,之后按照每个样品的测序量要求,进行相应比例的混合,由上海美吉生物医药科技有限公司上机测序。

首先根据overlap关系对Miseq测序得到的PE reads进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,根据barcode区分样品后进行OTU聚类分析和物种分类学分析。基于OTU聚类分析结果,采用mothur软件及菌群丰度指数算法对OTU进行群落的物种丰度和多样性指数分析,用于指数评估的OTU相似水平97%(0.97),另外利用R语言工具制作丰度分布曲线图;基于分类学信息,在属的水平上,对各样品进行群落结构的统计分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品菌落总数测定结果

各鸡场鸡蛋表面细菌菌落总数检测结果见表1,8组样品鸡蛋表面细菌总数都达到万级以上水平,最多

为  $5.06 \pm 0.75$  LogCFU/个鸡蛋蛋壳。不同采样时间检测结果没有明显差异,这是因为检测期间季节温度变化小。2013 年湖南平均气温偏高,呈现“该冷不冷,该热不热”的天气气候特征,2014 年出现十年罕见的暖冬,一月最高气温逼近  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[9]</sup>。不同鸡场规模的检测结果区别不大,说明污染程度与规模大小没有直接关系,而是与鸡场设施及卫生条件相关。

表 1 样品菌落总数

Table 1 Aerobic plate count of samples

Sample	sampling time	Scale of farm	Log CFU/eggshell of APC
GK	130926	A	$4.29 \pm 0.60^a$
GS	131206	A	$3.79 \pm 0.67^a$
TK	140115	B	$4.97 \pm 0.59^b$
TS	140326	A	$4.49 \pm 0.20^a$
WK	131010	A	$4.39 \pm 0.52^a$
WS	131203	B	$5.06 \pm 0.75^b$
YS	131228	B	$4.10 \pm 0.57^b$
YX	140410	A	$4.55 \pm 0.35^a$

注: A: 日产蛋量 5001~10000 枚, B: 日产蛋量 >10000。

a: 数值表示 25 个样品菌落总数对数的平均值  $\pm$  标准差。b: 数值表示 40 个样品菌落总数对数的平均值  $\pm$  标准差。

## 2.2 细菌多样性及群落结构分析

### 2.2.1 Miseq 测序结果

取各样品总 DNA 2  $\mu\text{L}$  加样进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,如图 1,其浓度和纯度符合进行 PCR 扩增的要求。

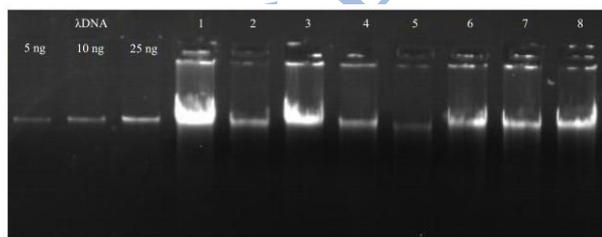


图 1 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA detected by 1% agarose gel electrophoresis

注: 按编号顺序样品分别为 GS、WK、GK、WS、TS、TK、YS、YX。

分别以提取的总 DNA 为模板,扩增其 16SrRNA,取 PCR 扩增产物 3  $\mu\text{L}$  上样进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,如图 2,表明 PCR 产物目的条带大小正确,浓度适合于进一步测序分析。经上海美吉生物医药科技有限公司对 8 个样本进行测序后共获得 163214 条优化序列,平均每个样本获得 20401.75 条序列,序列平均读长 396.2 bp。

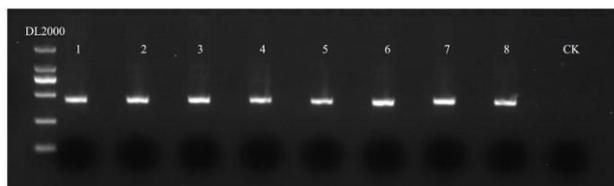


图 2 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR-amplified DNA fragments detected by 2% agarose gel electrophoresis

注: 按编号顺序样品分别为 GS、WK、GK、WS、TS、TK、YS、YX。

### 2.2.2 多样性指数

对 8 个样本进行指数分析,结果见表 2。Chao 指数是用 chao1 算法估计样品中所含 OTU 数目的指数, chao1 在生态学中常用来估计物种总数, ace 指数与之类似,指数越大生物量越高。根据表 2 结果各样品生物量大小排序为 TK、TS、YS、WS、GS、WK、YX、GK。

Shannon 指数是用来估算样品中微生物多样性的指标之一,它与 Simpson 多样性指数常用于反映 alpha 多样性指数。Shannon 值越大, Simpson 指数值越小,说明群落多样性越高。由表 2 中结果可知 WK 样品多样性指数最高,样品中的微生物丰富,其次为 GK、YS、YX、WS、TS、TK、GS。

表 2 多样性指数统计表

Table 2 Statistical table of diversity indices

Sample	Chao	Ace	Shannon	Simpson
GK	25.62675	28.03596	1.679267	0.234038
GS	29.71809	38.43969	1.070188	0.500373
TK	88.61691	84.95864	1.114158	0.486235
TS	53.61691	53.08762	1.416177	0.463093
WK	27.13183	26.00238	1.712665	0.258811
WS	29.71809	32.60639	1.482161	0.361281
YS	30.79363	30.68529	1.658637	0.262324
YX	26.42942	28.48610	1.545015	0.270966

### 2.2.3 丰度分布曲线

丰度分布 Rank-abundance 曲线是分析多样性的一种方式,可用来解释物种丰度和物种均匀度。图 4 为统计本试验单一样品中每一个 OTU 所含的序列数,将 OTUs 按所含有的序列条数(丰度)由大到小等级排序以后,以 OTU 等级为横坐标,以每个 OTU 中所含的序列数的相对百分含量为纵坐标,利用 R 语言工具制作的丰度分布曲线。如图 3 所示,在水平方向,TK 样品曲线在横轴上的宽度范围最大,说明其物种的丰度最高;在垂直方向,8 种样品的曲线斜率均较大,说明各物种所占比例差异较大。

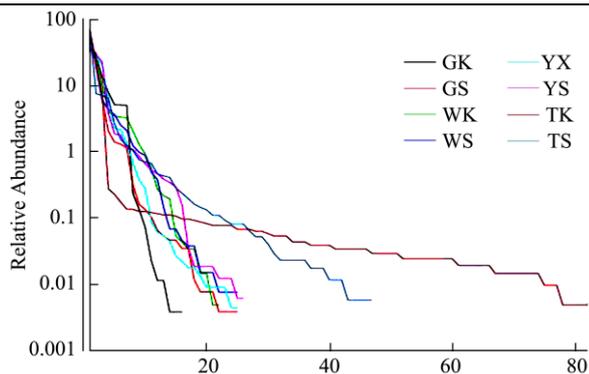


图3 丰度分布曲线图

Fig.3 Rank abundance curves

2.2.4 群落组成

根据 Silva 的 SSUrRNA 序列数据库对优化序列进行分类, 在 163214 条优化序列中, 有 66.21%(108057 条)的序列属于变形菌门 (Proteobacteria), 其次有 23.4% (38195 条)的序列属于厚壁菌门(Firmiutes),

另外放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 及蓝菌门 (Cyanobacteria)占有极少比例。

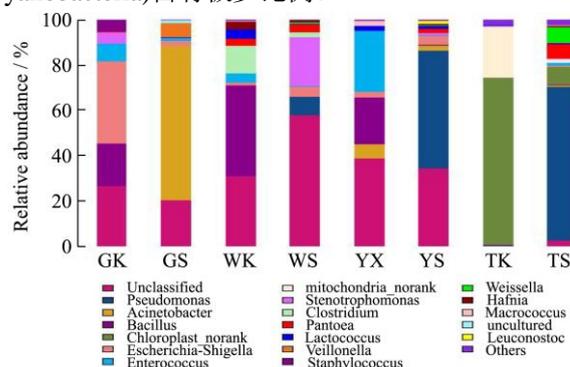


图4 多样品种分布柱状图

Fig.4 Bar graph of the distribution of multi-sample species

注: 为使视图效果最佳, 作图时丰度低于 1%的部分合并为 other 在图中显示。

表3 多样品种相对丰度分布统计表 (%)

Table 3 Statistical table of distribution of the relative abundance of multi-sample species

Genus	GK	GS	WK	WS	YX	YS	TK	TS
Unclassified	26.63	20.50	30.93	57.88	38.79	28.60	0.26	02.67
<i>Pseudomonas</i>	0.03	0	0.01	8.11	0.06	51.89	0.14	67.89
<i>Acinetobacter</i>	0	68.08	0	0.12	6.28	2.09	0.12	0.56
<i>Bacillus</i>	18.78	0.05	40.12	0.05	20.73	0.48	0.11	0.31
Chloroplast_norank	0	0	0.01	0	0	0.01	73.92	07.84
<i>Escherichia-Shigella</i>	36.15	2.05	1.30	4.33	2.30	3.82	0.08	0.70
<i>Enterococcus</i>	7.87	1.30	4.00	0.14	26.98	0.39	0.02	1.25
mitochondria_norank	0	0	0	0	0	0	22.54	1.54
<i>Stenotrophomonas</i>	5.02	0.03	0.03	21.59	0	0.85	0.03	0.09
<i>Clostridium</i>	0	0	12.16	2.18	0	0	0	0
<i>Pantoea</i>	0.23	0.13	3.26	3.64	0.06	1.86	0.23	6.47
<i>Lactococcus</i>	0	0.16	3.87	0.39	2.02	1.48	0.12	0.26
<i>Veillonella</i>	0	6.21	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	5.07	0	0.05	0	0.01	0	0.08	0.14
<i>Weissella</i>	0	0	0	0.49	0.01	7.0	0	0.16
<i>Hafnia</i>	0	0.10	3.48	0.99	0	0.46	0	0.76
<i>Macrococcus</i>	0.14	0	0.22	0	2.16	0.02	0	0
uncultured	0	1.14	0	0	0	0	0	0.1
<i>Leuconostoc</i>	0	0	0	0	0	1.05	0.04	0.08
other	0.08	0.251	0.57	0.21	0.59	0	2.32	9.18

为了解菌群的分布情况, 在属的水平上对各样品物种丰度进行统计, 通过 QIIME 软件包, 进行了多样本菌群柱状图的绘制, 如图 4 所示, 8 个样品所含物种相似, 但物种分布差异较大; 进一步对样品所含主要种属分析和归类可知, 主要物种包括 6 类, 其中 YS、TS 样品中假单胞菌(*Pseudomonas*)相对丰度最大, 分

别为 51.89%和 67.89%; 其他样品分别含有一类优势菌群, GK 样品中埃希氏-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)相对丰度 36.15%、GS 样品中不动杆菌属 (*Acinetobacter*)相对丰度 68.08%、WK 样品中芽孢杆菌属 (*Bacillus*)相对丰度 40.12%、WS 样品中寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 相对丰度 21.59%、YX 样

品中肠球菌属(*Enterococcus*)相对丰度 26.98%，虽然 TK 没有明显的优势物种，但得到了 20674 条序列，说明其物种种类最多。此外在 8 个样品中发现有泛菌属 (*Pantoea*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、巨型球菌属 (*Macroccoccus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、哈夫尼菌属 (*Hafnia*) 细菌等。

### 2.2.5 聚类分析

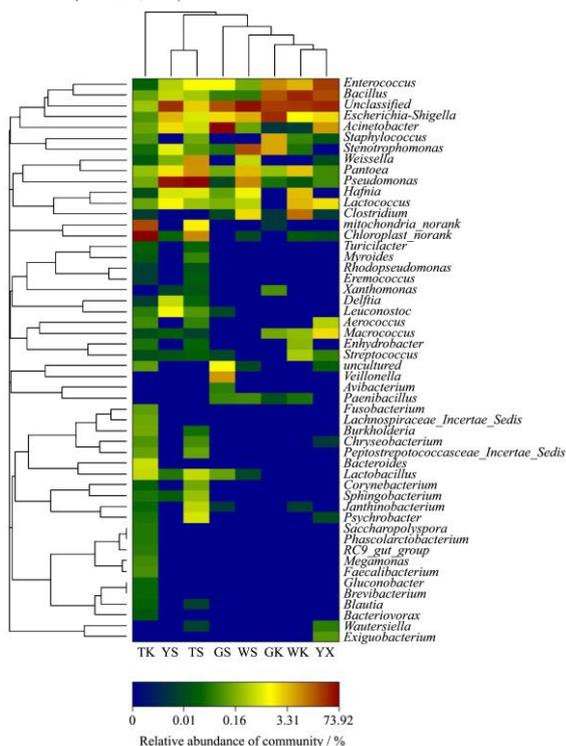


图 5 多样物种热图

Fig.5 Heatmap of multi-sample species

Heatmap 可以用颜色变化来反映二维矩阵的数据信息，直观地将数据值的大小以定义的颜色深浅表示出来，通过颜色的梯度及相似程度反映数据的相似性和差异性。图 5 是根据不同样品中各 OTU 所含序列数越相近，即所含菌属数量越相近，样品间相似性越高的特点，在属水平上对样品和样品所含菌属进行聚类，对聚类后各样品中不同 OTU (不同菌属) 所含序列的丰度作的 heatmap 图，上方的树状图反映样品的相似度、左边的树状图反映了菌属相似度。如图 5 所示，8 个样品都含有肠球菌属(*Enterococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、埃希氏杆菌-志贺氏杆菌属(*Escherichia-Shigella*)、泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 的细菌，因此这几行都以深浅不同的黄红、亮黄和绿色表示，表现出有较高的相似度，虽然样品之间存在颜色差异，但也说明它们是样品中普遍存在的群落；其他区域都有蓝色出现，说明它们只是某些菌属或样品具有相似度，例如，禽杆菌属 (*Avibacterium*) 和类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*) 分别有一个草绿色区域，

其他均为蓝色，梭菌属(*Fusobacterium*)和毛螺旋菌属 (*Lachnospiraceae\_Incertae\_Sedis*) 分别有一个嫩绿色区域，其他均为蓝色，说明它们两两之间具有较高的丰度相似度，但样品间的差异性极大，仅在 GS 和 YK 存在。因此，从 heatmap 的颜色分布可以了解各菌属之间以及菌在不同样品丰度相似度情况。

### 3 结论

3.1 菌落总数常用来判定细菌污染食品的程度及卫生质量，反映食品在生产过程中是否符合卫生要求，以便对被检样品做出适当的卫生学评价。本研究采用细菌平板计数法进行检测，抽检鸡蛋表面带菌率 100%，菌落总数多在  $10^4$  CFU/蛋壳以上。根据 GB 4789.2-2010 标准国家标准方法规定，菌落总数是指在需氧情况下，37 °C 培养 48 h，能在普通营养琼脂平板上生长的细菌菌落总数，而厌氧或微需氧菌、有特殊营养要求的以及嗜中温的细菌，由于培养条件不能满足其生理需求，难以在此繁殖生长。因此菌落总数并不表示实际中的所有细菌总数，而且不能区分其中细菌的种类。

3.2 本研究在测定菌落总数的基础上，采用 MiSeq 测序方法，直接从样品中扩增高变区进行测序，避免了不可培养菌株的不可测性，客观地还原了菌群结构及丰度比例。研究结果表明 8 组样品普遍存在肠球菌属、埃希氏菌-志贺氏菌属、泛菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属细菌，具有相似性；而各样品分别以假单胞菌属、埃希氏-志贺菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属、寡养单胞菌属以及肠球菌的相对丰度最高，同时也存在相对丰度极低但可能对鸡蛋品质造成影响的其它类群，如葡萄球菌属、禽杆菌属、哈夫尼菌属、梭菌属细菌等。

3.3 本研究中没有发现文献资料中已经报道的鸡蛋传播传染病病原沙门氏菌、弯曲杆菌以及李斯特氏菌，但已有研究证明由于鸡蛋表面细菌可以渗透侵入蛋内，从蛋表面及洗蛋水中分离的变形杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、克雷伯氏菌属、气单胞菌属、毗邻单胞菌属、产气杆菌属和柠檬酸菌属细菌能导致鸡蛋腐败，并可通过鸡蛋进入食物链造成人类感染<sup>[10,11]</sup>。肠球菌属是人类和动物肠道正常菌群的一部分，其中粪肠球菌分离率最高，其次为屎肠球菌，既往认为肠球菌是对人类无害的共栖菌，但近年研究已证实了肠球菌的致病力。大肠埃希氏菌通常被称为大肠杆菌，由于一些特殊血清型的大肠杆菌对人和动物有病原性，尤其对婴儿和幼畜(禽)，常引起严重腹泻和败血症，因此大肠菌群计数被作为食品卫生微生物检验指

标。另有研究报道在高湿条件下,假单胞菌可消化掉蛋壳表面的保护层,降低保藏时间<sup>[12]</sup>。因此认为本研究各组样品存在的肠杆菌、肠球菌及假单胞菌属细菌可能是引起鸡蛋腐败的主要原因。大多数芽孢杆菌属细菌有益无害,人们从鸡肠道中分离得到的鸡源益生菌 JM-35(*Bacillus subtilis*)能够抑制致病性大肠杆菌<sup>[13]</sup>,但蜡样芽孢杆菌可引起腹泻型和呕吐型食物中毒,尽管各国并未强制要求检测食品中蜡样芽孢杆菌含量,已有调查表明蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒是最常见的食物中毒之一,而且已报导从变质鸡蛋中分离得到蜡样芽孢杆菌,并认为蜡样芽孢杆菌可能影响鸡蛋保鲜和使用安全性<sup>[14]</sup>,本研究中芽孢杆菌属相对丰度较高,因此也存在蜡样芽孢杆菌造成鸡蛋腐败的可能。综上所述,本研究比较全面地了解了鸡蛋表面细菌的多样性,分析了鸡蛋表面细菌对鸡蛋腐败变质的潜在影响,为进一步研究提供了参考。

#### 参考文献

- [1] Schoeni JL, Glass KA, Mcdermott JL, et al. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 24: 385-396
- [2] De Reu K, Rodenburg TB, Grijspeerdt K, et al. Bacteriological contamination, dirt, and cracks of eggshells in furnished cages and noncage systems for laying hens: an international on-farm comparison [J]. Poultry Science, 2009, 88: 2442-2448
- [3] Chousalkar KK, Flynn P, Sutherl M, et al. Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142: 207-213
- [4] Messens W, Grijspeerdt K, De reu K, et al. Eggshell penetration of various types of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70: 623-628
- [5] 宋东亮,姚四新,索勋,等.禽蛋沙门氏菌检测技术综述[J].中国动物检疫,2009,26(3):60-63  
SONG Dong-ling, YAO Si-xin, SUO Xun, et al. A review of poultry *Salmonella* detection technologies [J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2009, 26(3): 60-63
- [6] Darrell W, Trampel Thomas G, Holder Richard K, et al. Integrated farm management to prevent *Salmonella enteritidis* contamination of eggs [J]. The Journal of Applied Poultry Research, 2014, 23(2): 353-365
- [7] Turtoi M, Borda D. Decontamination of egg shells using ultraviolet light treatment [J]. World's Poultry Science Journal, 2014, 70: 265-276
- [8] Wells JB, Coufal CD, Parker HM, et al. Disinfection of eggshells using ultraviolet light and hydrogen peroxide independently and in combination [J]. Poultry Science, 2010, 89: 2499-2505
- [9] 江艳,邓婕,杨亚平,等.2013年湖南省长沙市罕见高温分析[J].北京农业,2014,5:69-171  
JIANG Yan, DENG Jie, YANG Ya-ping, et al. Analysis of a rare high-temperature in Changsha Hunan [J]. Beijing Agriculture, 2014, 5: 169-171
- [10] Adesiyun A, OYah N, Seepersadsingh N, et al. Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs [J]. Food Research International, 2006, 39: 212-219
- [11] Musgrove MT, Jones DR, Northcutt JK. Identification of Enterobacteriaceae from washed and unwashed commercial shell eggs [J]. Journal of Food Protection, 2004, 67: 2613-2616
- [12] Board RG, Loseby S, Miles VR. A note on microbial growth on hen egg-shells [J]. British Poultry Science, 1979, 20: 413-420
- [13] 郝庆红,郭云霞,刘月琴,等.鸡源抗腹泻芽孢益生菌 JM-35 摇瓶发酵产芽孢条件优化[J].河北农业大学学报,2013, 36(2):103-108  
HAO Qing-hong, GUO Yun-xia, LIU Yue-qin, et al. Optimization of spore production conditions of probiotics JM-35 showing antidiarrhoea effects from chicken [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2013, 36(2): 103-108
- [14] 潘青,杨君敬,李树梅,等.变质鸡蛋中蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J].中国兽医杂志,2011,47(4):18-22  
PAN Qing, YANG Jun-jing, LI Shu-mei, et al. Isolation and identification of a *Bacillus cereus* in deteriorated eggs [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2011, 47(4): 18-22