

生物发酵床养猪垫料中营养成分和微生物群落研究

赵国华¹, 方雅恒¹, 陈贵^{2*}

(1. 嘉兴学院生物与化学工程学院, 浙江嘉兴 314001; 2. 嘉兴市农业科学研究院农业生态环境研究室, 浙江嘉兴 314016)

摘要 [目的] 探讨发酵床养猪模式下不同使用年限微生物群落的变化以及不同使用时间、不同深度的发酵床垫料中垫料组分的变化。[方法] 采用常规分析方法测定样品中的营养成分含量, 对不同年限样品中微生物分离提纯后, 结合 16S rRNA 分子生物学鉴定对其微生物群落进行分析。[结果] 随着发酵床使用时间的延长, 垫料中的总氮、总磷、钾、钙、粗灰分和粗蛋白含量均显著增加, 而水分含量降低不明显; 使用 1 年和 2 年的垫料从上层到下层总氮、总磷、总钾和钙的浓度逐渐降低, 不同使用时间、不同深度发酵床垫料中粪尿组水分、总氮、总磷、钾、钙、粗灰分、粗蛋白均高于其他组。随着使用年限的增加, 猪生物发酵床垫料中微生物群落的多样性有降低的趋势。芽孢杆菌属细菌和梭菌属细菌在 1 年期样品和 2 年期样品中都是优势菌, 对猪生物发酵床垫料中有机质的降解发挥着重要的作用。[结论] 该研究可为垫料的资源化合理利用提供理论依据。

关键词 发酵床; 微生物; 多样性; 成分

中图分类号 S188+.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)08-098-02

Study on the Nutritional Components and Microbial Community in the Beddings of Pig Raising by Bio-fermentation Bed

ZHAO Guo-hua¹, FANG Ya-heng¹, CHEN Gui^{2*} (1. College of Biological and Chemical Engineering, Jiaxing University, Jiaxing, Zhejiang 314001; 2. Laboratory for Agricultural Ecological Environment in Jiaxing Academy of Agricultural Sciences, Jiaxing, Zhejiang 314016)

Abstract [Objective] The research aimed to discuss the changes of microbial community with different years under the swine raising model of fermentation bed and the components in the beddings of fermentation bed with different depth in different years. [Method] The contents of nutritional components in the samples were determined by using conventional analysis method. The microbe were isolated and purified from samples with different years. Based on 16S rRNA molecular biological identification, the microbial community was analyzed. [Result] With the prolonging the using years of fermentation bed, the contents of total nitrogen, total phosphorus, K, Ca, crude ash and crude protein in the beddings were significantly increased, but the water content had no obvious decrease. The concentrations of total nitrogen, total phosphorus, total K and Ca in the bedding with one using years and two using years were gradually decreased from the upper layer to the lower layer. The contents of water, total nitrogen, total phosphorus, K, Ca, crude ash and crude protein in the beddings with different depth and different using years in the group of feces and urine were higher than that in other groups. With the increasing the using years, the diversity of microbial community in the beddings of swine micro-fermentation bed had the trend of decreasing. Bacillus bacteria and Clostridium bacteria were dominant bacteria in the first and second year of samples, which played an important role in degrading organic matter in micro-fermentation beddings. [Conclusion] The research could provide theoretical basis for the rational utilization of beddings resources.

Key words Bio-fermentation bed; Microbial community; Diversity; Nutritional components

规模化的养殖推动了我国农业经济的发展, 但是随之而来的环境污染问题也越来越引起人们的重视。发酵床养殖作为新型养殖技术, 自从引入我国后被大力地推广和使用, 为解决畜牧环境污染问题带来了新途径。发酵床养猪技术是基于控制畜禽粪便排放与污染的一种新型环保型养殖技术, 将锯末、稻壳、秸秆等材料接种土著微生物菌种, 堆积发酵后用作垫料, 在经过改造的猪舍内加入上述有机垫料制成发酵床。在发酵床上养猪, 粪尿会被垫料吸附, 微生物降解其中的有毒有害物质, 同时利用产生的生物热杀灭粪便中的肠道寄生虫卵, 从而达到降低养殖舍内有有害气体浓度、减少养殖污染排放以及提高猪的生长性能的目的^[1-3]。发酵床养殖技术的核心是垫料中微生物群落的活动。笔者通过监测嘉兴某发酵床养猪场生长肥育猪舍使用 1 年 2 年的不同深度发酵床垫料中营养物质成分(水、粗蛋白、粗灰分、钙)的变化以及氮、磷、钾含量的变化, 探索垫料中这些元素的累积情况及动态变化规律, 并通过猪生物发酵床样品进行基因组 DNA 提取、16S rRNA 扩增、测序分析等, 了解猪生物发酵床微生物的动态变化规律, 以期垫料的资源化合理利用提

供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 发酵床样品均来自由金湾牧业有限公司提供。第 1 年和第 2 年的发酵床, 采用对角线采样法分别采集 5 个点的样品(其中包含粪尿区)^[3], 每个点分别从上至下用刀取 0~15 cm(上层)、30~40 cm(中层)和 60~70 cm(下层)的垫料样品, 同一深度各 2.0 kg 样品混合, 然后再采用四分法取 500 g, 备用。粪尿点各层单独取样各 2.0 kg, 单独混匀。混合方法: 将取得的每层垫料样品混在一起, 用四分法选取 500 g, 置于自封袋中密封, 防止水分挥发, 置于有冰袋的保温盒中, 贴上标签迅速带回实验室备用。

1.2 垫料的测定指标及方法 水分含量测定: 采集回的垫料用四分法选取 500 g, 先将垫料置于 65 °C 烘箱烘至恒温, 用饲料粉碎机粉碎后通过 40 目筛, 混匀样品, 装入广口瓶中贴上标签保存, 待进行其他各项指标测定。垫料中水分、粗蛋白和粗灰分含量的测定方法参考《土壤农业化学分析方法》^[4]。全氮和全磷含量分别采用半微量凯氏定氮法和钼黄显色光度法测定; 全钾含量采用原子吸收分光光度法测定。

1.3 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、氯化钠 50.0 g、琼脂 20 g, 蒸馏水溶解定容至 1 L, 调节 pH 至 7.6, 于 121 °C 下高压灭菌 30 min。

1.4 微生物的分离、纯化及保存 试验中分别用牛肉膏蛋

基金项目 嘉兴市科技计划项目(2011AY1043)。

作者简介 赵国华(1980-), 女, 山西运城人, 讲师, 博士, 从事固体废物处理与资源化研究。* 通讯作者, 助理研究员, 博士, 从事农业生态方面的研究。

收稿日期 2015-01-22

白陈培养基、高氏一号培养基从稀释的猪生物发酵床样品中选择性地分离细菌和放线菌,以供细菌 16S rDNA 分子生物学鉴定。

1.5 细菌 16SrDNA 片段的扩增 以细菌通用引物 27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',1492R:5'-TACGGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3'为引物,猪生物发酵床分离培养的细菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系(50 μ l):25 μ l 2 \times MightyAmp Buffer Ver. 2(含 Mg^{2+} 、dNTP plus),正反向引物各 15 pmol,基因组 DNA(直接挑菌作为基因组 DNA 模板),MightyAmp DNA Polymerase 1 μ l。

PCR 反应程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,30 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 反应结束后,取 PCR 产物 5 μ l 和 2 μ l 上样缓冲液混匀后点样于浓度 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,于 90 V 电压下电泳 30 min。电泳结束后,立即在琼脂糖凝胶成像系统下观察,拍照并存盘。

1.6 细菌 RFLP 酶切分型分析 克隆后,对阳性克隆子进行 PCR 扩增,然后使用限制性内切酶对扩增产物酶切,酶切 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳,所得 DNA 带型图谱通过凝胶分析软件进行比对,然后选取不同的操作单元,并将对应的阳性克隆子送交测序公司测序。

1.7 Blast 比对 将测序结果在核酸数据库(GenBank)中进行 Blast。

2 结果与分析

2.1 不同深度发酵垫料中水分、粗蛋白和粗灰分含量的变化 由表 1 可知,2 年间不同深度发酵床垫料中,粪尿组水分含量均显著高于其他组。使用第 1 年和第 2 年的发酵床垫料水分含量变化差异不显著,这可能与发酵床垫料管理得好及定期深翻垫料有关。随着垫料深度的增加,水分含量逐渐

降低。垫料中的粗灰分主要来源于垫料组分及猪不断排泄的粪污。该试验结果表明,随着垫料深度的增加,垫料粗灰分含量逐渐下降,这主要是由于猪的粪尿主要集中在表层的缘故。对比第 1 年和第 2 年的数据发现,垫料中粗灰分的浓度逐渐升高,表明粗灰分有累积作用。粪尿组各层显著高于其他组。随着垫料深度的增加,垫料中粗蛋白的浓度逐渐降低,这是由于粪尿中含有一定量的含氮化合物,因而垫料表层粗蛋白含量最高。随着垫料使用时间的延长,垫料中粗蛋白的浓度逐渐升高,表明粗蛋白具有累积作用。粪尿组显著高于其他组。

表 1 不同使用时间、不同深度发酵床垫料中水分、粗蛋白、粗灰分含量的变化 %

样品来源	第 1 年			第 2 年		
	水分	粗灰分	粗蛋白	水分	粗灰分	粗蛋白
粪尿上	65.54	26.50	1.65	57.86	34.06	1.70
粪尿中	54.65	24.95	0.91	52.18	32.05	1.03
粪尿下	49.63	22.75	0.68	47.37	24.53	0.69
其他上	50.34	21.59	0.99	49.01	30.05	1.11
其他中	45.87	18.94	0.75	44.47	27.09	0.84
其他下	43.15	18.04	0.63	42.97	23.86	0.65

2.2 2 年间不同深度发酵床垫料中总氮、总磷、总钾和钙含量 发酵床垫料中的总氮、总磷、总钾和钙含量主要来源于 2 个方面:一方面是垫料中的锯末、秸秆和稻壳,另一方面是猪粪污。饲料中的营养成分被猪消化吸收后,排泄物主要是以粪污的形式不间断排泄。由表 2 可知,垫料中总氮、总磷、总钾和钙的浓度随垫料使用时间的延长逐渐升高。随着垫料深度的增加,垫料中总氮、总磷、总钾和钙的浓度逐渐降低。粪尿组上、中、下层总氮、总磷、总钾、钙的浓度均明显高于其他组上、中、下层。这表明猪的习性是群居,这不利于充分利用发酵床的功能特性。该试验结果与其他研究结果一致^[5-7]。

表 2 不同使用时间、不同深度发酵床垫料中氮、磷、钾和钙含量的变化 %

样品来源	第 1 年				第 2 年			
	总氮	总磷	总钾	总钙	总氮	总磷	总钾	总钙
粪尿上	1.59	0.56	1.87	2.28	1.72	0.68	5.01	4.36
粪尿中	0.91	0.31	1.56	1.86	0.96	0.45	4.21	3.76
粪尿下	0.66	0.22	1.34	0.65	0.83	0.38	3.69	3.34
其他上	0.99	0.36	1.49	1.76	1.15	0.43	3.56	3.12
其他中	0.72	0.22	1.46	1.56	0.86	0.31	3.27	2.98
其他下	0.62	0.18	1.33	1.41	0.71	0.28	3.03	2.65

2.3 微生物总基因组 DNA 将所采集到的样品经过前处理后,提取微生物总基因组 DNA 并进行纯化,再进行琼脂糖凝胶电泳检测。从图 1 可以看出,微生物总基因组 DNA 完整、无拖尾和杂带,能满足后续试验要求。

2.4 保育期不同年限样品的 16SrDNA 序列比对结果 将保育 1 年、保育 2 年的样品分别与 GeneBank 进行 Blastn 序列比对,发现保育期 1 年的样品微生物(相似度达 99%)主要有:芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)、产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)、破伤风杆菌属(*Clostridium* sp.)、藤黄单胞菌属(*Luteimonas*

sp.)、外硫红螺菌属(*Ectothiorhodospria* sp.)、海杆菌属(*Marinobacter* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和索氏菌属(*Thauera* sp.)等。保育期 2 年的样品中微生物(相似度达 99%)主要有:芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)、破伤风杆菌属(*Clostridium* sp.)、Uncultured bacterium,细杆菌属(*Microbacterium* sp.)、节细菌属(*Arthrobacter* sp.)、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)、芽胞八叠球菌属(*Sporosarcina* sp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)等。生物发酵床保育 1 年样品中与芽胞杆菌

料口服磺胺脒,每天2次,连用7 d。

采用上述预防和治疗措施后,病猪食欲增加,体温恢复正常,病情得到控制。

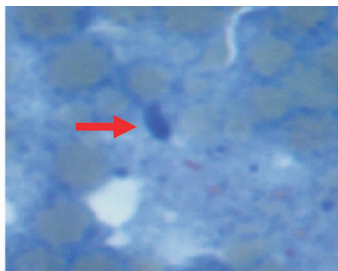
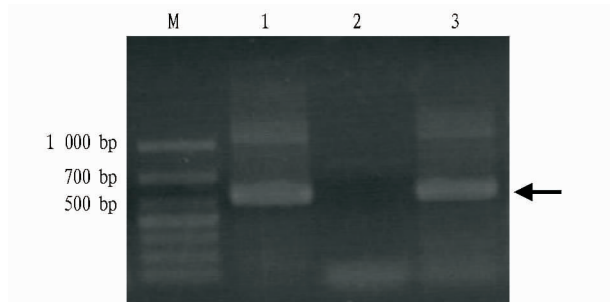


图2 病猪内脏的镜检结果(1 000 ×)



注:M. DNA Marker;1. 样本;2. 空白对照;3. 阳性对照。

图3 淋巴结 DNA 的 PCR 扩增结果

5 小结

弓形虫病是由弓形虫引起的一种人畜共患传染病,对猪危害严重,常呈急性感染^[4]。猫科动物是弓形虫的终末宿主,感染弓形虫的病猫能通过粪便排出卵囊,污染饲料和环境等^[5]。因此,要严禁猫只进入猪场。

发生弓形虫病时,应及时检出患病猪和隐性感染猪,并进行隔离治疗,对治疗效果不明显的猪,应及时淘汰。对同群猪应采取药物预防。对猪弓形虫病治疗首选药物为磺胺类药物,为增强疗效可与增效剂联合应用,并应注意用药及时。使用磺胺嘧啶时可以配合等量的碳酸氢钠来碱化尿液,增加磺胺嘧啶及其乙酰化物在尿中的溶解度,防止长期服用磺胺嘧啶可能造成的结石。

参考文献

- [1] DENKERS E Y, GAZZINELLI R T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection [J]. Clin Microbiol Rev. 1998, 11:569-588.
- [2] 张西臣,李建华. 动物寄生虫病学[M]. 北京市:中国农业大学出版社. 2013:356.
- [3] HOMAN W L, VERCAMMEN M, BRAEKELEER J, et al. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnosis and quantities PCR[J]. Int J Parasitol, 2000, 30: 69-75.
- [4] ZOU F, SUN X, LI B, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in southwestern china[J]. Parasitol Int, 2009, 58:306-307.
- [5] 陈淑芳. 猪弓形虫病的诊治报告[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(11): 105-106.

(上接第99页)

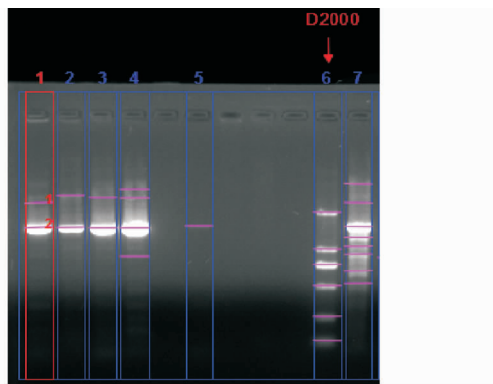


图1 微生物总基因组 DNA 的提取结果

属(*Bacillus* sp.)相关的克隆子数有36个,占有所有克隆子数的28.57%;与破伤风杆菌属(*Clostridium* sp.)相关的克隆子有32,占有所有克隆子的35.40%,因此样品中芽孢杆菌属和破伤风杆菌属占优势。生物发酵床保育2年期样品中克隆子较多的序列归属于芽孢杆菌属和破伤风杆菌属有克隆子27个和23个,分别占21.60%和18.40%,在样品中占有优势,为优势菌。

芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)在生物发酵床保育期样品中发挥着重要的作用,与其他研究结果相一致^[8-9]。另外,有几个序列与已知的细菌序列没有任何的相似性,它们在生物发酵床中的作用还需要进一步研究。

3 小结

(1)不同使用时间、不同深度发酵床垫料中,粪尿组水

分、粗灰分、粗蛋白、总氮、总磷、总钾和钙含量均显著高于其他组。

(2)从猪生物发酵床样品中分离到的16SrDNA序列可以看出,随着发酵床使用年限的增加,发酵床内的微生物群落也在不断地更替演变,保育2年时微生物群落的减少,说明随着使用年限的增加,猪生物发酵床垫料内的微生物群落的多样性有降低的趋势。在保育期样品中,芽孢杆菌属和梭菌属始终是独立的分支,对发酵床物质代谢和能量代谢发挥着巨大的作用。

参考文献

- [1] 毕小艳,张彬. 发酵床生态养殖模式在养猪生产中的应用研究进展[J]. 中国动物保健, 2010(9): 50-51.
- [2] 郭彤,郭秀山,马建民. 发酵床饲养模式对断奶仔猪生长性能、腹泻、肠道菌群及舍畜环境的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2012(20): 56-60.
- [3] 郭彤,马建民,赵曾元,等. 不同使用时间和深度的发酵床垫料成分及重金属沉积规律的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(10): 51-55.
- [4] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1999.
- [5] 盛清凯,武英,赵红波,等. 发酵床养殖垫料组分的变化规律[J]. 西南农业学报, 2010, 23(5): 1703-1705.
- [6] 赵兴征,刘宝庆,葛成冉,等. 生物发酵床养猪垫料中营养成分及重金属含量的测定[J]. 贵州农业科学, 2013(11): 129-131.
- [7] 应三成,吕学斌,何志平,等. 不同使用时间和类型生猪发酵床垫料成份比较研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 120-123.
- [8] 朱双红. 猪生物发酵床垫料中细菌群落结构动态变化研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2012.
- [9] 张学峰,周贤文,陈群,等. 不同深度垫料对养猪土著微生物发酵床定期微生物菌群的影响[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(9): 1458-1462.