

## 肉鸭养殖过程中发酵床垫料菌群结构变化的研究

章小婷 郑卫江 林勇 袁婧 姚文\*

(南京农业大学 消化道微生物研究室 江苏 南京 210095)

**摘要:**【目的】探究发酵床使用时间和肉鸭粪便微生物对发酵床垫料菌群结构、总菌和大肠杆菌数量的影响。【方法】采集江苏某肉鸭发酵床养殖场内刚制作完成的发酵床垫料样品,及其饲养4批次、8批次后的垫料样品,同时采集各批次34日龄肉鸭粪便样品,采用变性梯度凝胶电泳技术(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、16S rRNA基因序列分析和实时荧光定量PCR(Quantitative real-time PCR)技术对发酵床使用过程中垫料菌群结构进行定性和定量研究。

【结果】0批次(D0)与4批次(D4)、8批次(D8)垫料菌群相似性分别为68.81%、70.82%,而4批次与8批次间垫料菌群的相似性则达81.93%,显著高于D4、D8与D0间相似性( $P<0.05$ )。条带6、8(最相似菌分别为*Legionella tunisiensis*、*Pedobacte bauzanensis*)在3个时间点垫料菌群中均表现优势,且含量较为稳定;条带10(最相似菌为*Rummeliibacillus suwonensis*)仅在2个重复使用垫料菌群中表现优势;条带12、13(最相似菌分别是*Psychrobacter sp. PRwf-1*、*Iamia majanohamensis*)共同存在于垫料样和粪便样。肉鸭粪便中大肠杆菌的数量显著高于4批次、8批次垫料中的数量( $P<0.05$ ),与0批次垫料间差异不显著( $P>0.05$ )。【结论】使用时间和肉鸭粪便微生物共同影响了发酵床垫料菌群结构和数量,菌群结构随使用时间的延长而趋于稳定。

**关键词:** 发酵床, 肉鸭, 细菌种群, 变性梯度凝胶电泳技术, 实时荧光定量PCR

## Succession of bacterial community in duck bio-bed over time

ZHANG Xiao-Ting ZHENG Wei-Jiang LIN Yong YUAN Jing YAO Wen\*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to character the succession of bacterial community in the litter during the fermentation of duck bio-bed. [Methods] The experiment was conducted in one meat duck bio-bed farm of Jiangsu province. The new litter (D0), used litter from 4<sup>th</sup> (D4), 8<sup>th</sup> (D8) meat duck flock and feces from duck at 34 d age were sampled. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), 16S rRNA gene sequencing and quantitative real-time PCR were used to monitor the composition changes of microbiota in the bio-bed. [Results] DGGE profiles showed that, the similarity between D4 and D8 was 81.93%, which was significantly higher than the similarity between D4, D8 and D0 (68.81% and 70.82%, respectively) ( $P<0.05$ ). Bands 6 and 8 (the closest relatives: *Legionella tunisiensis* and *Pedobacter bauzanensis*, respectively) were dominant in all litter samples. Band 10 (the closest relative: *Rummeliibacillus suwonensis*) was only dominant in used litters. Bands 12 and 13 (the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31372321); 国家973计划项目(No. 2013CB127201)

\*通讯作者: Tel: 86-25-84399830; 信箱: yaowen67jp@njau.edu.cn

收稿日期: 2014-10-13; 接受日期: 2014-11-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-28

closest relatives: *Psychrobacter* sp. PRwf-1, *Iamia majanohamensis*, respectively) commonly presented in all litters and feces. Real-time PCR results showed that the number of *Escherichia coli* in duck feces was significantly higher than that in D4 and D8 litters ( $P < 0.05$ ), while no significant difference was observed between duck feces and D0 litter ( $P > 0.05$ ). **[Conclusion]** Both the application time of bio-bed and duck feces origin microorganisms can affect the bacterial community and the number of *E. coli* in the bio-bed, and the bacterial community structure tends to be stable in line with the application time of the bio-bed.

**Keywords:** Bio-bed, Meat duck, Bacterial community, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Quantitative real-time PCR

畜禽产业急速发展带来的粪尿污染问题已引起全社会的关注。美国每出栏 1 000 羽商品肉鸡产生 1.45 t 的废弃物<sup>[1]</sup>, 仅肉鸡养殖一项每年排污就大于  $1 \times 10^7$  t<sup>[2]</sup>。发酵床养殖模式通过垫料中微生物的生长降解动物排泄物中的有机物, 可有效控制规模化养殖业带来的严重环境污染问题<sup>[3-5]</sup>, 同时发酵床垫料中优势菌种类和数量在发酵床使用过程中也随之发生改变, 有报道发现, 猪发酵床垫料中芽孢杆菌、乳酸杆菌等有益菌比例随使用时间延长而增加<sup>[6]</sup>, 鸡发酵床垫料中大肠杆菌、沙门菌等有害菌数量随使用时间延长则呈现下降趋势<sup>[7]</sup>。

我国的养鸭总量已达到世界的 75%, 江苏是传统鸭生产与消费大省, 如何有效控制养鸭业对环境的影响意义显著。因此, 肉鸭发酵床早养模式近年来在江苏得到了大面积的推广。但是, 肉鸭发酵床使用时间、粪便微生物等对垫料菌群结构的影响目前未见报道。因此, 本试验通过变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR)、优势条带 16S rRNA 基因序列分析等技术, 对发酵床使用过程中垫料菌群的变化进行定性和定量分析, 为发酵床在肉鸭生产中的合理管理和使用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计及样品采集

试验于 2011 年 11 月至 2013 年 7 月在江苏某肉鸭发酵床养殖场进行, 共饲养 8 批次樱桃谷肉鸭。每栋鸭舍发酵床垫料均采用相同原料、比例、同批次制作而成, 主要含木屑、稻壳、少量麸皮, 厚约 40 cm, 并于初次使用时接种芽孢杆菌与放线菌等

菌剂。每栋鸭舍饲养肉鸭 1 200–1 800 羽, 饲养密度为 2.4–3.6 羽/m<sup>2</sup>。肉鸭饲料均购自徐州世纪星饲料有限公司, 试验过程中肉鸭自由采食和饮水。发酵床垫料在使用过程中存在消耗, 一旦发酵床垫料消耗接近 40%, 则必须及时添加新鲜垫料与发酵床启动菌剂, 以维系发酵床的有效发酵。本研究为避免新添加垫料及菌剂对研究结果的影响, 选取垫料消耗未超过 40% 的时期进行采样, 设置了 0 (D0)、4 (D4)、8 (D8) 三个饲养批次为采样时间点。每个采样时间点选择 3 栋鸭舍, 每栋鸭舍按“Z”字形 5 点采集垫料样品, 同一鸭舍的 5 个垫料样品等量混匀作为一个样本。分别于 D4、D8 时间点的每栋鸭舍各采集 10 羽 34 日龄肉鸭的粪便分别装于 2 mL 灭菌冻存管中, 提取总菌 DNA 时, 将同一鸭舍来源的 10 羽肉鸭的粪便等量混匀后作为一个样本。

### 1.2 主要试剂(盒)及仪器

DNA 提取试剂盒, Mo Bio 公司; 琼脂糖凝胶纯化试剂盒, 天根生物有限公司; PMD19-T 载体、SYBR Premix ExTaq、Premix ExTaq, TaKaRa 公司; 氨苄青霉素, 上海生工生物工程公司; 常规 PCR 仪, Biometra 公司; D-code DGGE 系统、GS-800 型扫描仪, Bio-Rad 公司。

### 1.3 肉鸭发酵床垫料菌群和粪便菌群的 DGGE 分析

**1.3.1 总细菌 DNA 提取及 PCR 扩增:** 采用 DNA 提取试剂盒提取发酵床垫料和肉鸭粪便样品的总 DNA。采用细菌通用引物 U968-GC 及 L1401 (表 1) 对细菌 16S rRNA 基因的 V6–V8 可变区进行 PCR 扩增<sup>[8]</sup>。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): Premix ExTaq 10  $\mu$ L,

上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, DNA 模板(约为 10 mg/L) 0.5 μL, 剩余体积用无菌水补足。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 20 s, 68 °C 40 s, 35 个循环; 68 °C 7 min。

**1.3.2 DGGE 及图谱分析:** 参照 Muyzer 等<sup>[9]</sup>方法对 PCR 产物进行 DGGE 分析, 聚丙烯酰胺凝胶浓度 8%, 凝胶变性梯度为 38%–53%, 电压 85 V, 电泳温度 60 °C, 电泳时间 12 h。电泳结束后对凝胶进行硝酸银染色<sup>[10]</sup>, 经 GS-800 型扫描仪扫描后, 用 GelCompar II 进行分析。采用多样性指数(Shannon-wiener's 指数)又称香浓指数( $H'$ )、丰度( $S$ )、均匀度( $E_H$ )等指标比较各样品的细菌多样性。其计算方法如下:  $H' = -\sum P_i \ln P_i$ , 式中  $P_i$  为某个样品中单一条带的强度在该样品的所有条带总强度中所占比率; 丰度( $S$ )是某个样品中所含条带数目总和; 均匀度( $E_H$ )= $H'/\ln S$ , 式中  $H'$  为多样性指数,  $S$  为丰度。

#### 1.4 细菌 16S rRNA 基因全序列分析

采用细菌通用引物 8F 和 1510R (表 1)扩增 16S

rRNA 基因全序列, PCR 产物经琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化后, 插入 PMD19-T 载体并转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。培养 14–16 h, 挑选白色克隆以引物 M13F 和 M13R (表 1)检测插入子的大小。扩增插入子正确克隆的 16S rRNA 基因的 V6–V8 区域, 并与原样品在 DGGE 凝胶上进行比对, 寻找匹配的条带, 将与原样品匹配的克隆送至深圳华大基因有限公司测序, 序列同源性通过互联网与 GenBank 进行比较。

5 个细菌 16S rRNA 基因序列在 GenBank 登录号分别: KM488499、KM488200、KM488201、KM521548 和 KM588083。

#### 1.5 总菌和大肠杆菌定量分析

采用 FP2 和 RP2 (表 1)扩增大肠杆菌 ATCC25922<sup>[11]</sup>, 制作大肠杆菌标准品。引物 1369F、1492R<sup>[12]</sup>用于测定样品中总菌的 16S rRNA 基因拷贝数, 标准曲线为  $y = -3.273x + 40.057$ ,  $R^2 = 0.996$ 。引物 FP1、RP1<sup>[11]</sup>用于测定样品中的大肠杆菌

表 1 本研究所用的引物序列  
Table 1 List of primers used in this study

用途 Assay	引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	参考文献 Reference
总菌 Total bacteria	U968-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCCTTAC	Nubel 等 <sup>[8]</sup>
	L1401	CGGTGTGTACAAGACCC	
	Bact1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	Suzuki 等 <sup>[12]</sup>
	Prok1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT	
	8F	CACGGATCCAGAGTTTGA(C/T)(A/C)TGGCTCAG	Lane <sup>[13]</sup>
1510R	GTGAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT		
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	FP2	GAGCGCAACCCTTATCCTTTG	葛忠源 <sup>[11]</sup>
	RP2	TACTAGCGATTCCGACTTCATGG	
	FP1	AATGGCGCATACAAAGAGAAGC	张琳等 <sup>[14]</sup>
	RP1	GTTGCAGACTCCAATCCGGA	
	M13F	TGTAACACGACGGCCAGT	
	M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	

16S rRNA 基因拷贝数, 标准曲线为  $y = -3.282x + 35.824$ ,  $R^2 = 0.998$ 。Real-time PCR 反应采用 20  $\mu\text{L}$  体系: SYBR Premix ExTaq 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )及 Rox 各 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA 模板(约为 10 mg/L) 2.0  $\mu\text{L}$ , 其余体积用无菌水补足。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。每个样品检测采用 3 个重复, 取平均值。

## 1.6 数据分析

试验数据使用 Excel 2010 初步整理后, 使用 SPSS 18.0 软件中 ANOVA 模型对所有指标进行显著性分析, 结果以均值 $\pm$ 标准误表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 垫料使用时间和肉鸭粪便菌群对垫料菌群组成的影响

如图 1 所示, 使用不同时间发酵床垫料菌群及肉鸭粪便细菌菌群 DGGE 图谱及相似性分析, D 代表垫料样品, F 代表肉鸭粪便样品。如图 1A 所示,

随发酵床使用时间的延长, 垫料中优势菌发生一定的改变, 其中条带 1、4、9、10 为重复使用垫料(D4、D8)的优势菌, 而在新鲜垫料(D0)和粪便中并未观察到; 条带 5 随发酵床使用时间的延长而逐渐减少; 条带 6、8 共同存在于各时期垫料样品中; 条带 7 仅在 D0 中存在。同时肉鸭粪便微生物也可能影响垫料微生物的组成及结构, 条带 2、3、12、13 在重复使用垫料及粪便中均存在, 在新鲜垫料中未发现。

发酵床使用过程中各批次间 DGGE 图谱相似性结果(图 1B)显示, 饲养 4 批次肉鸭和 8 批次肉鸭的发酵床垫料菌群 DGGE 图谱与 0 批次垫料菌群图谱间的相似性分别为 68.81%、70.82%, 4 批次与 8 批次垫料菌群 DGGE 图谱间的相似性为 81.93%, 显著高于其与 0 批次垫料菌群图谱间的相似性 ( $P < 0.05$ )。发酵床使用 0、4、8 批次的垫料菌群与肉鸭粪便菌群相似性分析为 65.28%、66.08%、66.46%, 各批次间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

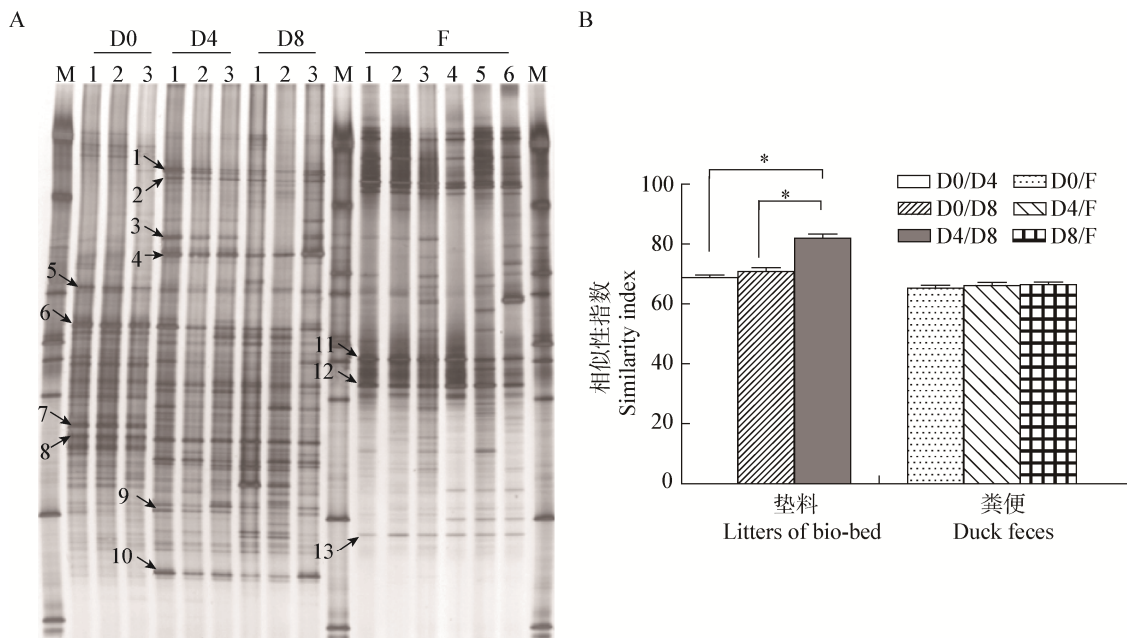


图 1 发酵床使用过程中垫料、肉鸭粪便总菌 DGGE 图谱(A)和 DGGE 图谱相似性分析(B)

Figure 1 DGGE profiles (A) and their dice similarity index (B) of the litters of duck bio-bed and duck feces

注: D0: 未饲养肉鸭的新鲜垫料; D4: 使用 4 批次的垫料; D8: 使用 8 批次的垫料; F: 肉鸭粪便样品。\*: 差异显著,  $P < 0.05$ 。

Note: D0: New litter; D4: Used litter from 4<sup>th</sup> meat duck batch; D8: Used litter from 8<sup>th</sup> meat duck batch; F: Meat duck feces. \*:  $P < 0.05$ .

为了了解发酵床在使用过程中优势菌变化情况, 本研究通过对垫料和肉鸭粪便 DGGE 图谱中优势条带的克隆和再次 DGGE 电泳对比, 共获得 5 个特异性优势条带克隆(图 1A), 并送至深圳华大基因有限公司测序, 结果见表 2。在所有垫料 DGGE 图谱中均存在的条带 6、8 的最相似菌分别为变形菌门军团菌属的 *Legionella tunisiensis* (97%)和拟杆菌门 *Pedobacter* 属的 *Pedobacter bauzanensis* (96%); 条带 10 的最相似菌为厚壁菌门 *Rummeliibacillus* 属的 *Rummeliibacillus suwonesis* (93%), 仅出现在饲养 4 和 8 批次肉鸭的垫料菌群中; 条带 12 和 13 的最相似菌为 *Psychrobacter* sp. PRwf-1 (99%)和 *Iamia majanohamensis* (87%), 分别为变形菌门冷杆菌属和放线菌门酸微菌属, 是粪便菌群和垫料菌群的共有菌。

## 2.2 垫料使用时间和肉鸭粪便菌群对垫料菌群多样性指数、丰度和均匀度的影响

发酵床垫料和肉鸭粪便细菌结构变化采用多

样性指数( $H'$ )、丰度( $S$ )和均匀度( $E_H$ )进行综合分析, 结果如表 3 所示, 各批次垫料样品和粪便多样性指数较稳定, 均值为 3.34–3.59, 各批次差异未达显著水平( $P>0.05$ ); D0、D4、D8、F 的条带数均值分别为 30.67、39.67、42.00、32.67, D8 组显著高于 D0、F ( $P<0.05$ ), 其余各组间差异不显著( $P>0.05$ ), 说明随垫料使用时间延长和鸭源微生物的介入, 对垫料微生物丰富度有一定的影响; 垫料和粪便的均匀度( $E_H$ )为 0.95–0.98, 垫料和粪便间均未达差异显著水平( $P>0.05$ )。

## 2.3 垫料使用时间和肉鸭粪便菌群对垫料中总细菌和大肠杆菌数量的影响

图 2 为发酵床使用过程中垫料和肉鸭粪便总菌、大肠杆菌的定量结果, 结果显示垫料细菌数量受使用时间和鸭源肠道细菌的共同影响。重复使用垫料(D4、D8 组)与新鲜垫料(D0 组)相比, 总菌数量有所增加, 在发酵床使用过程中数量逐渐减少, 但差异未达显著水平( $P>0.05$ ); 粪便中总菌数量高

表 2 垫料和肉鸭粪便菌群 DGGE 图谱中优势条带的 16S rRNA 基因全序列鉴定

Table 2 Identification of dominant bands in DGGE profiles of the litters of duck bio-bed and duck feces

条带编号 No.	最相似菌 Closest known species found in the GenBank database	登录号 Sequence accession numbers	片段长度 Length (bp)	相似性 Similarity (%)
6	<i>Legionella tunisiensis</i>	KM488200	1 527	97
8	<i>Pedobacter bauzanensis</i>	KM488199	1 511	96
10	<i>Rummeliibacillus suwonesis</i>	KM521548	1 508	93
12	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	KM588083	1 516	99
13	<i>Iamia majanohamensis</i>	KM488201	1 509	87

表 3 发酵床使用过程中垫料、粪便样品 DGGE 条带多样性指数、丰度及均匀度分析

Table 3 Diversity indices, abundance and evenness analysis of the litters of duck bio-bed and duck feces

样品 Sample	香农指数 Diversity indice ( $H'$ )	丰度 Abundance ( $S$ )	均匀度 Evenness ( $E_H$ )
D0	3.34±0.09	30.67±2.60 <sup>b</sup>	0.98±0.00
D4	3.50±0.03	39.67±2.03 <sup>ab</sup>	0.95±0.01
D8	3.59±0.04	42.00±1.53 <sup>a</sup>	0.96±0.00
F	3.34±0.05	32.67±1.41 <sup>b</sup>	0.96±0.01

注: D0: 未饲养肉鸭的新鲜垫料; D4: 使用 4 批次的垫料; D8: 使用 8 批次的垫料; F: 肉鸭粪便样品。同一指标同一肩标不同小写字母者表示差异显著,  $P<0.05$ 。

Note: D0: New litter; D4: Used litter from 4<sup>th</sup> meat duck batch; D8: Used litter from 8<sup>th</sup> meat duck batch; F: Meat duck feces. Different letters in the same row indicated statistical significance.

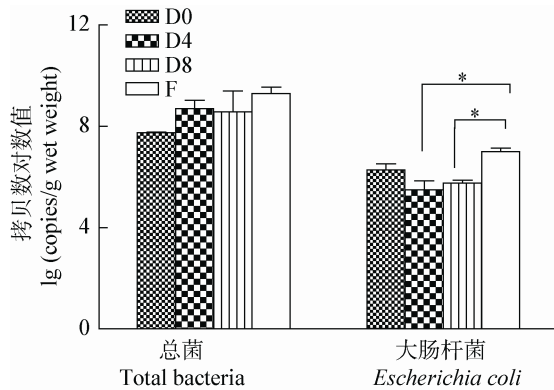


图2 发酵床使用过程中垫料和粪便总菌、大肠杆菌菌群对数值

Figure 2 Quantitative real-time PCR analysis of total bacteria, *Escherichia coli* of the litters of duck bio-bed and duck feces

注: D0: 未饲养肉鸭的新鲜垫料; D4: 使用 4 批次的垫料; D8: 使用 8 批次的垫料; F: 肉鸭粪便样品。\*: 差异显著,  $P < 0.05$ 。  
Note: D0: New litter; D4: Used litter from 4<sup>th</sup> meat duck batch; D8: Used litter from 8<sup>th</sup> meat duck batch; F: Meat duck feces; \*:  $P < 0.05$ .

于各时期垫料样品中的数量, 差异不显著( $P > 0.05$ )。发酵床使用过程会减少垫料中大肠杆菌数量, 新鲜垫料大肠杆菌数量高于 4 批次、8 批次垫料中的数量, 差异未达显著水平( $P > 0.05$ ); 粪便中大肠杆菌数量显著高于 4 批次、8 批次垫料样品( $P < 0.05$ ), 与 0 批次垫料相比差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

发酵床早养有助于控制肉鸭规模养殖带来的严重环境污染问题, 但饲料来源的药物、金属及粪便微生物等有可能随使用时间的延长而累积<sup>[15]</sup>, 废弃的垫料最终多以肥料还田的方式回归环境<sup>[16-17]</sup>, 因此了解垫料使用过程中菌群变化对于发酵床的管理与安全使用具有重要的指导意义。

本研究利用 DGGE 技术追踪了发酵床从刚建成至饲养 8 批次肉鸭过程中垫料菌群结构变化及其与肉鸭粪便细菌的相关性。肉鸭饲料均由徐州世纪星饲料有限公司提供, 试验过程中肉鸭自由采食和饮水。结果显示: 垫料菌群结构随使用时间的增加而发生一定改变, 使用 4 批次和 8 批次肉鸭发酵床

垫料间 DGGE 图谱相似性(D4/D8=81.93%)显著高于其与未饲养肉鸭垫料间的相似性(D4/D0=68.81%; D8/D0=70.82%)。与本研究结果类似, Cressman 等<sup>[1]</sup>分别对肉鸡新鲜垫料和使用 2 年以上垫料的 7、14、21、42 d 四个时间点的 DGGE 图谱进行了比较, 发现新鲜垫料组各时间点间相似性较低, 而重复使用垫料组各时间点间的相似性较高。说明随肉鸡排泄物的不断进入、垫料中养分的消耗和垫料中微生物的生长, 垫料微生物区系逐渐趋于一致。张洪瑜<sup>[7]</sup>对使用 1、2、3 年肉鸡发酵床垫料的 DGGE 图谱分析发现, 使用 1、2、3 年垫料的条带数分别为 39.9 条、32.1 条、21.3 条, 垫料中菌群丰富度随年份的增加而降低。而 Cressman 等<sup>[1]</sup>对肉鸡垫料的研究和我们对肉鸭垫料的研究均表明, 重复使用垫料较新鲜垫料含有更多条带。本研究结果显示 8 批次垫料的条带数(42.00 条)显著高于 0 批次垫料中的条带数(30.67 条), 随垫料使用时间的延长, DGGE 图谱条带数有所增加。不同研究的结果差异可能与发酵床的垫料组成、发酵床构建方式的差异有关, 本研究中的肉鸭发酵床垫料由木屑、稻壳和少量麸皮组成, 发酵床厚约 40 cm, 并于初次使用时接种芽孢杆菌与放线菌等菌剂。同时对肉鸭垫料 DGGE 图谱的多样性指数分析表明, 使用 8 批次以内垫料的菌群是相对稳定的, 没有出现某一类细菌数量的过度增加。

为了解发酵床在使用过程中优势菌变化情况, 本研究通过对垫料和肉鸭粪便 DGGE 图谱中优势条带的克隆和再次 DGGE 电泳对比, 共获得 5 个特异性优势条带克隆。条带 6、8 共同存在于各采样点垫料样品中, 并非肉鸭粪便的优势菌, 经 16S rRNA 基因序列分析可知: 条带 6 的最相似菌为 *Legionella tunisiensis* (97%), 属于变形菌门军团菌属, 条带 8 的最相似菌为 *Pedobacter bauzanensis* (96%), 属于拟杆菌门 *Pedobacter* 属。发酵床中主要含木屑、稻壳和少量麸皮, 使用过程中乳酸和排泄物的累积及持续发酵所致的床体内部较高温度

是菌株生长的制约因素<sup>[7]</sup>, 但军团菌属菌在自然界分布广泛且可生长温度为 25–43 °C<sup>[18]</sup>, *Pedobacter* 属细菌的氧化酶、碱性磷酸酶活性较强<sup>[19]</sup>, 这可能是上述两种菌在垫料使用过程中表现为优势, 且含量较为稳定的原因。条带 10 的最相似菌为 *Rummeliibacillus suwonensis* (93%) 属于厚壁菌门芽孢杆菌科 *Rummeliibacillus* 属, 仅在重复使用垫料 (D4、D8) 中表现为优势, 在新鲜垫料 (D0) 和粪便中并未观察到。这与厚壁菌门细菌对有机物分解力强, 在能量和物质代谢中发挥重要作用<sup>[6]</sup>, 且芽孢杆菌科细菌耐受高温的特性<sup>[20]</sup>密不可分。肉鸭粪便也是重复使用垫料的组成成分, 也可影响垫料微生物的组成和结构, 其中条带 2、3、12、13 在重复使用垫料及粪便中均存在, 在新鲜垫料中未发现。经测序可知, 条带 12 的最相似菌为 *Psychrobacter* sp. PRwf-1 (99%) 属于变形菌门冷杆菌属, 条带 13 的最相似菌为 *Iamia majanohamensis* (87%) 属于放线菌门微酸菌属, 其中冷杆菌属于假单胞菌科, 该科的细菌可利用多种碳化合物作为碳源<sup>[21]</sup>, 微酸菌属可参与氮元素转化<sup>[22]</sup>, 故这两种菌均可将发酵床垫料和鸭粪中的有机物分解为小分子, 并利用这些小分子物质生长繁殖, 成为优势菌。

大肠杆菌是动物肠道内正常菌群的一员, 健康动物体内其数量是受到控制的, 肠道内大肠杆菌数量的剧增对于动物的健康是不利的。发酵床使用过程中, 垫料中大肠杆菌的数量不仅会影响到饲养于其上的肉鸭的健康, 也有可能进入食物链影响人类的健康。本研究通过实时荧光定量 PCR 对 3 个时间点的垫料及肉鸭粪便中总菌和大肠杆菌进行了定量分析, 结果发现: 4 批次和 8 批次垫料总菌数量较新鲜垫料高, 随着垫料使用时间的延长, 营养物质的消耗, 细菌总量逐渐下降, 但差异不显著 ( $P>0.05$ ), 粪便中大肠杆菌数量显著高于 4 批次、8 批次垫料样品 ( $P<0.05$ )。张洪瑜<sup>[7]</sup>的研究也发现了相似的结果, 对使用 1、2、3 年的肉鸡发酵床垫料进行活菌计数发现, 大肠杆菌、沙门氏菌和霉菌数量随使用时间呈下降趋势。Chinivasagam 等<sup>[23]</sup>对新鲜和重复

使用的肉鸡垫料进行大肠杆菌活菌计数结果显示, 在新鲜垫料中大肠杆菌数量可达  $4.2\times 10^5$  CFU/g, 在重复使用垫料中则为  $9.7\times 10^4$  CFU/g。这一结果表明发酵床垫料在一定的使用时间内, 如本研究饲养 8 批次肉鸭, 其床体内形成的较稳定的菌群结构、及由此形成的床体内部的微环境如较高水平的乳酸和较高的温度, 能够抑制大肠杆菌的生长<sup>[1,7]</sup>, 从而降低因大肠杆菌引起的肉鸭健康风险。

## 4 结论

本研究结果表明, 肉鸭发酵床垫料微生物区系可受重复使用时间和肉鸭粪便微生物的影响, 一定使用周期内垫料中大肠杆菌的数量随使用时间的延长而降低, 有利于控制因大肠杆菌引起的肉鸭健康风险。

## 参考文献

- [1] Cressman MD, Yu Z, Nelson MC, et al. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6572-6582
- [2] USDA. USDA agriculture projections to 2018[N/OL]. USDA, Washington, DC. February 2009. <http://www.ers.usda.gov/Publications/OCE091.pdf>
- [3] Bubel F, Grela ER, Dobrzanski Z, et al. Effect of dietary mineral-plant preparations on the mineral blood profile of laying hens in a deep litter housing system[J]. Medycyna Weterynaryjna, 2013, 69(10): 616-621
- [4] Guardini R, Comin JJ, Schmitt DE, et al. Accumulation of phosphorus fractions in typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep pig litter in a no-tillage system[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2012, 93(2): 215-225
- [5] Lovanh N, Cook KL, Rothrock MJ, et al. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties[J]. Poultry Science, 2007, 86(9): 1840-1849
- [6] Zhu SH. The dynamic changes of bacterial community structure on micro-fermentation bed piggery litter[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
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: 华中农业大学硕士学位论文, 2012
- [7] Zhang HY. Study of the effects of chicken safety and litter hygiene by breeding chicken on deep-litter system[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese)  
张洪瑜. 发酵床养鸡对鸡肉安全性及垫料卫生影响的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2013
- [8] Nubel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of

- genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis[J]. Journal of bacteriology, 1996, 178(19): 5636-5643
- [9] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [10] Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914-921
- [11] Ge ZY. Detecting the number of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* of low DPV immune ducks' respiratory system and enteron by real-time fluorescence quantitative PCR[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2006 (in Chinese)  
葛忠源. 荧光定量PCR检测DPV弱毒免疫鸭消化道和呼吸道大肠杆菌、葡萄球菌、乳酸杆菌及其数量变化规律[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2006
- [12] Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4605-4614
- [13] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Good-fellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. Wiley: Chichester, 1991: 115-175
- [14] Zhang L, Deng R, Ma LL, et al. Cloning and function verification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) upstream sequence from wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(8): 973-982 (in Chinese)  
张琳, 邓荣, 马兰兰, 等. 小麦3-磷酸-甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)上游序列的克隆及功能验证[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(8): 973-982
- [15] Zhang X, Gu HR, Yang J, et al. Contents of total nitrogen, total phosphorus and heavy metal elements in padding of pig-on-litter system[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2011, 27(6): 1414-1415 (in Chinese)  
张霞, 顾洪如, 杨杰, 等. 猪发酵床垫料中氮、磷、重金属元素含量[J]. 江苏农业科学, 2011, 27(6): 1414-1415
- [16] Chen Z, Jiang XP. Microbiological safety of chicken litter or chicken litter-based organic fertilizers: a review[J]. Agriculture, 2014, 4(1): 1-29
- [17] Enticknap JJ, Nonogaki H, Place AR, et al. Microbial diversity associated with odor modification for production of fertilizers from chicken litter[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4105-4114
- [18] Lu CP. Veterinary Microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 278-279 (in Chinese)  
陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 278-279
- [19] Zhang DC, Schinner F, Margesin R. *Pedobacterbauzanensis* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(11): 2592-2595
- [20] Zhang QN, Hu M, Zhu RS, et al. Microbial properties and application of superior bacteria in deep-litter ecosystem for piggery[J]. Shandong Agricultural Science, 2009(4): 99-105 (in Chinese)  
张庆宁, 胡明, 朱荣生, 等. 生态养猪模式中发酵床优势细菌的微生物学性质及其应用研究[J]. 山东农业科学, 2009(4): 99-105
- [21] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 274 (in Chinese)  
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 274
- [22] Kurahashi M, Fukunaga Y, Sakiyama Y, et al. *Iamiamajano hamensis* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of *Iamiaceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 869-873
- [23] Chinivasagam HN, Redding M, Runge G, et al. Presence and incidence of foodborne pathogens in Australian chicken litter[J]. British Poultry Science, 2010, 51(3): 311-318