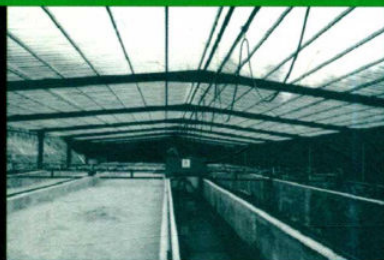
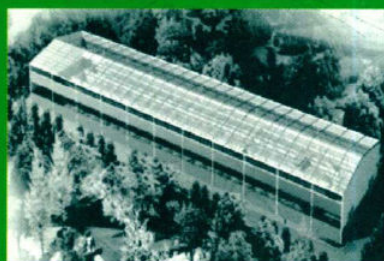


异位发酵床

微生物组多样性

Yiwei fajiaochuang weishengwuzu duoyangxing

刘波 陈倩倩 王阶平 张海峰 等著



化学工业出版社

异位发酵床 微生物组多样性

Yiwei fajiaochuang
weishengwuzu duoyangxing

刘波 陈倩倩 王阶平 张海峰 等著



化学工业出版社

·北京·

本书针对异位发酵床处理猪粪过程微生物组变化进行研究,全书共分5章,分别阐述了微生物发酵床概述、发酵床微生物宏基因组研究方法、异位发酵床微生物宏基因组分析、异位发酵床细菌微生物组多样性以及异位发酵床真菌微生物组多样性。另外,书后提供了真菌分类纲要和细菌分类纲要。

本书可供从事有机污染物微生物治理及其废弃物循环利用及相关领域的科研人员、企业技术人员和管理人员参考,也可供高等学校环境科学与工程、生态学及相关专业师生参阅。

图书在版编目(CIP)数据

异位发酵床微生物组多样性/刘波等著. —北京:化学工业出版社, 2018.9

ISBN 978-7-122-32573-0

I. ①异… II. ①刘… III. ①微生物-发酵-生物多样性 IV. ①TQ920.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第149115号

责任编辑:刘兴春 刘婧

文字编辑:汲永臻

责任校对:王素芹

装帧设计:刘丽华

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印装:中煤(北京)印务有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张25¼ 彩插2 字数648千字 2019年7月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888

售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:180.00元

版权所有 违者必究

《异位发酵床微生物组多样性》

著者名单

著者：(按姓氏拼音顺序排列)

车建美 陈德局 陈 华 陈梅春 陈倩倩 陈 峥
戴文霄 葛慈斌 黄勤楼 黄素芳 黄 瑜 蓝江林
李兆龙 林 斌 林营志 刘 波 潘志针 阮传清
史 怀 苏明星 唐建阳 王阶平 王隆柏 翁伯琦
夏江平 肖荣凤 叶鼎承 余文权 张海峰 郑回勇
郑雪芳 朱育菁

支持单位：

福建省农业科学院农业生物资源研究所
微生物菌剂开发与应用国家地方联合工程研究中心
东南区域农业微生物资源利用科学观测实验站
海西农业微生物菌剂国际科技合作基地

前言

著者研究团队从事微生物发酵床养猪至今，研发出4个类型微生物发酵床：①原位微生物发酵床（In situ microbial fermentation bed, In situ MFB），由传统猪舍与发酵床结合形成，猪舍地面直接铺上垫料；②低位微生物发酵床（lower microbial fermentation bed, LMFB），由漏缝地板与发酵床结合形成，在漏缝地板的下方建设发酵床；③饲料微生物发酵床（fodder microbial fermentation bed, FMFB），由发酵饲料与发酵床结合形成，利用猪可饲性农业副产物为垫料铺设猪舍，其上猪养，粪便排泄其上，粪便作为可饲性垫料的补充氮源和健康猪肠道微生物组的接种来源，与垫料一同发酵，形成发酵饲料提供猪取食；④异位微生物发酵床（ectopic microbial fermentation bed, EMFB），由猪粪处理池与发酵床结合形成。目前，微生物发酵床技术向大型化、机械化、智能化方向发展，在动物养殖方面拓展出了新的应用领域，成功地应用在猪、牛、羊、兔、鸡、鸭、鹅等畜禽规模化养殖上，实现了无臭味、零排放、资源化的畜禽污染治理和资源高效利用的目标。

作为微生物发酵床中的一种类型，异位微生物发酵床是集中处理有机污染物的一种有效方法，其可用于养殖污染、餐厨垃圾、城市污水、有机废料等微生物处理，具有无臭味、成本低、效率高、分解彻底等优点。异位发酵床的发酵装备可分为小型、中型、大型，适应于家庭、餐馆、养殖场中废物的集中处理。异位发酵床由钢构房、喷淋池和发酵池组成（或发酵床箱），配备翻堆机、喷淋流加泵、微生物发酵菌种等设备和菌种。发酵床内铺设垫料，将有机污染物引导到异位微生物发酵床内，通过翻堆机将排泄物与发酵垫料混合，进行发酵，消纳粪污，消除臭味，实现零排放。发酵产物用于生产微生物菌剂、复合微生物肥料、生物有机肥等。异位发酵床投资少、运行费用低、操作简便，可适用于各种有机污染物微生物治理及其废弃物循环利用，具有较高的生态效益、经济效益和社会效益。

异位发酵床是利用微生物发酵集中处理养殖粪污等固体有机废弃物的一种槽式发酵装备，适用于动物粪便、餐厨垃圾、城市污泥等废弃物的发酵处理和资源转化。本书针对异位发酵床处理猪粪过程中的微生物组变化进行研究，全书共分五章。第一章概述，阐述了微生物发酵床研究进展、基于宏基因组技术分析微生物组研究进展、异位发酵床的原理与结构。第二章发酵床微生物宏基因组研究方法，阐述了发酵床微生物群落研究进展、基于宏基因组技术分析发酵床微生物组研究方法、发酵床微生物高通量测序与统计工作流程、微生物发酵床细菌分类操作单元（OTU）分析、微生物发酵床核心微生物组（OTUs）分析、 α -多样性种类复杂度分析、 β -多样性种类复杂度分析、差异效应判别分析（LEfSe）、种类冗余（RDA）分析等。第三章异位发酵床微生物宏基因组分析，阐述了样本采集与数据分析、微生物组种类（OTUs）多样性指数分析、稀释曲线分析、热图分析、成分分析、分类学分析、Venn图分析等。第四章异位发酵床细菌微

生物组多样性,阐述了细菌群落数量分布多样性、细菌群落种类(OTUs)分布多样性、细菌丰度(%)分布多样性。第五章异位发酵床真菌微生物组多样性,阐述了真菌群落数量(reads)分布多样性、真菌群落种类(OTUs)分布多样性。书后列出了真菌分类纲要和细菌分类纲要。

本书研究从2013年开始,得到了国家农业部公益性行业(农业)科研专项——功能性微生物制剂在农业副产物资源化利用中的研究与示范(201303094)、984重点项目——高效新型微生物资源引进与创新(2011-G25)等的支持;得到了国家科技部国际合作项目——规模化养猪污染微生物治理关键技术联合研发(2012DFA31120)、国家重点研发计划——农业废弃物耗氧发酵技术与智能控制设备研发(2016YFD0800606)、国家科技支撑计划——规模化养殖场发酵床微生物制剂研究及其废弃物多级循环利用技术的集成示范(2012BAD14B00)、国家973计划前期项目——芽胞杆菌种质资源多样性及其生态保护功能基础研究(2011CB111607)等的支持;得到了国家基金委自然科学基金项目——中国芽胞杆菌资源分类及系统发育研究(31370059)等的支持;得到了福建省政府财政厅、发改委、科技厅等部门多个项目的支持,如养殖污染微生物综合治理——微生物发酵床大栏养殖系统的研究、财政科技专项——生产性工程化实验室重大装备建设、农业“五新”工程项目——利用猪粪资源固体发酵微生物菌剂产品的研究与应用、科技创新平台——福建省农业生物药物研究与应用平台(2007N02010)、农业微生物科技创新团队项目——农业微生物基础生物学与农业生物药物的研究与应用(STIF-Y03)等的支持,在此一并致谢。

本书研究过程得到了许多专家学者的支持和帮助,其中我们与中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所朱昌雄博士等进行了多年的合作研究;福建农林大学林乃铨博士、关雄教授、张绍升教授、尤民生教授在实验方法讨论方面提供了许多帮助;中国科学院微生物研究所姚一建博士为异位发酵床菌种芽胞杆菌的采集提供许多支持;福建农林大学谢联辉院士、福建农科院谢华安院士、吉林农业大学李玉院士等对本书的著述给予了极大的鼓励和支持;等等。在此深表感谢。

限于著者学术水平,书中不足与疏漏之处在所难免,望国内同行批评指正,与之共勉。

著者

2018年5月于福州

目 录

第一章 概述 / 1

第一节 微生物发酵床研究进展	1
一、微生物发酵床养猪技术起源	1
二、微生物发酵床养猪技术原理	2
三、微生物发酵床的管理	2
四、发酵床微生物特性研究	3
五、微生物发酵床垫料的资源化利用技术	6
第二节 基于宏基因组技术分析微生物组研究进展	7
一、微生物宏基因组技术发展与应用	7
二、细菌群落宏基因组研究进展	10
三、真菌群落宏基因组研究进展	21
第三节 异位发酵床的原理与结构	32
一、异位发酵床原理与处理工艺	32
二、异位微生物发酵床结构设计	33
三、异位微生物发酵床运行管理	35
四、讨论	36

第二章 发酵床微生物宏基因组研究方法 / 39

第一节 概述	39
一、发酵床的原理与优势	39
二、发酵床微生物群落研究进展	39
三、基于宏基因组技术分析微生物组研究	40
第二节 基于宏基因组技术分析发酵床微生物组研究方法	40
一、发酵床垫料样本采集及垫料理化性质测定	40
二、发酵床垫料的发酵程度等级划分	41
三、宏基因组高通量测序	41
四、宏基因组测序数据质控	41
五、分类操作单元 (OTUs) 聚类分析	41
六、分类操作单元 (OTUs) 抽平处理	41
七、核心微生物组 (core microbiome) 分析	41
八、物种分类和丰度分析	42

九、样本复杂度分析	42
十、显著性差异分析	42
第三节 发酵床微生物高通量测序与统计工作流程	43
一、微生物组高通量测序	43
二、短序列去杂	44
第四节 微生物发酵床细菌分类操作单元 (OTU) 分析	45
一、发酵床细菌分类操作单元 (OTU) 提取	45
二、发酵床细菌分类操作单元 (OTU) 比对	45
三、发酵床细菌分类操作单元 (OTU) 抽平处理	46
四、发酵床细菌分类操作单元 (OTU) 稀释曲线	46
五、发酵床细菌分类操作单元 (OTU) 群落 α -多样性	48
六、发酵床部分样本微生物 (OTUs) 物种谱系演化	49
第五节 微生物发酵床核心微生物组 (OUTs) 分析	50
一、发酵床微生物组共有 OTUs 数与覆盖样本数关系	50
二、微生物发酵床冬季和春季共有与特有微生物组 (OTUs) 分析	50
三、发酵床微生物组 (OTUs) 丰度主成分分析	51
四、发酵床微生物组 (OTUs) 秩-多度曲线	51
五、发酵床微生物组 (OTUs) 物种累积曲线	52
六、发酵床微生物组 (OTUs) 分类阶元数量分布	53
七、发酵床微生物组 (OTUs) 丰度柱状图分析	53
八、发酵床冬季和春季微生物组 (OTUs) 丰度柱状图分析	54
九、发酵床微生物组 (OTUs) 物种丰度热图分析	54
十、发酵床微生物组 (OTUs) 物种丰度星图分析	54
第六节 发酵床微生物组 (OTUs) α -多样性种类复杂度分析	56
一、发酵床单个样本微生物组 (OTUs) 种类复杂度分析	56
二、发酵床冬季和春季微生物组 (OTUs) 箱线图分析	56
三、发酵床微生物组 (OTUs) α -多样性指数秩和检验	56
第七节 发酵床微生物组 (OTUs) β -多样性种类复杂度分析	58
一、发酵床样本间微生物组 (OTUs) UniFrac 距离	58
二、发酵床样本间微生物组 (OTUs) UniFrac 距离聚类分析	58
三、发酵床样本间微生物组 (OTUs) 主成分分析 (PCA)	58
第八节 发酵床微生物组 (OTUs) 差异性分析	59
一、发酵床微生物组 (OTUs) 差异效应判别分析 (LEfSe)	59
二、发酵床不同分类阶元微生物组 (OTUs) 差异分析	60
三、发酵床属分类阶元微生物组 (OTUs) 差异分析	60
四、发酵床冬季和春季微生物组 (OTUs) 热图和主成分分析	61
第九节 发酵床微生物组 (OTUs) 种类冗余 (RDA) 分析	61
一、梯度分析	61

二、分析结果	62
第十节 讨论	62
一、我国畜禽粪便农业面源污染的治理	62
二、微生物宏基因已广泛应用于微生物生态学研究	63
三、养猪发酵床微生物宏基因组分析	63
四、发酵床微生物组 (OTUs) α -多样性种类复杂度分析	63

第三章 异位发酵床微生物宏基因组分析 / 65

第一节 样本采集与数据分析	65
一、样本采集	65
二、宏基因组测定	66
三、数据分析	67
第二节 微生物组种类 (OTUs) 多样性指数分析	73
一、细菌种类 (OTUs) 多样性指数	73
二、真菌种类 (OTUs) 多样性指数	74
第三节 微生物组种类稀释曲线分析	75
一、细菌种类 (OTUs) 稀释曲线分析	75
二、真菌种类 (OTUs) 稀释曲线分析	75
第四节 微生物组种类 (OTUs) 丰度比例结构	77
一、细菌种类 (OTUs) 丰度比例结构	77
二、真菌种类 (OTUs) 丰度比例结构	80
第五节 微生物组种类 (OTUs) 成分分析	83
一、微生物种类主成分分析 (PCA)	83
二、微生物种类主坐标分析 (PCoA)	107
三、基于 Beta 多样性距离的非度量多维尺度分析 (NMDS)	108
第六节 异位发酵床细菌丰度结构	109
第七节 微生物组种类 (OTUs) Venn 图分析	113
一、细菌种类 Venn 图数据采集	113
二、真菌种类 Venn 图数据采集	152

第四章 异位发酵床细菌微生物组多样性 / 159

第一节 细菌群落数量 (reads) 分布多样性	159
一、细菌门数量 (reads) 分布结构	159
二、细菌纲数量 (reads) 分布结构	162
三、细菌目数量 (reads) 分布结构	165
四、细菌科数量 (reads) 分布结构	170
五、细菌属数量 (reads) 分布结构	178

六、细菌种数量 (reads) 分布结构	192
第二节 细菌群落种类 (OTUs) 分布多样性	193
一、细菌门种类 (OTUs) 分布结构	193
二、细菌纲种类 (OTUs) 分布结构	194
三、细菌目种类 (OTUs) 分布结构	199
四、细菌科种类 (OTUs) 分布结构	202
五、细菌属种类 (OTUs) 分布结构	209
六、细菌种种类 (OTUs) 分布结构	223
第三节 细菌丰度 (%) 分布多样性	224
一、细菌门丰度 (%) 分布结构	224
二、细菌纲丰度 (%) 分布结构	229
三、细菌目丰度 (%) 分布结构	236
四、细菌科丰度 (%) 分布结构	242
五、细菌属丰度 (%) 分布结构	252
六、细菌种丰度 (%) 分布结构	270

第五章 异位发酵床真菌微生物组多样性 / 278

第一节 真菌群落数量 (reads) 分布多样性	278
一、真菌门数量 (reads) 分布结构	278
二、真菌纲数量 (reads) 分布结构	283
三、真菌目数量 (reads) 分布结构	294
四、真菌科数量 (reads) 分布结构	307
五、真菌属数量 (reads) 分布结构	325
六、真菌种数量 (reads) 分布结构	345
第二节 真菌群落种类 (OTUs) 分布多样性	365
一、真核生物界 (OTUs) 分布结构	365
二、真菌门种类 (OTUs) 分布结构	366
三、真菌纲种类 (OTUs) 分布结构	367
四、真菌目种类 (OTUs) 分布结构	368
五、真菌科种类 (OTUs) 分布结构	370
六、真菌属种类 (OTUs) 分布结构	372
七、真菌种种类 (OTUs) 分布结构	374

参考文献 / 378

附录 / 385

一、真菌分类纲要	385
----------------	-----

1. 鞭毛菌亚门.....	385
2. 接合菌亚门.....	385
3. 子囊菌亚门.....	386
4. 担子菌亚门.....	387
5. 半知菌亚门.....	388
6. 名词解析.....	389
二、细菌分类纲要.....	390
1. 细菌分类阶元.....	390
2. 部分细菌名称.....	394

第一章 概述

| 第一节 | 微生物发酵床研究进展

一、微生物发酵床养猪技术起源

1. 中国古代猪圈垫草的方法

微生物发酵床养猪技术与中国古代的猪圈垫草产生厩肥的原理相似，微生物发酵床养猪技术应该起源于中国。《沈氏农书》记载：猪圈垫以秸秆，“养猪六口……垫窝草一千八百斤”。“磨路”，其实就是以碎草和土为垫圈材料，经猪踩踏后与粪尿充分混合而成的一种厩肥。《沈氏农书》大约是明崇祯末年（1640年前后）浙江归安（今浙江吴兴县）佚名的沈氏所撰，由张履祥辑补成《补农书》。张履祥（1611~1674），字考夫，号念芝，浙江桐乡杨园村（今浙江桐乡市）人。明亡后，隐居家乡讲理学并兼务农业，世称“杨园先生”，生平事迹载在《清史稿·儒林传》。他对《沈氏农书》极为欣赏，但尚感有不足，又根据本人经验和从老农那里得到的知识，约在清顺治十五年（1658）写成《补农书》。内容包括“补农书后”“总论”和“附录”3个部分，主要论述有关种植业、养殖业的生产 and 集约经营等知识，记载了桐乡一带较重要的经济作物如梅豆、大麻、甘菊和芋艿等栽培技术，内容相当广泛，且切实可行。乾隆年间，朱坤编辑《杨园全集》时，把《沈氏农书》与《补农书》合为一本，分上下两卷，统称为《补农书》，故后世刊本多用此书名。中华书局1956年出版了以张履祥辑补为作者的《沈氏农书》（图1-1）。



图 1-1 沈氏农书

2. 现代养猪微生物发酵床的起源

许多学者认为现代微生物发酵床养猪技术源于日本，20世纪40年代，日本微生物专家

岛本觉先生开创研究了一门新型农业高新技术——酵素菌（称岛本微生物农法）。20世纪50年代，日本山岸会在日本本国和韩国、泰国、德国、瑞士、澳大利亚、美国、巴西7个国家设立了50多个山岸农法示范基地。这些基地遵循循环农业的原理，将养殖业与种植业有机地结合在一起，发酵床养猪技术就是其中的一项重要技术。

二、微生物发酵床养猪技术原理

1. 微生物发酵床技术原理

微生物发酵床养猪技术又称自然养猪法、环保养猪法、懒汉养猪法、生态养猪技术、零污染养猪技术、微生物发酵床等，国外称为 Pig on litter、breeding pig on litter (Tam et al., 1993; Tiquia, 1996; Tam et al., 1996)、deep-litter-system (Morrison et al., 2007; Turner et al., 2000)、in situ decomposition of manure、bio-bed System (Tiquia et al., 1997)、the microbial fermentation bed (陈绿素等, 2010)。该技术核心是根据微生态和生物发酵原理，筛选功能微生物，通过特定营养条件培养形成土著微生物原种，将原种按一定比例掺拌谷壳、木屑等材料，控制发酵条件，制成有机垫料。将垫料按一定厚度铺设在猪舍内，制成发酵床，利用生猪拱翻的生活习性，使垫料和排泄的猪粪尿充分混合，通过微生物的原位发酵，使猪粪尿中的有机物质进行充分分解和转化（王连珠等, 2008; Collin et al., 2001），最终达到降解、消化猪粪尿，除去异味和无害化的目的，是一种无污染、零排放的新型环保养猪技术。

2. 微生物发酵床优点

与传统养猪模式相比，微生物发酵床养猪技术结合了微生态技术、发酵技术及畜禽养殖技术，有许多优点。

(1) 发酵床垫料对猪粪的原位降解 微生物发酵床养猪技术利用垫料里活性有益微生物对猪只排泄物进行原位分解发酵，无需冲洗猪舍，减少废水排放，减少氨、氧化亚氮、硫化氢和吡啶等臭味物质产生和挥发，猪舍内无臭味，提高了猪舍的卫生（Chan et al., 1994）。

(2) 大空间发酵床结构设计 微生物发酵床猪舍一般采用全开放式，通风透气好，温湿度均适宜猪的生长，发酵床垫料松软，适应猪翻拱的自然生活习性，改善了猪的生活环境（Pedersen et al., 2003）。

(3) 发酵床养殖减少病害发生 与传统养猪法相比，发酵床猪舍的猪花在站立、拱翻等运动上的活动时间更多，机体抵抗力增强（Morrison et al., 2007）；猪发病减少，特别是消化道疾病的发生率的下降，减少了抗生素、抗菌性药物的使用；可以提高育肥猪的蛋白质合成，增加机体氮沉积量，促进生长（谢红兵等, 2011）。

(4) 发酵床充分降解猪粪实现零排放 猪粪尿与垫料的混合物在微生物的作用下迅速发酵分解，产生热量，中心温度可达40~50℃，表层温度能维持在25~30℃，能很好地解决猪舍的冬季保温难题，节约了能源。

(5) 发酵床实现机械化管理 无需冲洗猪舍，可节约大量用水；机械翻耕，节约大量人力。

三、微生物发酵床的管理

1. 微生物发酵床垫料组成

发酵床是填入垫料池中垫料的总称，它是微生物发酵床养猪法中的核心技术之一。好的

垫料应价廉易得,它能使动物安乐、舒适,吸水、吸氨气性能强,粉尘少,有害有毒物质少,粪尿不易使其腐败(Wirth, 1983)。发酵床的面积根据猪的大小和饲养数量的多少进行确定。保育猪一般为 $0.5\sim 0.8\text{m}^2/\text{头}$,育肥猪 $0.8\sim 1.5\text{m}^2/\text{头}$,母猪 $2.0\sim 2.5\text{m}^2/\text{头}$ (周开锋, 2008),以50%稻壳+50%锯末+麸皮1%+菌种0.1%饲养效果最好(董建平和王玉梅, 2012; 池跃田等, 2011)。随着应用面积的扩大,垫料资源需求增加,出现了多元化的垫料配方。用65%的棉秆、椰子壳粉等代替锯末、稻壳制作发酵床,在 30°C 条件下发酵效果较为稳定,降解猪粪的效果较好(李宏健等, 2012)。以粉碎玉米秸秆为主的发酵床、以花生壳为主的发酵床和以锯末为主的发酵床饲喂生猪较常规水泥地面饲养组均能够提高猪的生长性能及免疫效果,且利用玉米秸秆和花生壳作为发酵床垫料能够明显提高猪的增重率和饲料利用率(高金波等, 2012)。利用废弃食用菌块代替垫料原料中的锯末,对育肥猪生长性能与对照组相比差异不显著,不影响饲养效果(邓贵清和蒋宗平, 2011)。

2. 微生物发酵床垫料管理技术

微生物发酵床养猪体系中,垫料发酵的控制是垫料管理的核心,如何使猪的排泄物与垫料的处理能力达到平衡对发酵床养猪非常关键。由于地区和操作过程的差异,有些猪场垫料的发酵效果并不理想,存在发霉、发酸、不发酵的现象,直接导致发酵的失败,造成人力、物力的大量浪费,甚至会造成猪的中毒现象。许多学者对发酵床气味控制、培养基调控、营养元素分解进行了大量的研究。要使垫料发酵成功,其湿度必须维持在50%左右,具有较高的pH值和较低的尿素、氨气和亚硝酸盐,但是不溶性蛋白质和硫酸盐含量应较高,管理得当的发酵床垫料有利于控制恶臭气体的产生(Chan et al., 1994)。垫料发酵直接影响着发酵床的猪粪降解、臭气分解、物质转化、病原菌防控(Groenestein et al., 1996)。宋泽琼等采用“盐梯度悬浮法”测定不同发酵时间发酵床垫料的悬浮率,根据垫料表观确定其发酵程度级别,构建垫料发酵指数方程,判别的相关系数高达94.20%。能快速、准确地判定未知垫料的发酵程度,对生产具有指导意义(宋泽琼等, 2011)。在日常饲养过程中,对于猪粪便堆积得比较多的地方,要及时疏粪。发酵床表面既要保持很松散,又不能扬尘,要及时调节水分,否则猪容易患呼吸道疾病。垫料减少明显时要及时补充新鲜的垫料。猪全部出栏后,最好将垫料放置干燥 $2\sim 3\text{d}$;将垫料从底部反复翻弄均匀1次,视情况可以适当补充发酵床菌种混合物,重新堆积发酵,间隔24h后即可再次进猪饲养(方如相, 2012; 安宝聚, 2012; 蒲丽, 2011)。

四、发酵床微生物特性研究

1. 发酵床微生物特性

在微生物发酵床的发酵过程中,猪粪尿排泄在垫料上,自然发酵不断进行,微生物在发酵进程中发挥着重要作用,微生物的种类和数量的变化影响着发酵床的运行状况,其过程与禽畜粪便堆肥的腐熟过程有许多相似之处。郑雪芳等(2011)报道了微生物垫料在发酵进行的过程中,大肠杆菌在微生物发酵床基质垫层的种群数量随着使用时间的增加逐步减少,表层(第1层 $0\sim 10\text{cm}$)和底层(第4层 $60\sim 70\text{cm}$)分布量最大,第2层($20\sim 30\text{cm}$)分布量最少。大肠杆菌毒素基因的分布规律与之类似。基质垫层能明显抑制大肠杆菌的生长。基质垫层使用后期(第9个月)比使用初期(第1个月)大肠杆菌种群数量明显减少,降低幅度在 $67.45\%\sim 96.53\%$,说明微生物发酵床能抑制大肠杆菌特别是携带毒素基因的大肠杆菌的生长,且对大肠杆菌的生防效果随使用时间的延长而增加。大肠菌群值均在 $10^4\text{cFu}/100\text{g}$ 之内,达到了

GB 7959—2012 中规定的无公害化, 由此可以看出厚垫料养猪所得到的猪肉产品在对食品安全方面造成严重威胁的大肠菌群方面不存在问题 (栾炳志, 2009)。

凌云等 (2007) 研究发现, 在禽畜粪便堆肥过程中, 发酵床里细菌的数量最多, 在不同堆肥温度时期各微生物的数量有不同的变化, 如升温期各种微生物数量均增加, 高温期只有高温细菌和高温放线菌的数量继续上升, 在腐熟期细菌数量下降, 而放线菌和霉菌数量明显上升, 发酵床的微生物群落结构不断发生着变化。张庆宁等 (2009) 从生态养猪模式的发酵床中分离纯化到 14 株优势好氧细菌, 这些菌株在猪粪和垫料组成的发酵床中生长优势强, 耐发酵高热, 能产生多种与猪粪降解相关的酶类, 除臭效果明显, 对某些病原菌具有抑制作用, 对猪安全并有促进生长的功能。刘让等 (2010) 通过实验室和野外采集样本, 分别获得 1 株地衣芽胞杆菌、3 株蜡芽胞杆菌、1 株短小芽胞杆菌、1 株乳酸杆菌, 研究得到这 6 株菌对大肠杆菌、葡萄球菌均有不同程度的抑制作用, 且动物试验安全, 为生态养猪提供了发酵菌种。

刘云浩等 (2011) 通过对比 6 种关于养猪发酵床垫料微生物总 DNA 的提取方法, 表明 SDS-CTAB 结合法是一种高效、可靠的垫料微生物总 DNA 提取方法, 有利于进行下游的分子生态学研究。此外, 刘波等运用脂肪酸生物标记法研究了零排放猪舍基质垫层微生物群落的多样性, 结果表明不同生物标记多样性指数在基质垫层不同层次分布不同, 提出了微生物群落分布的特征指标, 构建发酵指数指示基质垫层的发酵特性 (2008)。发酵床中微生物种类很多, 采用二氧化氯和威特消毒王两种消毒药对发酵床消毒后, 对 0cm、-5cm、-15cm 三个层面的垫料菌数有些影响, 但经 48h 后细菌数量随着时间的延长开始增长, 如果观察到垫料对粪便降解能力下降, 可及时喷洒营养剂缓解, 或清除垫料表层添加新垫料 (郑雪芳等, 2009)。

2. 微生物发酵床垫料对猪病害抑制作用

郑雪芳等 (2011) 通过调查微生物发酵床养猪基质垫层大肠杆菌及其毒素基因的数量分布变化动态, 分析微生物发酵床对猪舍大肠杆菌的生物防治作用。分离不同使用时间、不同层次基质垫层的大肠杆菌, 利用 PCR 特异性扩增 UdiA 基因来鉴定、检测大肠杆菌, 并对大肠杆菌 12 种毒素基因进行多重 PCR 检测。构建大肠杆菌种群分布的动态模型, 分析微生物发酵床对大肠杆菌病原的生防效果。从不同使用时间不同层次基质垫层分离鉴定出大肠杆菌 419 株, 并从这些菌株中检测出 59 株携带毒素基因, 毒素基因类型为 8 种。其中 1 个月基质垫层的毒素基因阳性检出率最高, 为 22.47%, 其次是 7 个月基质垫料, 为 16.5%, 最低的是 9 个月基质垫料, 为 4.23%。大肠杆菌在微生物发酵床基质垫层种群数量时间变化规律为: 随着使用时间的增加种群数量逐步减少; 种群数量空间变化规律为: 表层 (第 1 层 0~10cm) 和底层 (第 4 层 60~70cm) 分布量最大, 第 2 层 (20~30cm) 分布量最少。大肠杆菌毒素基因的分布规律与之类似。从构建的大肠杆菌种群分布动态模型可以看出, 基质垫层第 1 层 ($y=169.67x^{-1.0137}$) 和第 3 层 ($y=313.11x^{-2.1885}$) 大肠杆菌种群数量随使用时间呈指数线性方程分布; 第 2 层 ($y=0.1006x^3-2.3733x^2+16.094x-22.454$) 和第 4 层 ($y=0.3159x^3+6.0913x^2-35.634x+79.513$) 大肠杆菌种群数量随使用时间呈一元三次方程分布, 基质垫层能明显抑制大肠杆菌的生长。基质垫层使用后期 (第 9 个月) 比使用初期 (第 1 个月) 大肠杆菌种群数量明显减少, 降低幅度在 67.45%~96.53%, 说明微生物发酵床对猪舍大肠杆菌能起到显著的生物防治作用。微生物发酵床能抑制大肠杆菌特别是携带毒素基因大肠杆菌的生长, 且对大肠杆菌的生防效果随使用时间的延长而增加。

卢舒娴等 (2011) 通过调查微生物发酵床养猪基质垫层中细菌、真菌、放线菌的群落动

态,并以大肠杆菌和沙门氏菌作为指示菌,分析微生物发酵床对猪肠道细菌性疾病的生物防治作用。采用NA、PDA和高氏一号培养基对不同使用时间、不同层次基质垫层中的细菌、真菌和放线菌进行分离,用特异性培养基伊红亚甲蓝琼脂和亚硫酸铋琼脂分离基质垫层中大肠杆菌和沙门氏菌,研究发酵床微生物群落动态,分析微生物发酵床对病原菌的生防效果。微生物发酵床中细菌是优势菌,分布数量达到了 10^8 数量级,其群落动态呈现先上升后下降的趋势,真菌和放线菌的数量相对于细菌低3~4个数量级,并随着垫料使用时间的增加,分布量逐渐减少。基质垫层有一定量大肠杆菌和沙门氏菌的分布,其相对含量与细菌呈显著的负相关,而与真菌和放线菌呈显著正相关,在垫料使用的后期(第5个月)比使用前期(第1个月)分布数量明显较少,其减少幅度分别为82.8%~100.0%和60.3%~89.6%,说明微生物发酵床对猪舍大肠杆菌和沙门氏菌病原能起到显著的生物防治作用。微生物发酵床能够抑制大肠杆菌和沙门氏菌的生长,对大肠杆菌和沙门氏菌病原具有生防效果。

3. 微生物发酵床养猪生态行为

唐建阳等(2011)比较了微生物发酵床养殖和传统的养殖条件下仔猪的行为特点,结果表明,两种养殖模式下,仔猪躺卧和睡眠行为持续时间在被测的行为中比例最高,达70%以上,采食和饮水行为次之,分别为15.96%(微生物发酵床养殖)和9.33%(传统的养殖)。相比传统养殖,微生物发酵床养殖下,仔猪的探究行为发生的概率和持续时间比例明显增加,分别增加了28.62%和12.21%;争斗行为发生概率和持续时间比例明显减少,分别减少了49.83%和91.26%。我们引入营养指数和健康指数来评价微生物发酵床养殖下仔猪的健康概况,结果表明,微生物发酵床饲养下仔猪的营养指数和传统饲养下仔猪的营养指数相当,分别为10.83和10.03,而微生物发酵床饲养下仔猪的健康指数明显高于传统饲养下仔猪的健康指数,分别为245.12和21.96,说明微生物发酵床养殖模式下,仔猪生长得更健康。

4. 微生物发酵床的挥发性物质

猪排泄物在微生物作用下厌氧分解产生的恶臭物质多达160余种,主要包括挥发性脂肪酸、酚类、吡啶类、氨和挥发性胺、含硫化合物(Le et al., 2005),其中挥发性脂肪酸包括乙酸、丙酸、异戊酸、己酸等,吡啶和酚类化合物主要包括吡啶、粪臭素、甲酚和4-乙酚,挥发性含硫化合物主要包括硫化物、甲硫醇和乙硫醇,来自粪中硫酸盐的还原和含硫氨基酸的代谢。猪舍内粪尿分解产生的恶臭使猪抵抗力和免疫力降低,代谢强度减弱,生产能力下降,对疾病的易感性提高,长期生活在养猪场周边恶臭环境中的人们更易患气管炎、支气管炎、肺炎等呼吸系统疾病(Mitloehner et al., 2007)。

微生物发酵床猪舍为全开放猪舍,猪的排泄物被垫料中的细菌作为营养迅速降解、消化,猪舍内无明显异味感。正常发酵状态下,微生物发酵床分解猪粪的过程产生挥发性物质,包括烷类、酯类、烯类、酚类、苯类、噻吩类和哌啶类等,如butylated hydroxytoluene(二丁基羟基甲苯)、eicosane(二十碳烷)、hexacosane(二十六碳烷)、heptacosane(二十七碳烷)、pentacosane(二十五碳烷)等(蓝江林等,2012)。良好发酵进程的发酵床可以减少尿素、氨、氧化亚氮、硫化氢、吡啶、3-甲基吡啶等臭味物质产生和挥发(Groenestein et al., 1996),可以减少许多令人不愉快的气体(Shilton, 1994; Bonazzi et al., 1992; Kaufmann, 1997)。但是当垫料中微生物因某些原因生长不良时,排泄在垫料上的猪粪无法分解,就会产生恶臭味,无法达到微生物降解猪粪的目的,这也是判别发酵床微生物发酵好坏的方法之一。如在混合肥料和锯屑的微生物发酵过程中,如果发酵条件不理想,就会产生

污染空气的挥发性中间气体 N_2O 和 NO ，直接影响猪的生长 (Groenestein et al., 1996)。

五、微生物发酵床垫料的资源化利用技术

1. 发酵床垫料成分组成

对于已经达到使用年限，没有再生必要的垫料以及在垫料再生过程中淘汰的部分，可以经过高温堆肥处理，对垫料进行高温杀菌消毒和腐熟后，制成有机肥料使用，实现资源化利用 (常志州等, 2009; 郑社会, 2011)。发酵床养猪系统中产生的有机垫料经过堆肥化处理后的产物达到了有机肥料标准，pH 值为 7.23、有机质含量为 37.81%、全氮含量为 2.49%、全磷 (P_2O_5) 含量为 3.68%，总养分含量达到 7.59%，是一种优质的有机肥 (黄义彬等, 2007)。使用时间较长的养猪发酵床垫料含有高浓度的有机碳和营养素，其传导率、Cu 和 Zn 的含量也更高 (Tam et al., 1993)。但发酵不成功的垫料循环回收用于农业土壤中，会产生危害植物的毒性物质影响种子发芽、农作物的生长 (Turner et al., 2000)。在生猪养殖过程中，为了防止疾病、提高饲料利用率和促进生长，在饲料添加剂中大量使用铜、铁、锌、锰、钴、硒、碘、砷等中微量元素 (黄玉溢等, 2011)。由于这些重金属元素在动物体内的生物效价很低，大部分随畜禽粪便排出体外，故畜禽粪便中往往含有高量的重金属，从而增加了农用畜禽粪便污染环境的风险 (刘荣乐等, 2005)。应三成等 (2010) 对不同使用时间和类型的生猪发酵床垫料中的 22 个有机和无机成分进行了测定分析，使用 1~3 年的垫料中 Cu、Zn 的平均值接近或超过国家标准的最高允许含量，表明废弃垫料不能直接用作有机肥还田 (应三成等, 2010)。此外，发酵床垫料废渣可用来栽培鸡腿菇 (郑社会, 2011)，而对于更加系统的资源利用技术尚未见更多报道，亟待深入研究。

2. 微生物发酵床垫料资源化利用体系的构建

微生物发酵床技术在生产中显现的问题虽然在一定程度上限制技术的推广应用，但这项技术在养殖污染控制方面显现出来的优势是无可比拟的。因此，亟须对生产中出现的新问题深入研究，构建资源循环利用体系，引导产业链形成。技术体系将养猪过程作为生物资源的转化过程，通过开发利用资源，进行清洁生产，废弃物资源化利用，形成“资源—产品—再生资源”的闭环反馈式循环过程 (见图 1-2) (刘波等, 2009)。

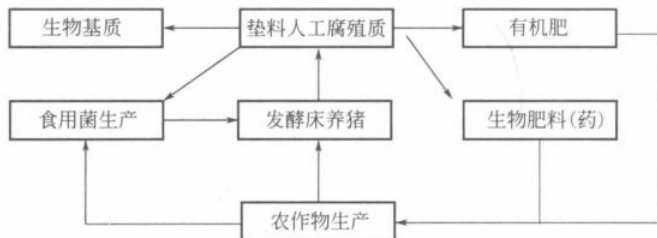


图 1-2 微生物发酵床垫料资源化循环利用模式

在该循环体系中，养猪作为体系的核心环节，将猪作为高效生物反应器，生产猪肉产品和垫料人工腐殖质产品，然后，将垫料人工腐殖质作为生产原料，加工成为有机肥；接种功能微生物，加工成生物肥料 (药)；替代食用菌 (部分) 栽培料，种植食用菌；调整配方，生产育苗基质；食用菌菌渣可再次用来生产有机肥或生物肥料 (药)；这些产品用于农作物生产，生产饲料产品和发酵床原料产品，再用于发酵床养猪。如此，形成闭环循环，实现“最佳生产，最适消费，最少废弃”，达到人与自然和谐的、可持续发展的新型社会的目标。