郑雪芳, 刘 波, 朱育菁,等. 磷脂脂肪酸生物标记法分析养猪发酵床微生物群落结构的空间分布[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(4): 804–812. ZHENG Xue-fang, LIU Bo, ZHU Yu-jing, et al. Spatial distribution of microbial communities in a fermentation bed based on phospholipid fatty acid biomark-ers[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(4): 804–812.

磷脂脂肪酸生物标记法分析养猪发酵床 微生物群落结构的空间分布

郑雪芳1,刘 波1*,朱育菁1,王阶平1,陈倩倩1,魏云华2

(1.福建省农业科学院农业生物资源研究所,福州 350003; 2.福建省农业科学院农业工程技术研究所,福州 350003)

摘 要:采用磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acids, PLFA)生物标记法分析发酵床大栏养猪微生物群落结构的空间分布特点。从发酵床的 5 个区域(A、B、C、D、E)和 3 个层次(表层、中间层和底层)采集垫料样品,利用 Sherlock MIS 4.5 系统分析各样品的 PLFA。结果表明,15:00、17:00、a15:0 等 7 种 PLFA 在各样品中均有分布,为完全分布型,而 a12:0 和 17:1 w6 分别只在 A 区和 B 区分布,为 不完全分布型。指示细菌、真菌、放线菌、革兰氏阳性细菌(G⁺)、革兰氏阴性细菌(G⁻)的 PLFA 及总 PLFA 在 D 区表层分布量最大。在 各垫料中,PLFA 分布量均表现为细菌>真菌>放线菌。A 区各层次的真菌/细菌比值显著高于其他区域(P<0.05),而 G⁺/G⁻比值则显著 低于其他区域(P<0.05)。多样性分析表明,不同区域和层次的垫料 Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou 指数值均呈现显著差异 (P<0.05)。聚类分析表明,当兰氏距离为 117.1 时,可将各样品聚为两个类群;类群 I 包含 A 区的垫料,其特征是指示不同微生物的 PLFA 种类少和含量低;类群 II 包含其他 4 个区域的垫料。当兰氏距离为 23.4 时,B 区和 D 区各层次样本聚在同一亚类群中,其 PLFA 种类少和含量低;类群 II 包含其他 4 个区域的垫料。当兰氏距离为 23.4 时,B 区和 D 区各层次样本聚在同一亚类群中,其 PLFA 种类多、含量高,而 C 区和 E 区各层次样本聚在另一亚类群中,其 PLFA 含量中等。主成分分析表明,主成分 1 和主成分 2 基本能将发酵床不同空间垫料样本区分出来,其中 A 区单独归在一类群,D 区和 B 区归在一类群,C 区和 E 区归在一类群,与聚类分析结果一致。综上,发酵床大栏养猪不同空间的微生物种群结构不同,A 区微生物种类少、含量低,而 B 区和 D 区微生物种类多、含量高。

关键词:发酵床;大栏养猪;微生物群落结构;磷脂脂肪酸(PLFA) 中图分类号:X713 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2018)04-0804-09 doi:10.11654/jaes.2017-1225

Spatial distribution of microbial communities in a fermentation bed based on phospholipid fatty acid biomarkers

ZHENG Xue-fang¹, LIU Bo^{1*}, ZHU Yu-jing¹, WANG Jie-ping¹, CHEN Qian-qian¹, WEI Yun-hua²

(1.Agricultural Bio-Resources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2.Agricultural Engineering and Technology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: The spatial distribution of microbial flora in a fermentation bed was analyzed using phospholipid fatty acid(PLFA) biomarkers. Padding samples were collected from five areas(A, B, C, D, and E) and three depths(surface, middle, and bottom) of the fermentation bed. PLFAs in each sample were determined using the Sherlock MIS 4.5 system. The results showed that seven PLFA biomarkers, including 15: 00, 17:00, and a15:0 were distributed in all areas and at all depths of the fermentation bed, conforming to a complete distribution type. Meanwhile, a12:0 and 17:1 w6 were distributed only in areas A and B, respectively, conforming to incomplete distribution types. The high– est PLFA contents representing bacteria, fungi, actinomycete, G^+ , G^- , and total PLFA were all in the surface layer samples of area D, reach– ing up to 994.24 nmol·g⁻¹, 286.83 nmol·g⁻¹, 33.65 nmol·g⁻¹, 357.75 nmol·g⁻¹, 69.38 nmol·g⁻¹, and 1 315.70 nmol·g⁻¹, respectively.

of Science and Technology of Fujian Province, China(2015NZ0003-1); The Science and Technology Innovation Team Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences(STIT2017-1-11)

收稿日期:2017-09-08 录用日期:2017-12-04

作者简介:郑雪芳(1977—),女,博士,副研究员。E-mail:zhengxuefangfz@163.com

^{*}通信作者:刘 波 E-mail:fzliubo@163.com

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201303094);福建省科技重大专项(2015NZ0003-1);福建省农科院科技创新团队项目(STIT2017-1-11) Project supported: The Special Scientific Research Fund of Agricultural Public Welfare Profession of China(201303094); The Special Fund for Key Program

2018年4月 郑雪芳,等:磷脂脂肪酸生物标记法分析养猪发酵床微生物群落结构的空间分布

805

PLFA biomarkers displayed the same distribution features in all samples; Bacteria > fungi > actinomycetes. Area A had the highest fungi/ bacteria ratio and the lowest G⁺/G⁻ ratio. Diversity analyses indicated that the Simpson and Shannon indexes in area A were lower than those in other areas, while the Pielou index in area A was higher than that in other areas. Cluster analysis revealed that all the samples were clustered into two groups at a Lance-distance of 117.1. Group I contained only the samples from area A, which had minimum PLFA content and components; Group II included the samples from areas B, C, D, and E. Moreover, at a Lance-distance of 23.4, group II was divided into two subgroups; Samples from areas B and D with the highest PLFA contents and components were clustered into one subgroup; and samples from areas C and E with mid-range PLFA contents were clustered into a second subgroup. Principal components analyses showed that the first and second principal components distinguished samples from different areas of the fermentation bed: The samples from area A belonged to one group, while those from areas B and D, and C and E were clustered into two other groups. Taken together, these results show that the fermentation bed has a different microbial community in different areas. The microbial species and contents were low in area A, but high in both areas B and D.

Keywords: fermentation bed; pig rearing; microbial community structure; phospholipid fatty acids(PLFA)

我国是养猪大国,每年猪粪的产生量突破50亿 t,粪污已成为当今社会三大污染源之一^[1]。微生物发 酵床养猪是一种新型环保养猪模式,利用农业副产品 如谷壳、秸杆、锯糠、椰糠等制作发酵床垫料层,添加 微生物菌剂,经发酵铺垫到猪舍,生猪生活在发酵床 上,通过发酵床形成的有益微生物群落分解猪粪,消 除恶臭,实现猪场的零排放[2-3]。

微生物发酵床养猪的核心技术是利用其形成的 有益功能微生物种群,长期和持续稳定地将猪粪尿 进行降解。因此,研究发酵床的微生物群落结构对于 揭示发酵床对猪粪尿的降解、转化规律等具有重要意 义[45]。赵国华等[6研究发酵床养猪模式下不同使用年 限微生物群落的变化,利用微生物分离结合 16S rRNA 分子生物学鉴定对发酵床微生物群落进行分 析;张学峰等⁽⁷⁾利用微生物分离结合 16S rRNA 研究 了不同深度垫料对养猪土著微生物发酵床稳定期 微生物菌群的影响;李娟等8进行了鸡发酵床不同垫 料理化性质及微生物菌群变化规律研究。作者前期研 究^[9]中利用磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)生物标记分析了不同使用时间发酵床微生物 群落结构的动态变化规律,Yin 等¹⁰采用传统培养结 合分子生物学技术研究发酵床养猪模式下细菌的种 群结构。然而,目前关于发酵床微生物群落结构的空 间分布研究鲜见报道。

微生物群落的研究通常采用传统分离培养法,但 是许多功能微生物都处于存活不可培养状态[11-13]。 PLFA 图谱分析是近几年来发展的研究微生物群落结 构的一种新方法, 它可定量分析微生物群落的生物 量和群落结构[14-15]。本研究利用 PLFA 法研究大栏养 猪发酵床微生物群落的空间分布特性,寻找出其变化 规律,为微生物发酵床大栏养殖提供理论依据。

材料与方法 1

1.1 实验选址和饲养环境

实验地点位于福清市渔溪现代设施农业样本工 程示范基地的微生物发酵床大栏养猪舍,猪舍长93 m、宽 33 m,占地总面积为 3069 m²,其中发酵床面积 1617 m²,深度为 75 cm,使用时间为 1 年,发酵床垫料 由谷壳 30%、椰糠 70%构成。猪舍装配自动喂料和饮 水系统、微喷雾化空气消毒系统、喷雾垫料加湿系统、 环境(光、温、湿、NH3、通风)监控系统。猪舍温度控制 在 28~32 ℃,湿度控制在 60%~70%。定期对垫料进行 翻堆(每周 2~3 次将表层垫料进行翻耙,2 个月深翻一 次,每批猪出栏后,用新垫料替换表层腐熟程度高的 垫料),猪只1500头,为"杜×长×大"三元杂交商品猪, 采用大栏养殖模式,饲养密度为1头·m⁻²,常规管理。 1.2 取样方法

将整个发酵床划分为5个不同的区域:A、B、C、D 和 E。每个区域再划分为 3 个层次:表层(0~25 cm)、 中间层(25~50 cm)、底层(50~75 cm)。 A 区靠近风机, E 区靠近水帘, B、C、D 区为仔猪活动和排便密集区域 (图1)。每个区域的每层取样方法为五点取样,每层 的样本充分混合后取出小样(10g),进行 PLEA 测定, 每个小样设3个重复。

1.3 PLFA 分析方法

PLFA 的提取方法参考文献[16-17]并略作修改。 具体操作如下:称取 10g 样本至 50 mL 离心管中,加 入 20 mL 0.2 mol·L⁻¹ 的 KOH 甲醇溶液,充分混匀,37 ℃水浴 1 h(毎 10 min 涡旋 1 次);加入 3 mL 1.0 mol・ L⁻¹的醋酸溶液,充分摇匀;加入 10 mL 正已烷,充分 摇匀,在 6000 r·min⁻¹条件下离心 10 min;将上层溶液 转入干净玻璃瓶中,在 N2 气流下挥发掉溶剂;加入 1

农业环境科学学报 第 37 卷第 4 期



gure 1 Schematic of sample collection in microb fermentation bed

mL体积比为1:1的甲基叔丁基醚:正已烷溶液,充分溶解,转入GC小瓶,用于脂肪酸测定。

PLFA 成分采用美国 Agilent 6890N 型气相色谱 仪测定。色谱柱 HP-ULTRA2(25 m×0.2 mm×0.33 µm), 采用分流进样,分流比为 100:1,进样量为 1 µL。二阶 程序升高柱温:柱温先以 5 ℃·min⁻¹由 170 ℃升至 260 ℃,再以 40 ℃·min⁻¹由 260 ℃升温至 310 ℃,保持 90 s。汽化室温度为 250 ℃,检测器温度为 300 ℃,柱前 压 10.00 psi(1 psi=6.895 kPa)。载气(H₂)流速为 2 mL·min⁻¹,尾吹气(N₂)流速为 30 mL·min⁻¹。PLFA 的鉴 定利用 Sherlock MIS 4.5 系统(MIDI,Newark,Delaware, 美国)。

1.4 数据统计与分析

(1)PLFA 生物标记的识别:不同PLFA 指示不同 类群的微生物,一些饱和或单不饱和脂肪酸代表细 菌生物量,其中支链磷脂脂肪酸常见于革兰氏阳性 细菌(G⁺)如 i11:0、a12:0、i12:0等^[18];环化脂肪酸和 单烯不饱和脂肪酸在革兰氏阴性细菌(G⁻)中占比高, 如cy17:0、cy19:0 w8c、10:0 30H等^[19-21];18:1w9c、 18:3w6,9,12等多烯脂肪酸为真核生物所独有,其 总和可指示真菌生物量^[22];指示放线菌脂肪酸的 有10Me16:0、10Me17:0和10Me18:0^[23]。

(2)微生物群落多样性指数分析:引入群落生态 学丰富度指数 Shannon、多样性指数 Simpson 和均匀 度指数 Pielou,分析发酵床不同空间垫料微生物群落 的多样性。按照计算物种指数方法¹²⁴计算各指数值。

Shannon 指数: $H=-\sum P_i \ln P_i$

Simpson 指数: $C=1-\sum (n_i/N)^2$

Pielou 指数:e=H/lnS

式中:S为群落中的脂肪酸总种类数;P_i=n_i/N;n_i为 i 类脂肪酸个数;N为该试验中总脂肪酸个数。 (3)聚类分析采用 DPS 软件,以供试样品的PLFA 为样本,进行单因子方差分析,构建矩阵,以兰氏距离 为聚类尺度,用类平均法进行系统聚类,分析发酵床 不同空间微生物种群动态。

(4)采用 DPS 软件中多元统计分析中的主成分 分析(Principal Component Analysis, PCA)方法,主要 包括数据求协方差矩阵,计算特征方程中所有特征 值,并根据特征值累积比例确定主成分的数量,计算 主成分载荷值和主成分得分,进行一级主成分评分 等。主成分分析过程采用 DPS 软件的相关模块进行 处理,具体步骤参见文献[25]。

2 结果与分析

2.1 发酵床不同空间垫料微生物 PLFA 测定

微生物发酵床不同空间垫料共检测到 57 个脂肪 酸生物标记,不同的生物标记代表不同类型的微生物 (表1)。脂肪酸生物标记 15:0、17:0、a15:0、16:1 w9c、 10Me18:0、18:1 w9c 和 20:1 w9c 在各样本中均有分 布,属完全分布类型,说明这类脂肪酸指示的微生物 适应性强,在各空间小生境均能生长;10:0、11:0、20: 4 w6,9,12,15c 等其余 50 种脂肪酸生物标记只在发 酵床特定空间分布,为不完全分布,说明大部分微生 物只在特定环境下生长;a12:0、i17:1 w10c、18:3 w6, 9,12 和 20:1 w7c 只在发酵床的 A 区分布,17:1 w6 只在发酵床的 B 区分布,16:0 30H 只在发酵床的 B 区表层分布,15:0 30H 和 16:0 20H 只在发酵床的E 区表层分布。A区分布量最大的前3种PLFA为18:1 w9c、i17:1 w10c 和 16:1 w9c; B 区和 D 区分布量最大 的前 3 种 PLFA 为 16:0、18:1 w9c 和 i15:0;C 区和 E 区分布量最大的前 3 种 PLFA 为 16:0、18:1 w9c 和 a15:0;A 区 PLFA 种类最少,其表层、中间层和底层 分别为 17、12 种和 16 种, B 区 PLFA 种类最多, 其表 层、中间层和底层分别为 45、45 种和 44 种。

2.2 发酵床不同空间垫料微生物生物量特征

由表 2 可以看出,微生物发酵床不同空间垫料细菌、真菌、放线菌、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌 和总 PLFA 含量差异显著(P<0.05)。D 区表层最大,分 布量分别为 994.24、286.83、33.65、357.75、69.38 nmol· g⁻¹和1 315.70 nmol·g⁻¹,均显著高于其他空间(P< 0.05);这些特征微生物 PLFA 含量在各个区域表层 (A 区表层的 G⁺、B 区表层的真菌和放线菌含量除外) 垫料分布量均高于中间层和底层;A 区各层次垫料细 菌、真菌、革兰氏阳性细菌和总 PLFA 含量均显著低

17:1 w9c

革兰氏阴性细菌

2018年4月 郑雪芳,等:磷脂脂肪酸生物标记法分析养猪发酵床微生物群落结构的空间分布

807

表1 发酵床不同空间垫料 PLFA 生物标记类型及含量(3个重复数据的平均值) Table 1 Types and contents of PLFA biomarkers of litter system from microbial fermentation bed in different spatial(Mean)																
A X				BX		C 🗵			D 🕅				ΕX			
PLFA 生物标记	微生物类型	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层
10:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	1.77	1.69	1.99	1.17	0.90	1.01	2.82	2.07	1.79	1.58	1.20	1.12
11:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	1.21	0.77	0.67	0.48	0.29	0.28	1.45	0.73	1.01	0.65	0.42	0.30
12:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	9.12	8.59	10.12	8.74	4.85	4.46	14.29	15.71	8.06	7.85	6.62	7.77
13:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	2.40	2.07	2.23	1.52	0.91	0.63	3.63	2.38	1.95	1.51	1.24	1.10
14:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	38.33	32.58	34.77	22.11	15.53	9.11	55.50	36.64	25.41	21.91	19.27	18.41
15:0	普通细菌	0.80	0.30	0.15	29.53	25.04	27.98	18.95	12.89	7.76	39.69	26.61	23.58	19.68	17.20	16.61
16:0	普通细菌	0.83	0.00	0.00	271.53	237.91	273.12	201.59	136.13	87.02	373.58	222.58	200.77	224.94	184.16	177.57
17:0	普通细菌	4.52	1.45	1.33	9.59	8.21	10.45	11.24	8.48	5.45	15.79	11.20	9.82	15.31	10.76	11.93
18:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	39.07	35.09	41.91	55.62	34.72	25.73	54.97	35.94	41.16	60.46	48.64	55.52
19:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	0.61	0.43	0.58	1.00	0.55	0.44	2.56	0.76	0.68	1.99	0.77	1.05
20:0	普通细菌	0.00	0.00	0.00	2.17	1.87	2.38	2.94	1.65	2.95	2.83	2.08	2.09	4.95	3.57	3.96
10:0 30H	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	0.19	0.23	0.00	0.24	0.53	0.00	0.86	0.42	0.17	0.55	0.00	0.49
11:0 30H	革兰氏阴性细菌	0.33	0.00	0.00	0.36	0.41	0.36	0.64	0.62	0.33	0.39	0.66	0.24	0.96	0.53	1.08
i11:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	0.48	0.47	0.61	0.37	0.30	0.46	0.69	0.54	0.69	0.55	0.41	0.53
i11:0 30H	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	0.20	0.15	0.19	0.48	0.89	0.43	0.12	0.12	0.00	1.79	0.51	1.08
12:0 30H	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	0.93	0.92	0.58	0.33	0.47	0.00	1.36	1.05	0.82	1.13	0.47	0.53
a12:0	革兰氏阳性细菌	0.35	0.00	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
i12:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	0.78	0.74	0.85	0.62	0.56	0.36	1.35	0.87	0.73	0.81	0.66	0.76
a13:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	2.05	2.27	2.12	1.43	1.00	0.82	3.17	2.81	1.42	2.16	1.45	0.00
i13:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	2.87	2.57	2.87	1.85	1.46	0.93	4.77	3.04	2.31	2.48	1.87	1.72
a14:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.52	0.72	0.87	1.42	0.86	0.37	0.76	1.46	2.54	2.97	0.82	0.00	1.08	3.41
i14:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	18.69	16.34	18.63	11.48	11.11	7.65	29.28	18.07	15.58	14.83	10.51	13.00
14:1 w5c	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	0.67	0.98	0.75	0.00	0.36	0.40	0.78	1.51	0.86	0.57	0.46	1.54
15:0 30H	需氧细菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.05	0.00	0.00
a15:0	革兰氏阳性细菌	0.26	0.50	0.58	89.06	75.92	88.11	69.65	52.00	32.14	125.40	85.44	69.15	77.40	62.94	69.62
i15:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	98.19	84.02	94.24	62.14	43.80	25.80	136.22	84.79	70.10	74.42	55.03	62.80
i15:0 30H	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.32	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00	1.19	0.00	0.71
15:1 w6с	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	1.36	1.15	1.37	1.68	0.73	0.00	0.00	0.00	1.23	0.00	0.00	0.00
16:0 20H	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.02	0.00	0.00
16:0 30H	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	6.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
a16:0	革兰氏阳性细菌	2.22	3.02	2.97	0.00	1.76	1.62	1.88	1.01	2.68	0.00	0.00	0.00	5.63	1.51	4.41
i16:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	46.05	38.66	43.39	34.26	24.00	18.40	0.00	0.00	0.00	35.88	30.51	30.94
16:1 w5c	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	6.72	6.67	8.49	4.79	2.48	2.04	10.86	5.55	5.27	4.57	3.25	3.47
16:1 w9c	革兰氏阴性细菌	27.64	17.81	12.26	6.93	7.36	7.54	4.93	2.18	1.17	7.59	5.51	4.58	4.31	3.85	2.45
10 Me17:0	放线菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.78	4.51	1.51	2.34	0.00	2.32	2.88	8.53	4.18	3.94
a17:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	15.54	12.16	14.70	14.37	11.92	11.68	21.71	15.39	12.77	25.86	16.30	19.49
cy17:0	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	5.38	4.62	11.73	11.16	8.42	6.07	7.56	7.52	12.21	13.86	10.79	9.94
i17:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	15.59	11.38	13.34	11.03	9.13	6.92	21.72	17.13	12.92	17.45	13.13	16.26
17:1 w9c	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	4.71	1.76	2.48	1.06	0.77	0.53	6.58	5.17	2.79	0.00	1.24	1.36
i17:1 w10c	革兰氏阴性细菌	31.50	12.35	10.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
i17:1 w5c	硫酸盐还原菌	2.93	0.00	1.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17:1 w5	硫酸盐还原菌	0.67	0.00	0.00	5.75	4.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17:1 w6	硫酸盐还原菌	0.00	0.00	0.00	7.11	6.29	7.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17:1 w8c	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00	5.58	2.23	8.83	6.59	0.00	10.10	6.83	7.96

0.00 0.00 0.00 15.59 11.38 13.34 0.00 0.00 0.00 8.84 8.19 6.15 0.00 0.00 0.00

续表 1 发酵床不同空间垫料 PLFA 生物标记类型及含量(3 个重复数据的平均值)

Continued table 1 Types and contents of PLFA biomarkers of litter system from microbial fermentation bed in different spatial (Mean)

	• •													^		
PLFA 生物标记	微生物类型	AX		В区		C区		D区		Ε区						
		表层	中间层	底层	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层	表层	中间层	底层
10Me18:0	放线菌	5.14	3.19	6.00	7.44	3.66	5.62	4.22	3.13	3.01	33.65	9.51	5.95	8.45	4.73	6.18
i18:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.90	1.35	1.19	0.00	0.00	0.00	9.18	8.90	5.95
18:1 w5c	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	1.18	0.95	1.16	0.00	0.00	0.00	2.46	0.52	1.35	0.00	0.00	0.00
11Me 18:1 w7c	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.40	0.21	0.33	0.62	0.21	0.65	1.32	0.00	0.00	0.00	2.24	0.28	1.48
18:1 w9c	真菌	33.35	21.08	21.40	196.06	175.05	205.29	167.88	109.72	59.97	286.83	169.27	157.30	187.87	147.60	148.33
18:3 w6,9,12	真菌	11.35	10.90	5.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
cy19:0 w8c	革兰氏阴性细菌	0.00	0.00	0.00	6.34	5.49	7.74	8.77	6.34	6.97	8.24	5.15	7.84	14.13	9.05	8.89
i19:0	革兰氏阳性细菌	0.00	0.00	0.00	1.05	1.60	1.84	1.55	1.04	0.86	10.90	1.17	2.58	3.70	1.86	2.31
20:1 w7c	革兰氏阴性细菌	1.15	1.15	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20:1 w9c	革兰氏阴性细菌	2.67	2.62	1.73	3.32	3.70	3.93	2.46	2.26	1.58	4.91	4.61	4.10	0.00	2.23	2.68
20:2 w6,9c	原生动物	3.35	0.00	1.56	1.49	0.00	1.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
20:4 w6,9,12,15c	原生动物	0.00	0.00	0.00	0.88	0.83	1.57	2.02	0.74	0.60	0.97	0.79	0.95	2.03	2.48	1.18

于其他区域(P<0.05);细菌、真菌和放线菌在各个空间垫料分布量均为细菌>真菌>放线菌。

由图 2 可见,A 区各层次真菌/细菌值极显著高 于其他区域(P<0.01),而 G⁺/G⁻值则极显著低于其他 区域(P<0.01)。B、C、D、E 各区域和各层次之间的真 菌/细菌值和 G⁺/G⁻值无显著差异。

2.3 发酵床不同空间微生物群落多样性分析

如表 3 所示,发酵床不同空间垫料的 Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou 指数均呈现显著差异(P< 0.05)。Simpson 指数和 Shannon 指数最大值均出现在

C 区底层,分别是 0.881 3 和 3.777 9,C 区底层的Pielou 指数较大,为 0.709 9,仅次于 A 区中间层(0.759 8)和 A 区底层(0.751 1)。A 区 3 个层次的 Simpson 指数和 Shannon 指数小于其他区域,Pielou 指数大于其他区 域,其中 A 区表层和中间层的 Simpson 指数最小,为 0.821 4,A 区中间层的 Shannon 指数最小,为 2.723 7, A 区中间层的 Pielou 指数最大,为 0.759 8。

农业环境科学学报 第 37 卷第 4 期

2.4 基于 PLFA 发酵床不同空间垫料群落结构的聚类 分析

发酵床不同空间垫料聚类结果如图 3 所示。当兰

$Tabel \ 2 \ Content \ of \ special \ microbial \ PLFA \ for \ microbial \ fermentation \ bed \ in \ different \ spatial (Mean \pm SD, nmol \cdot g^{-1})$									
区域	层次	细菌	真菌	放线菌	革兰氏阳性细菌	革兰氏阴性细菌	总 PLFA		
A区	表层	75.87±3.45i	44.70±2.98i	5.14±0.22gh	2.83±0.09j	63.29±1.90ab	129.08±10.08j		
	中间层	39.72±3.44j	31.98±9.38j	3.19±0.23j	4.04±0.16j	33.93±2.59hi	74.90±1.45k		
	底层	33.31±4.23j	26.43±1.09j	6.00 ± 0.18 g	5.24±0.32j	24.98±4.50j	67.32±3.66k		
B区	表层	$769.60{\pm}9.28{\rm b}$	$196.06{\pm}5.74{\rm bc}$	7.44±0.30f	$291.43{\pm}8.25\mathrm{b}$	$59.98{\pm}5.39{\rm bc}$	$975.51{\pm}7.81\mathrm{b}$		
	中间层	660.41±8.41cd	$175.05{\pm}1.80\mathrm{d}$	3.66±0.54ij	249.99±11.31d	45.77±3.30f	839.91±11.09d		
	底层	757.51±17.31b	$205.29{\pm}4.86\mathrm{b}$	8.40±0.32ef	$283.80{\pm}14.83{\rm bc}$	59.66±3.54bc	$974.37 \pm 13.02 b$		
C区	表层	$589.33 \pm 7.20e$	$167.88{\pm}10.50{\rm de}$	$8.73 \pm 0.39 e$	221.43±7.05e	$42.55{\pm}5.80\mathrm{fg}$	$767.94 \pm 25.02 e$		
	中间层	$409.13 \pm 19.02 g$	109.72±9.12g	4.64±0.54hi	160.60±4.48h	31.63±1.13i	$524.22 \pm 3.90 h$		
	底层	279.26±10.06h	$59.97 \pm 4.54 h$	5.35 ± 0.25 gh	112.67±6.53i	21.75±3.61j	345.19±16.00i		
D区	表层	994.24±8.36a	286.83±12.11a	33.65±1.56a	357.75±10.86a	69.38±2.27a	1 315.7±13.26a		
	中间层	641.49±2.37d	$169.27{\pm}9.61{\rm de}$	11.83±1.66c	232.22±1.94e	$52.57{\pm}4.23{\rm de}$	$823.34{\pm}11.85d$		
	底层	553.00±10.40f	157.30±6.10ef	8.83±0.70e	189.07±2.78g	47.61±1.56ef	720.08±9.61fg		
Ε区	表层	$689.65 \pm 21.87 c$	187.87±8.95c	$16.98 \pm 1.01 \mathrm{b}$	273.78±4.97c	$53.99{\pm}2.84{\rm cd}$	896.54±21.72c		
	中间层	539.50±10.98f	147.60±5.22f	8.91±0.72de	206.44±4.54f	39.21±6.91gh	698.48±19.89g		
	底层	570.20±8.18ef	148.33±5.15f	10.12±0.80d	233.39±14.47e	41.47±1.76fg	729.84±19.96f		

表 2 微生物发酵床不同空间垫料特征微生物 PLFA 含量(平均值±标准差, nmol·g $^{-1}$)

注:同列数值后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

 $Note: Data within the same column followed by different lowercase letters were significant difference (P<\!0.05). The same below.$



L1, L2 and L3 were referred to surface layer, middle layer and bottom layer, respectively. The same below

图 2 微生物发酵床不同空间垫料真菌/细菌和 G*/G*值

Figure 2 Fungi/bacteria and G⁺/G⁻ for microbial fermentation bed in different spatial

表 3 发酵床不同空间微生物群落多样性指数(平均值±标准差)

Table 3 Microbial community diversity index of microbial fermentation bed in different spatial (Mean±	Гable 3	Microbial communi	ty diversity index	of microbial	fermentation bed in	n different spatial(Mean±SD
---	---------	-------------------	--------------------	--------------	---------------------	----------------------	---------

区域	层次	Simpson 指数	Shannon 指数	Pielou 指数
AX	表层	0.821 4±0.000 2f	2.873 0±0.002 0k	$0.702 \ 9{\pm}0.000 \ 7{\rm d}$
	中间层	$0.821 \ 4 \pm 0.000 \ 4 f$	2.723 7±0.000 51	0.759 8±0.000 8a
	底层	$0.837 \ 1 \pm 0.000 \ 9 e$	3.004 2±0.000 3j	$0.751 \ 1 \pm 0.000 \ 3b$
B区	表层	$0.856~5 \pm 0.000~9c$	3.559 7±0.000 4f	0.648 2±0.000 8h
	中间层	0.851 4±0.000 7d	3.508 1±0.000 6h	0.638 8±0.000 4i
	底层	0.852 7±0.001 0d	$3.529 \ 4 \pm 0.000 \ 5 g$	$0.646~5 \pm 0.000~5 h$
C区	表层	0.859 1±0.000 2c	3.562 2±0.000 4f	$0.656~5 \pm 0.000~7 \mathrm{g}$
	中间层	0.863 3±0.000 3c	3.587 3±0.000 2e	0.657 1±0.000 3g
	底层	0.881 3±0.000 6a	3.777 9±0.000 7a	$0.709 \ 9 \pm 0.000 \ 3c$
D区	表层	$0.845 \ 9 \pm 0.000 \ 9 d$	3.431 1±0.000 1k	0.649 2±0.000 6h
	中间层	$0.856 \ 9 \pm 0.000 \ 4c$	$3.528 \ 6 \pm 0.000 \ 4 \mathrm{g}$	0.663 0±0.000 8g
	底层	0.849 3±0.000 6d	3.457 8±0.000 1i	0.654 2±0.000 2h
Ε区	表层	$0.869~6{\pm}0.000~4{\rm b}$	3.701 7±0.000 2b	$0.686~5 \pm 0.000~5 e$
	中间层	0.862 3±0.000 5c	$3.601 \ 3 \pm 0.000 \ 3 d$	0.672 2±0.000 3f
	底层	$0.872~7{\pm}0.000~7{\rm b}$	$3.694 \ 0\pm 0.000 \ 4c$	$0.685 \ 0\pm 0.000 \ 6e$

氏距离为 117.1 时,可将不同空间垫料聚为两个类 群,A 区 3 个层次的垫料聚在一个类群(类群Ⅰ),其 他区域各层次聚在另一类群中(类群Ⅱ);当兰氏距离 为 23.4 时,可将类群Ⅱ细分为 2 个亚类群,B 区和 D 区在一个亚类群,C 区和 E 区聚在同一亚类群中,相 同区域不同层次样本均在同一类群中。由此可见,发 酵床垫料 PLFA 分布与区域性关系更为密切。

2.5 基于 PLFA 发酵床不同空间垫料群落结构的主成 分分析

基于 PLFA 发酵床不同空间垫料经主成分分析 得出,主成分1(PC1)贡献率为52.08%,主成分2 (PC2)贡献率为72.26%,PC1和PC2基本能将发酵床 不同空间垫料样本区分出来(图4)。A 区3个不同层 次垫料样本归在一类群;D 区和 B 区的 3 个不同层次 垫料样本归在一类群;C 区和 E 区的 3 个不同层次垫 料样本归在一类群;A 区的 3 个不同层次垫料微生物 种群与 PC1 和 PC2 均呈负相关;E 区 3 个不同层次 垫料微生物种群与 PC1 和 PC2 均呈正相关;D 区和 B 区的 3 个不同层次垫料微生物种群与 PC1 呈正相 关,与 PC2 均呈负相关;C 区垫料表层微生物与 PC1 和 PC2 呈正相关,中间层和底层与 PC1 呈负相关,与 PC2 均呈正相关。

3 讨论

微生物发酵床是通过基质垫层微生物群落来完成对猪粪尿的降解^[26]。然而,目前关于发酵床与微生

农业环境科学学报 第 37 卷第 4 期



图 3 微生物发酵床群落结构空间分布的聚类分析 Figure 3 Cluster analysis of microbial community for microbial fermentation bed in different spatial

物群落的密切相关性知之甚少。Bardgett 等[27]认为土 壤中 PLFA 的组成可以表示土壤微生物群落的组成 和结构。Klamer 等^[28]和 Stegera 等^[29]的研究指出,脂肪 酸量的增减能很好地反映微生物种群的兴衰。本研究 利用 PLFA 生物标记技术研究发酵床微生物群落空 间分布特性,以期探明发酵床对猪粪的降解机理。发 酵床不同空间垫料共检测出 C10~C20 共 57 个脂肪酸 生物标记,表明发酵床存在丰富的微生物种类,研究 结果与刘波等^[30]对发酵床宏基组分析结果相吻合。研 究发现发酵床不同空间垫料 PLFA 的种类和含量都 不同,A 区各层垫料检测的 PLFA 种类最少,B 区各层 垫料中 PLFA 种类最多。D 区表层垫料细菌、真菌、放 线菌、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和总 PLFA 含量明显高于其他区域。此外,各个区域表层 PLFA 种 类和数量高于中间层和底层,说明发酵床表层微生物 种类最多、分布数量最大,可能是因为:①表层直接触 新鲜猪粪尿,粪尿输入提供营养,促进微生物的生长;

②中间层和底层温度高,可达 60~70 ℃^[5,31-32],高温杀 死了一部分微生物,从而导致中间层和底层微生物种 类和数量低于表层。张学峰等^[7]研究表明,发酵床从 30 cm 至 70 cm 垫料中微生物数量依次降低,认为其 是不同深度垫料的温度、含氧量、微生物分解原材料 等综合作用的结果。

G+细菌和G-细菌是生态系统中细菌的重要组成 部分[33]。Merilä 等[34]认为 G*细菌能够适应条件较差的 环境,且在资源有限的情况下更擅长竞争资源,而 G-细菌的生存更依赖环境提供新鲜的有机物。Saetre 等^[3]同样认为较高比例的 G+细菌是环境从富营养到 寡营养的转变。作者前期对不同使用时间垫料微生物 群落结构的研究中发现,使用时间为1个月的垫料, 主要以 G-细菌为优势菌,形成的群落结构为初始群 落;使用时间为6个月垫料中G⁻和G⁻细菌含量相当, 为过渡型群落;而使用时间为24个月垫料则以G*细 菌为优势菌,为稳定型群落¹⁹。本研究发现,A 区垫料 的 G+/G-小于 1,G-细菌为优势菌,为初始群落;而发酵 床 B、C、D、E 区垫料的 G+/G-大于 1,说明这些区域 G+ 细菌分布量大于 G-细菌,发酵床已形成稳定的群落 结构,此外也预示着这些区域垫料的营养条件下降, 可以考虑补充新鲜的垫料。

多样性指数对于评价微生物群落多样性是非常 有效的方法,高的多样性指数代表高的微生物群落多 样性^[36]。Simpson 指数反映群落中常见物种数量^[37], Shannon 指数反映群落中物种的丰富度^[38],Pielou 指 数反映群落中各物种分布的均匀度^[39]。本研究显示, Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou 指数在发酵床 不同区域,甚至同一区域不同层次均存在显著差异, 表明随着发酵床微生态系统的确立,不同空间区域小





环境不同会造成微生物群落结构的空间异质性,如一 些微生物种类适应在垫料表层环境生存,而另一些微 生物种类则能适应或忍耐垫料深层次高温环境而存 在于这个生态系统中。发酵床 A 区的 Pielou 指数大 于其他区域,而 Simpson 指数和 Shannon 指数小于其 他区域,说明该区域垫料中微生物种类少、分布量低, 但分布均匀,与 PLFA 测定结果相吻合,即 A 区 PLFA 种类最少,其表层、中间层和底层分别为17、12种和 16种,远低于其他区域(一般超过40种)。

微生物组成及群落结构与外界环境(温度、湿度、 通风性等)密切相关,是环境变化的早期响应指标⁴⁰。 本研究为大栏养猪,发酵床面积大,每个区域面积约 为 325 m²,由于通风和水帘等设备分布位置不同,造 成不同区域局部小气候差异,从而形成不同群落结 构。聚类分析和主成分分析均显示发酵床 A 区 3 个 层次垫料样本单独归一类群,B区和D区样本划分为 一类,C区和E区样本归为另一类群中,说明B区和 D 区垫料形成相似微生物群落结构, 而 C 区和 E 区 的微生物群落结构相似。A 区垫料与 B、C、D、E 区形 成不同的微生物群落,这可能是因为 A 区靠近风机, 风力大,基质垫料较干燥,影响发酵床的发酵进程,该 区域微生物种类和数量均明显低于其他区域。B、C、D 区为中间区域,通风和湿度最适宜,为仔猪集中活动 和排便的主要场所,发酵床发酵速度快,形成微生物 种类多、数量大,因此,这些区域基质垫料熟化快,要 注意新垫料的添加。当然,发酵床的微生物发酵是一 个复杂的生物化学过程,而此过程是通过基质垫层微 生物群落的演替来完成的,在该过程中,每一个微生 物群落在一定的时间有适合自身生长繁殖的条件,对 某一种或某一类特定物质的降解起作用[20],在后续研 究中,还需结合其他技术如宏基因组技术对发酵床的 不同使用时间、不同空间、不同材质垫料的群落结构 进行进一步的研究,以期为发酵床科学管理和利用提 供更完整的依据。

4 结论

大栏养猪发酵床微生物群落结构在不同区域和 层次均存在明显差异:(1)细菌、真菌、放线菌、革兰氏 阳性细菌、革兰氏阴性细菌和总 PLFA 含量在各个区 域表层分布量高于中间层和底层,D区表层分布量最 大;A 区各层次真菌/细菌值显著高于其他区域,而 G+/ G-值则显著低于其他区域;(2)不同区域和层次的垫 料 Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou 指数值均呈 现显著差异;(3)A 区垫料形成的微生物群落结构不 同于其他区域,B区和D区垫料的微生物群落结构相 似,C 区和 E 区垫料的微生物群落结构相似。

参考文献:

- [1] 李 林, 付沿东. 浅谈标准化养殖场粪污处理与综合利用技术[J]. 山 东畜牧兽医,2017,38(5):36-37. LI Lin, FU Yan-dong. Brief talk about treatment and comprehensive utilization of waste in the poultry farms[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, 38(5):36-37.
- [2] 刘 波,朱昌雄. 微生物发酵床零污染养猪技术的研究与应用[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2009. LIU Bo, ZHU Chang-xiong. Research and application of microbial fermentation-bed for pig raising[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2009.
- [3] Chen Q Q, Liu B, Wang J P, et al. Diversity and dynamics of the bacterial community involved in pig manure biodegradation in a microbial fermentation bed system[J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(7):491-500.
- [4] Groenestein C M, Oosthoek J, Faassen H G V. Microbial processes in deep-litter systems for fattening pigs and emission of ammonia, nitrous oxide and nitric oxide[J]. International Journal for Vitamin & Nutrition Research, 1993, 82(3):168-176.
- [5] Tam N F Y, Vrijmoed L L P. Effects of the inoculum size of a commercial bacterial product and the age of sawdust bedding on pig waste decomposition in a pig-on-litter system[J]. Water Management & Research, 1993, 11(2):107-115.
- [6] 赵国华, 方雅恒, 陈 贵. 生物发酵床养猪垫料中营养成分和微生物 群落研究[J]. 安微农业科学, 2015, 48(8):98-101. ZHAO Guo-hua, FANG Ya-heng, CHEN Gui. Study on the nutritional components and microbial community in the beddings of pig raising by bio-fermentation bed[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 48(8):98-101.
- [7] 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 床稳定期微生物菌群的影响[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(9):1458-1462

ZHANG Xue-feng, ZHOU Xian-wen, GHEN Qun, et al. The influence of padding of different depth in native microorganism fermentation bed of pigs on microbial flora during steady period[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(9):1458-1462.

[8] 李 娟,石绪根,李吉进,等.鸡发酵床不同垫料理化性质及微生物 菌群变化规律的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 139-143. LI Juan, SHI Xu-gen, LI Ji-jin, et al. Study on physic-chemical properties and microorganisms of litter during feeding broilers in deep-litter system[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41 (2):139-143.

[9] 郑雪芳, 刘 波, 林营志, 等. 利用磷脂脂肪酸生物标记分析猪舍基 质垫层微生物亚群落的分化[J].环境科学学报,2009,29(11):2306-2317.

ZHENG Xue-fang, LIU Bo, LIN Ying-zhi, et al. Using phospholipid fatty acid biomarkers for analysis of the microbial subcommunity in pigsty litter[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(11): 2306-2317.

[10] Yin H M, Du D X, Xue J, et al. Molecular analysis of bacterial diversity in pig deep litter system[J]. Journal of Pure & Applied Microbiology, 2015, 9(1): 9-16.

- [11] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology Reviews*, 1995, 59(1):143–146.
- [12] McCarthy C M, Murray L. Viability and metabolic features of bacteria indigenous to a contaminated deep aquifer[J]. *Microbial Ecology*, 1996, 32(3):305–321.
- [13] White D C, Pinkart H C, Ringelberg A B. Biomass measurements: Biochemical approaches[M]//Hurst C J, Knudson G R, McInemey M J, et al. eds. Manual of environmental microbiology. Washington DC: ASM Press, 1997.
- [14] Boschker H T S, Middelburg J J. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 40(2):85–95.
- [15] Techtmann S M, Fortney J L, Ayers K A, et al. The unique chemistry of eastern Mediterranean water masses selects for distinct microbial communities by depth[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0120605.
- [16] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11):3605-3617.
- [17] Kourtev P S, Ehrenfeld J G, Häggelom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil[J]. *Ecology*, 2002, 83(11): 3152–3166.
- [18] Zelles L, Palojärvi A, Kandeler E. Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29(10):1325–1336.
- [19] Breulmann M, Masyutenko N P, Kogut B M, et al. Short-term bioavailability of carbon in soil organic matter fractions of different particle sizes and densities in grassland ecosystems[J]. Science of the Total Environment, 2014, 497/498;29–37.
- [20] Eo J, Park K C, Kim M H. Plant-specific effects of sunn hemp(Crotalaria juncea) and sudex(Sorghum bicolor×Sorghum bicolor var. sudanense) on the abundance and composition of soil microbial community [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2015, 213:86–93.
- [21] Hamman S T, Burke I C, Stromberger M E. Relationships between microbial community structure and soil environmental conditions in a recently burned system[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(7): 1703–1711.
- [22] Ruess L, Chamberlain P M. The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(11):1898–1910.
- [23] Moche M, Gutknecht J, Schulz E, et al. Monthly dynamics of microbial community structure and their controlling factors in three floodplain soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 90: 169–178.
- [24] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbo-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8):2351–2359.
- [25] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002. TANG Qi-yi, FENG Ming-guang. DPS data processing system for practical statistics[M]. Beijing; Science Press, 2002.
- [26] Dyaz-Ravina M, Bååth E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8):2970–2977.
- [27] Bardgett R D, Hobbs P J, Frostegård Å. Changes in soil fungal: Bacte-

rial biomass ratios following reductions in the intensity of management of upland grassland [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(3): 261–264.

- [28] Klamer M, Bååth E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27(1):9–20.
- [29] Stegera K, Jarvis A, Smårs S, et al. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost[J]. *Journal* of Microbiological Methods, 2003, 55(2):371-382.
- [30] 刘 波, 王阶平, 陈倩倩, 等. 养猪发酵床微生物宏基因组基本分析 方法[J]. 福建农业学报, 2016, 31(6):630-648.
 LIU Bo, WANG Jie-ping, CHEN Qian-qian, et al. Metagenomic analysis of microbial community in a microbial fermentation-bed for pig raising[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(6):630-648.
- [31] 赵瑞廷, 栾冬梅. 发酵床养猪的研究及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(3):81-83.

ZHAO Rui-ting, LUAN Dong-mei. Research and application of fermentation-bed for pig raising[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2010(3):81-83.

- [32] Deininger A, Tamm M, Krause R, et al. Penetration resistance and water-holding capacity of differently conditioned straw for deep litter housing systems[J]. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 2000, 77(3):335–342.
- [33] 张圣喜,陈法霖,郑 华. 土壤微生物群落结构对中亚热带三种典型阔叶树种凋落物分解过程的响应[J]. 生态学报, 2011, 31(11):3020-3026.

ZHANG Sheng-xi, CHEN Fa-lin, ZHENG Hua. Response of soil microbial community structure to the litter decomposition of three typical broadleaf species in mid-subtropical area, Southern China[J]. *Acta E-cologica Sinica*, 2011, 31(11):3020–3026.

- [34] Merilä P, Malmivaara Lämsä M, Spetz P, et al. Soil organic matter quality as a link between microbial community structure and vegetation composition along a successional gradient in a boreal forest[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 4(2):259–267.
- [35] Saetre P, Bååth E. Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32(7):909–917.
- [36] 席劲瑛, 胡洪营, 钱 易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1):138-141.
 XI Jin-ying, HU Hong-ying, QIAN Yi. Application of biolog system in the study of microbial community[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(1):138-141.
- [37] 郑学博, 樊剑波, 崔 键, 等. 沼液还田对旱地红壤微生物群落代谢 与多样性的影响[J]. 生态学报, 2016, 36(18):5865-5875.
 ZHENG Xue-bo, FAN Jian-bo, CUI Jian, et al. Analysis on metabolic characteristics and diversity of soil edaphon communities in upland red soil under biogas slurry application[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36 (18):5865-5875.
- [38] Maguran A E. Ecological diversity and its measurement[M]. Princeton: Princeton University Press, 1998.
- [39] Pielou E C. Mathematical ecology[M]. NewYork John Wiley & Sons Inc, 1975.
- [40] 曹志平. 土壤生态学[M]. 北京:化学工业出版社, 2007. CAO Zhi-ping. Soil ecology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.