

# 不同垫料组成对猪用发酵床细菌群落的影响

宦海琳, 闫俊书, 周维仁, 白建勇, 徐小明, 冯国兴, 顾洪如\*

(江苏省农科院畜牧研究所, 南京 210014)

**摘要:** 为了解垫料基质中细菌的群落结构多样性, 应用 PCR-DGGE 技术对发酵床 7 种不同垫料(锯木屑、稻壳、酒糟、菌糠、醋糟、稻草、稻壳炭)的细菌群落结构进行了研究, 根据 DGGE 指纹图谱, 对它们的细菌群落多样性和优势条带进行了分析。结果表明, 垫料样品的细菌多样性指数、丰富度均有所不同, 酒糟垫料组细菌多样性指数最高, 稻草垫料组细菌多样性指数最低。全锯木屑与 50% 稻壳相似性较高而聚为一类, 与 50% 菌糠次之, 与 50% 稻草的相似性最低。在垫料基质中检测到的菌群主要是节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)、*Amaricoccu* sp.、马杜拉放线菌属 (*Actinomadura* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillales* sp.)、梭菌属 (*Clostridium* sp.)、肠杆菌属 (*Escherichia* sp.)、细杆菌属 (*Microbacterium* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.) 以及一些未知的菌群。垫料组成是影响发酵床垫料微生物构成的重要因素, 稻壳、菌糠作为垫料可部分替代锯木屑, 而对发酵床垫料的微生物区系影响较小。

**关键词:** 发酵床; 垫料; 细菌群落; DGGE

中图分类号: X713 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)09-1843-06 doi:10.11654/jaes.2014.09.024

## Effects of Different Bedding Litters on Bacterial Community in Pig Biobed

HUAN Hai-lin, YAN Jun-shu, ZHOU Wei-ren, BAI Jian-yong, XU Xiao-ming, FENG Guo-xing, GU Hong-ru\*

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Previous research has shown that different digestion efficiency of various bedding litters in pig biobeds is linked to bacterial variation. Here we examined both bacterial community structure and predominant bands in biobeds with seven different bedding litters (full sawdust, rice husk, distiller's grains, mushroom residue, vinegar residue, rice straw and rice husk charcoal) using PCR-DGGE technique. The Shannon-Wiener index and richness had significant differences in different litters, with the highest Shannon-Wiener index found in the distiller's grains but the lowest in the rice straw. Bacterial community structure in 50% rice husk showed high similarity with that in full sawdust, followed by 50% mushroom residue, while the lowest similarity found in 50% straw. Bacterial strains detected in bedding litters belonged to *Arthrobacter* sp., *Amaricoccu* sp., *Actinomadura* sp., *Bacillales* sp., *Clostridium* sp., *Escherichia* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Staphylococcus* sp. and some unclassified-bacteria. In conclusion, bedding litter composition is an important factor influencing bacterial community structure of biobeds. Rice husk and mushroom residues could partially replace sawdust as bedding materials with little impacts on the microbial community.

**Keywords:** biobed; bedding litters; bacterial community; DGGE

随着养殖业的迅速发展,特别是规模化、集约化养殖的发展,畜禽粪尿造成的环境污染问题越来越严重,加强畜禽粪尿污染的防治已迫在眉睫,探索新的养殖方式显得越来越重要。发酵床养殖法是利用微生物

与垫料构建生猪生长的发酵床基质,通过床体中功能菌的新陈代谢分解生猪排泄的粪尿,从而实现对周围环境零排放的一种生态养殖方法<sup>[1]</sup>。垫料和发酵床功能菌群在发酵床养殖技术中起着决定性的作用。锯末因富含木质素、纤维素、半纤维素,疏松多孔,保水性和透气性好,是最佳的发酵床垫料<sup>[2]</sup>,但由于锯末资源在部分地区比较缺乏,价格也较贵,国内外针对锯木屑的替代垫料和配伍方案进行了探索。目前,替代锯木屑的垫料主要有麦秸、稻草、稻壳、玉米秸、泥炭、

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 江苏省农业自主创新基金 CX12(1001)

作者简介: 宦海琳(1981—),女,江苏扬州人,硕士,助理研究员,研究方向为畜牧微生物学。

\* 通信作者: 顾洪如 E-mail: guhongru@163.com

菌糠等<sup>[3-6]</sup>。发酵床中垫料是微生物分解粪便的环境载体,生物发酵床的核心是微生物的发酵和代谢作用,本课题的前期研究中发现,不同基质的发酵床发酵效果存在显著的不同,其原因可能是基质不同导致的微生物群落分解代谢差异所致。但有关不同垫料发酵床的微生物群落结构差异尚未见报道。

传统的微生物分离培养技术仅能分析出自然环境中少部分的物种,并且难以反映自然样品中微生物的丰度,因此不能有效反映发酵床中微生物组成的信息。近年来分子技术的发展给微生物生态学研究提供了新的途径。变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对微生物多样性的分析,不依赖于微生物的培养过程,而是直接提取环境样品中总的DNA,由此包括了样品中可培养微生物和未可培养微生物的总遗传信息,从而真实地反映微生物群落的原始组成<sup>[7]</sup>。目前,PCR-DGGE技术已在土壤微生物<sup>[8-9]</sup>、肠道菌群<sup>[10-11]</sup>、堆肥<sup>[12]</sup>等微生物多样性的研究中广泛运用。本研究以不同的垫料配比为研究对象,采用PCR-DGGE技术分析垫料微生物的组成,旨在比较不同垫料的微生物群落结构特征,为垫料的资源化应用、粪便原位转化效率的提高建立科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地点

样品采自南京六合某发酵床试验基地。每栏发酵床床面面积50 m<sup>2</sup>,深60 cm,水泥睡台10 m<sup>2</sup>,每栏所用垫料为不同基质(稻壳、菌糠、稻壳炭、醋糟、稻草、酒糟)与锯木屑混合,替代锯木屑的比例均为50%。所取的垫料样品分别为:(S1)全锯木屑,(S2)50%稻壳+50%锯木屑,(S3)50%菌糠+50%锯木屑,(S4)50%稻壳炭+50%锯木屑;(S5)50%醋糟+50%锯木屑,(S6)50%稻草+50%锯木屑,(S7)50%酒糟+50%锯木屑。使用的发酵菌种为江苏省农科院自行分离、配伍的菌剂,主要含芽孢杆菌(菌种产品质量孢子100亿·mL<sup>-1</sup>)。200 mL的菌剂稀释后与麸皮混合,堆积培养5~7 d,扩培后的菌剂接种于每栏发酵床垫料中,调节水分并拌匀后,铺至发酵床发酵。发酵床的日常维护主要包括垫料的浅层翻扒,将粪便集中的区域人工分散,当垫料出现明显下降时补充同样比例的垫料。发酵床育肥猪自2011年9月开始使用,为了解短期内基质垫层内微生物结构差异,本研究在进猪2个月后(11月)采集垫料<sup>[13]</sup>。

### 1.2 采样方法

从猪圈的一角开始采用S形路线,均匀采取栏内

5个点的样品,每个点分别从上至下用环刀取0~20 cm的垫料样品,置于自封袋中密封,防止水分挥发,放于有冰袋的保温盒中带回实验室-20℃保存。

### 1.3 微生物总基因组DNA的提取

#### 1.3.1 垫料样品的前处理

称取5 g冻存样品,加入到含有50 mL磷酸盐缓冲液(0.12 mol·L<sup>-1</sup>,pH8.0)的250 mL锥形瓶中,在150 r·min<sup>-1</sup>条件下室温振荡15 min。将上述混合物纱布过滤后,转移至50 mL离心管中,在8000 r·min<sup>-1</sup>条件下离心10 min,弃上清,沉淀-20℃保存备用。

#### 1.3.2 微生物总基因组DNA的提取

将前处理的样品转移至已灭菌的含锆珠的Screw-capped管中混匀,加入1 mL TN150和150 μL酸性酚(水饱和酚),Bead-beater匀浆(2000 r·min<sup>-1</sup>,3 min)。冰上冷却,加入150 μL氯仿/异戊醇,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min。上清液中加入150 μL氯仿/异戊醇和150 μL TE饱和酚。10 000 r·min<sup>-1</sup>离心1 min。上清液加入300 μL氯仿/异戊醇,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心1 min收集上层水相,加醋酸钠和异丙醇沉淀,沉淀物用70%的冰乙醇,风干沉淀,加无菌TE缓冲液溶解。

### 1.4 16S rDNA 基因 V6~V8 区 PCR 扩增

用带有GC夹子的细菌通用引物GC-U968(5'CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG)和L1401(5'CGG TGT GTA CAA GAC CC 3')对微生物总基因组DNA的16S rDNA基因V6~V8区进行PCR扩增。50 μL PCR反应体系:DNA 1 μL,引物968 1 μL,引物L1401 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 37.5 μL,Taq酶0.5 μL,dNTP 1 μL,MgCl<sub>2</sub> 3 μL,PCR缓冲液5 μL。PCR反应条件:94℃变性5 min,94℃变性10 s,56℃退火20 s,68℃延伸40 s,35个循环,72℃最终延伸10 min,4℃保存。

### 1.5 DGGE 分析

DGGE分析采用Bio-Rad电泳系统,聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%,变性梯度为30%~50%,在60℃、1×TAE、60V条件下电泳16 h,电泳结束后用银染法<sup>[14]</sup>染色,DGGE凝胶经GS-800型扫描仪(Bio-Rad,美国)扫描输入计算机,采用凝胶分析软件Molecular Analysis 1.61(Bio-Rad,美国)进行分析。用Shannon-Wiener多样性指数( $H'$ )、基因型丰富度( $S$ )指标来比较各个样品的细菌多样性,计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \lg P_i$$

式中: $P_i$ 由公式 $P_i = n_i/H$ 计算求得。 $n_i$ 为密度曲线上某一条带的峰高; $H$ 为所有峰高之和; $S$ 为样品中总

的条带数。

采用 UPGMA 分析比较不同垫料细菌群落结构的相似性。

### 1.6 DGGE 图谱中部分优势条带的序列分析

用无菌手术刀将 V6~V8 DGGE 图谱中分离明显、条带清晰且亮度高的优势性条带从凝胶上切下,用灭菌的 TE 缓冲液 4℃下浸泡过夜,然后取 1 μL 作模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94℃变性 5 min,94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环,72℃最终延伸 10 min。割胶回收 PCR 产物,产物经 pUCm-T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞,经蓝白筛选选择转化子,并用碱裂解法提取质粒,通过双酶切检测外源片段的插入。将阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序,获得 16S rDNA 序列,通过 NCBI 的 Blast 功能在 Genbank 数据库中进行相似性检索分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 16S rDNA 基因 V6~V8 区 PCR 扩增结果

将垫料经过前处理后,以提取的总 DNA 为模板进行 16S rDNA PCR 扩增,目标片段约为 450 bp(图 1),符合 16S rDNA V6~V8 区高变区片段大小,可以进行 DGGE 电泳。

### 2.2 不同垫料的 DGGE 指纹图谱分析结果

将 PCR 的扩增产物进行 DGGE 分离,分别得到不同垫料样品的细菌 DGGE 图谱(图 2)。由图 2 可知,DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在一定程度的差异,显示了生物发酵床中的细菌种群的多样性,同时也表明垫料的组成影响了发酵床系统的细菌丰富度,从而使垫料微生物群落结构多样性发生变化。由图 2 还看出,不同垫料间具有许多共同的条带,说明这些发酵床垫料存在一些共有的细菌类型,而且某些公共条带的强度也不相同,表明同一微生物物种在不同垫料样品的丰度上也存在一定的差异。

为了进一步揭示不同发酵床垫料间细菌 DNA 片段的差异,采用 UPGMA 对垫料样品的 DDGE 指纹图谱作相似性聚类分析,其结果见图 3。由图 3 可知,全锯木屑(S1)与 50%稻壳(S2)相似性最高,聚为一类,样品条带的相似性为 89%;其次为 50%菌糠(S3),相似性为 77%;全锯木屑(S1)与 50%稻草(S6)相似性最低,仅为 56%。根据电泳图谱中每个条带的信息,对各样品中的细菌多样性指数( $H'$ )、丰富度(S)等指

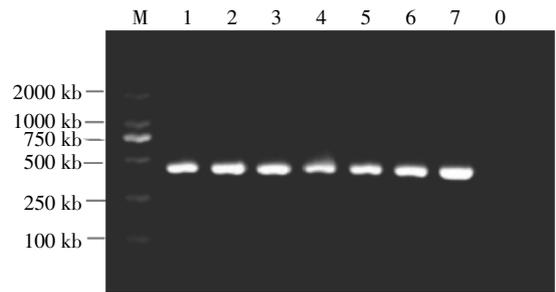


图 1 16S rDNA 基因 V6~V8 区 PCR 扩增结果  
Figure 1 PCR amplification results of V6~V8 regions in 16S rDNA gene

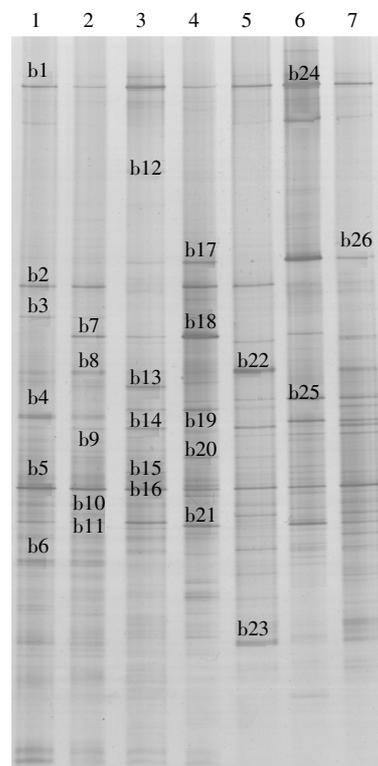


图 2 16S rDNA 基因 V6~V8 区 PCR-DGGE 指纹图谱  
Figure 2 PCR-DGGE and its pattern of V6~V8 region gene of 16S rDNA

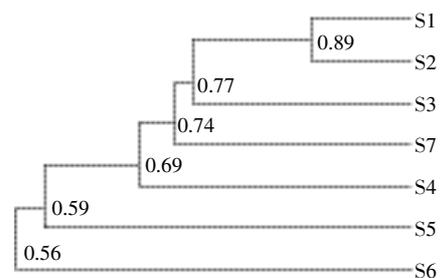


图 3 样品细菌群落的 UPGMA 聚类分析图  
Figure 3 UPGMA clustering analysis of bacterial population

标进行了综合分析,结果如表1所示。垫料样品细菌多样性指数( $H'$ )、丰富度( $S$ )均有所不同,其中酒糟垫料组(S7)细菌多样性指数最高,指数为1.525,丰富度也最大,稻草垫料组(S6)细菌多样性指数最低,指数为1.282。由此可见,垫料组成是影响发酵床垫料微生物构成的重要因素。

表1 不同垫料微生物群落基因型丰富度及多样性指标

Table 1 Shannon-Wiener index and richness of microbial community in different bedding litters

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
丰富度( $S$ )	28	28	29	25	24	23	32
Shannon-Wiener 指数( $H'$ )	1.415	1.449	1.488	1.343	1.293	1.282	1.525

### 2.3 垫料样品优势条带的序列比对与系统发育分析

细菌 16S rDNA V6~V8 区条带经 DGGE 分离,切割可分辨的部分优势条带进行序列测定,获得序列 26 条。将所测得的序列结果以 BLAST 程序进行相似性比较分析(表2),结果表明,所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 93%~100%之间。不同垫料组成的发酵床垫料细菌呈现较高的多样性,分布在 10 个属中,分别属于节杆菌属(*Arthrobacter*)、*Amaricoccus*、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、芽孢杆菌属(*Bacillales*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠杆菌属(*Escherichia*)、细杆菌属(*Microbacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*),其中肠杆菌属 5 株、节杆菌属 2 株、葡萄球菌属 2 株。优势菌相对不明显,并且含有大量的未培养微生物(10 株)。

## 3 讨论

发酵床含有丰富的有机质,是一个复杂的微生态环境。发酵床的核心是微生物对粪尿的发酵和转化,发酵床垫料是微生物分解粪便的环境载体,因此发酵床的发酵体系由微生物和垫料基质共同组成。垫料在提供碳氮源、调节床体基质的孔隙度(含氧量)、维持床体温湿度等方面影响微生物对粪尿的发酵分解过程<sup>[16-17]</sup>。除了受发酵床菌剂、生猪肠道微生物的影响外,发酵床的微生态环境与垫料基质的理化性质密切相关<sup>[15]</sup>。因此,垫料基质组成是影响发酵床垫料微生物群落的重要因素。

本研究对不同垫料基质的微生物区系进行了 PCR-DGGE 分析。结果表明,发酵床微生物组成种类

表2 测序克隆序列与其 GeneBank 最相似序列的比对结果

Table 2 Alignment of cloning sequence with its most-similar GeneBank sequence

条带 Sequenced clones	基因(库)序列号 GeneBank accession number	相似性 Similarity rate	基因数据库中 最相近的菌种名称 Source of the most similar GeneBank sequence
b1	KF475863.1	100%	<i>Staphylococcus</i> .sp.
b2	CP006698.1	99%	<i>Escherichia</i> sp.
b3	JX975437.1	99%	<i>Escherichia</i> sp.
b4	GQ488019.1	99%	Uncultured bacterium
b5	KF025992.1	99%	<i>Arthrobacter</i> .sp.
b6	JQ977336.1	93%	<i>Rhodococcus</i> .sp.
b7	JQ782897.1	99%	<i>Arthrobacter</i> .sp.
b8	HQ738388.1	99%	Uncultured bacterium
b9	JF957136.1	97%	<i>Amaricoccus</i> sp.
b10	HE576281.1	95%	Uncultured bacterium
b11	AB630830.1	96%	Uncultured bacterium
b12	AM749774.1	94%	<i>Bacillales</i> .sp.
b13	JF218312.1	99%	Uncultured bacterium
b14	JQ659962.1	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.
b15	GU389505.1	97%	Uncultured bacterium
b16	HQ877425.1	98%	<i>Actinomadura</i> sp.
b17	JQ425745.1	99%	Uncultured bacterium
b18	JQ975888.1	99%	Uncultured bacterium
b19	CP006698.1	99%	<i>Escherichia</i> sp.
b20	JX975437.1	99%	<i>Escherichia</i> sp.
b21	GQ488019.1	99%	Uncultured bacterium
b22	HG738867.1	99%	<i>Escherichia</i> sp.
b23	GQ847654.1	99%	Uncultured bacterium
b24	KF475863.1	99%	<i>Staphylococcus</i> sp.
b25	JN184753.1	99%	<i>Microbacterium</i> sp.
b26	HQ283402.1	99%	<i>Clostridium</i> .sp.

相对较多,呈现很高的微生物多样性,不同垫料的微生物组成也呈现出很大的差异。以常规的全木屑垫料基质为对照,稻壳和菌糠组的微生物区系与全锯木屑的相似性较高,而稻草垫料组的微生物组成与全锯木屑的相似性最低。酒糟垫料组细菌多样性指数( $H'$ )最高,丰富度( $S$ )也最大,稻草垫料组细菌多样性指数和丰富度最低。稻壳的透气性能优于锯木屑,其表面积大,含碳水化合物比例低于锯木屑<sup>[18]</sup>,由于发酵床功能菌群多为好氧性微生物,垫料本身透气性好,氧气输送顺畅,有益于功能菌群的活动和繁殖,有利于发酵床基质中粪尿的分解。因此,稻壳可以作为垫料基质与锯木屑配合使用,对发酵床微生物区系不会产生太大的影响。菌糠的主要成分是被食用菌利用后的植物残体,菌糠营养丰富,自身也分布着大量菌群,菌糠

破碎后,粒度小于锯木屑和稻壳,使得菌糠发酵床的孔隙度小于锯木屑发酵床<sup>[6]</sup>。菌糠作为垫料基质的这些优势,有利于功能菌的新陈代谢。菌糠也是一种优质的垫料基质来源。酒糟为酿酒业的副产物,含有丰富的氨基酸、维生素与微量元素,酒糟中的微生物构成呈现明显的多样性分布<sup>[19]</sup>,酒糟的土著菌群在一定程度上影响了发酵床的细菌多样性。稻草与锯木屑的微生物区系相似性最低,多样性指数和丰富度最低,可能与稻草在发酵过程中较易腐烂结块有关<sup>[20]</sup>。不同垫料的微生物多样性与垫料理化性质的相关性还需进一步研究。

DGGE 指纹图谱能直观地反映不同垫料基质中细菌组成成分的变化,是一种能够提供细菌群落结构变化趋势的研究方法,通过对 DGGE 条带进行切胶回收测序可了解细菌群落结构的组成<sup>[21]</sup>。本研究对 DGGE 图谱中的优势条带进行了序列分析。结果表明,垫料微生物中存在大量的未培养微生物,已知细菌分布在 10 个种属里。肠杆菌为动物肠道中的常居菌,0~20 cm 的垫料直接与粪便接触从而导致垫料中的肠道细菌含量较高且丰富,肠杆菌属的一些菌株也可促进堆肥发酵<sup>[22]</sup>。发酵床运行的过程中,垫料微生物的活动类似于好氧堆肥,而在好氧堆肥过程中,假单胞菌属(*Pseudomonas*)可应用于纤维素的降解<sup>[23]</sup>,细杆菌属(*Microbacterium*)能加快有机质的分解<sup>[22]</sup>,葡萄球菌属(*Staphylococcus*)对堆肥过程中的脂肪类有机物具有降解能力<sup>[24]</sup>。节杆菌属(*Arthrobacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)在垫料基质中检出,与菌株参与垫料中的氮素转化有关<sup>[25-27]</sup>。梭菌属的细菌广泛分布于土壤、污泥及动物肠道中,郭艳等<sup>[28]</sup>在研究猪粪堆体中发现,梭菌属在堆肥的升温期中占有绝对优势,对堆肥物料降解过程起重要作用。从优势条带的结果也可看出,发酵菌剂中的芽孢杆菌属(*Bacillales*)也有检出,但并不是垫料微生物中的优势菌群,说明发酵床菌剂只是在发酵床初期起到先导菌启动发酵的作用,在中后期并不能成为优势菌群,发酵床垫料正常运转更多的是依靠肠道微生物和垫料本身的土著菌种进行调节。这与毕泗伟等<sup>[15]</sup>研究的结果一致。发酵床技术还需结合动物肠道、应用环境等因素选择高效的发酵菌株,以达到有效的人为调控目的。

## 4 结论

(1)垫料组成是影响发酵床垫料微生物构成的重

要因素,稻壳、菌糠作为垫料可部分替代锯木屑,而对发酵床垫料的微生物区系影响较小。

(2)垫料基质中优势菌群主要包括:节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)、*Amaricoccus* sp.、马杜拉放线菌属(*Actinomadura* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillales* sp.)、梭菌属(*Clostridium* sp.)、肠杆菌属(*Escherichia* sp.)、细杆菌属(*Microbacterium* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)。不同垫料的微生物多样性与垫料理化性质的相关性还需进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Morrison R S, Johnston L J, Hilbrands A M. The behaviour, welfare, growth performance and meat quality of pigs housed in a deep-litter, large group housing system compared to a conventional confinement system[J]. *Applied Animal Behavior Science*, 2007, 103(1): 12-24.
- [2] Gadd J. Tunnel housing of pigs in livestock environment IV [C]. Fourth International Symposium. Michigan: American Society of Agricultural Engineers, 1993: 1040-1048.
- [3] Correa E K, Perdomo C C, Acondino J F, et al. Environmental condition and performance in growing and finishing swine raised under different types of litter[J]. *Brazilian Journal of Animal Science*, 2000, 29: 2072-2079.
- [4] Gentry J Q, McGlone J J, Miller M F, et al. Environmental effects on pig performance, meat quality, and muscle characteristics[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82: 209-217.
- [5] 朱 洪, 常志州, 王世梅, 等. 基于畜禽废弃物管理的发酵床技术研究: I 发酵床剖面特征研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 754-758.  
ZHU Hong, CHANG Zhi-zhou, WANG Shi-mei, et al. Deep litter system for management of livestock manure: I Profile characteristics of litter in deep-litter system[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 754-758.
- [6] 盛清凯, 王 可, 马跃宁, 等. 菌渣垫料堆积发酵试验[J]. *山东农业科学*, 2011, 11: 67-68, 72.  
SHENG Qing-kai, WANG Ke, MA Yue-ning, et al. Research on fermentation of litter made of mushroom residue[J]. *Shandong Agricultural Science*, 2011, 11: 67-68, 72.
- [7] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317-322.
- [8] DeJournett T D, Arnold W A, Lapara T M. The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35(3): 648-659.
- [9] 刘绍雄, 王明月, 王 娟, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性分析[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(7): 1405-1412.  
LIU Shao-xiong, WANG Ming-yue, WANG Juan, et al. Analyzing soil microbial community structure diversity from Jianhu wetland lakeside

- zone using PCR-DGGE technique[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(7):1405-1412.
- [10] 石鹏君, 柏映国, 袁铁铮, 等. 应用 rpoB 和 16S rDNA 基因的变性梯度凝胶电泳技术对山羊瘤胃细菌多样性的研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2):285-289.
- SHI Peng-jun, BAI Ying-guo, YUAN Tie-zheng, et al. Use of rpoB and 16S rDNA genes to analyze rumen bacterial diversity of goat using PCR and DGGE[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2):285-289.
- [11] Pluske J R, Durmic Z, Payne H G, et al. Microbial diversity in the large intestine of pigs born and reared in different environments[J]. *Live Stock Science*, 2007, 108(1-3):113-116.
- [12] 刘 佳, 李 婉, 许修宏, 等. 接种纤维素降解菌对牛粪堆肥微生物群落的影响[J]. *环境科学*, 2011, 32(10):3073-3080.
- LIU Jia, LI Wan, XU Xiu-hong, et al. Effect of cellulose-decomposing strain on microbial community of cow manure compost[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(10):3073-3080.
- [13] 刘 波, 郑雪芳, 朱昌雄, 等. 脂肪酸生物标记法研究零排放猪舍基质垫层微生物群落多样性[J]. *生态学报*, 2008, 28(11):5488-5498.
- LIU Bo, ZHENG Xue-fang, ZHU Chang-xiong, et al. The diversity of PLFAs biomarkers for the microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(11):5488-5498.
- [14] Bassam B J, Caetano A G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196(1):80-83.
- [15] 毕泗伟, 吴祖芳, 虞耀土. 16S rDNA 基因文库技术分析发酵床细菌群落的多样性[J]. *宁波大学学报*, 2013, 26(1):18-22.
- BI Si-wei, WU Zu-fang, YU Yao-tu. The bacteria diversity of fermentation bed in pig-farming by 16S rDNA gene clone library analysis[J]. *Journal of Ningbo University*, 2013, 26(1):18-22.
- [16] 刘克锋, 刘悦秋, 雷增谱, 等. 不同微生物处理对猪粪堆肥质量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(3):311-314.
- LIU Ke-feng, LIU Yue-qiu, LEI Zeng-pu, et al. Effects of different microorganism consortiums on quality of composting pig-dung[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(3):311-314.
- [17] 秦 竹, 周忠凯, 顾洪如, 等. 发酵床生猪养殖中菌种与垫料的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(30):14771-14774.
- QIN Zhu, ZHOU Zhong-kai, GU Hong-ru, et al. Advances in the strains and beddings of deep-litters system for swine breeding[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2012, 40(30):14771-14774.
- [18] Garlipp F, Hessel E F, Weghe F A. Characteristics of gas generation ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) from horse manure added to different bedding materials used in deep litter bedding systems[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2011, 31(7):383-395.
- [19] 张文学, 乔宗伟, 胡 承, 等. PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析[J]. *四川大学学报*, 2005, 37(5):82-87.
- ZHANG Wen-xue, QIAO Zong-wei, HU Cheng, et al. Analysis of bacterial community in fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits by PCR technique[J]. *Journal of Sichuan University*, 2005, 37(5):82-87.
- [20] 杨国义, 夏钟文, 李芳柏, 等. 不同填充料对猪粪堆肥腐熟过程的影响[J]. *土壤肥料*, 2003(3):29-33.
- YANG Guo-yi, XIA Zhong-wen, LI Fang-bai, et al. Effect of different bulking agents on the maturity of pig manure composting[J]. *Soil and Fertilizer Sciences*, 2003(3):29-33.
- [21] Sun H Y, Deng S P, Ruan W R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10):5868-5874.
- [22] 徐庆贤, 官雪芳, 林碧芬, 等. 几株猪粪堆肥发酵菌对堆肥发酵的促进作用[J]. *生态与农村环境学报*, 2013, 29(2):253-259.
- XU Qing-xian, GUAN Xue-fang, LIN Bi-fen, et al. Effects of strains of zymogen on composting of pig manure[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2013, 29(2):253-259.
- [23] 尚晓瑛, 程旭艳, 霍培书, 等. 1 株堆肥耐低温纤维素降解菌的筛选、鉴定及生长特性的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(5):558-562.
- SHANG Xiao-ying, CHENG Xu-yan, HUO Pei-shu, et al. Screening, identification and growth cellulose-decomposing bacterium of a cold-adapted for composting[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(5):558-562.
- [24] 王立群, 彭科峰, 张传富, 等. 鸡粪好氧堆肥中温期效应细菌及放线菌的筛选及属别鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2007, 38(6):775-779.
- WANG Li-qun, PENG Ke-feng, ZHANG Chuan-fu, et al. The screening and genus identification of bacteria and actinomycete in intermediate temperature phase in aerobic composting of chicken manure[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2007, 38(6):775-779.
- [25] 栾 敏, 胡 江, 杨兴明, 等. 土壤叶杆菌和红球菌菌株的分离鉴定及其自生固氮作用[J]. *土壤学报*, 2009, 46(3):574-576.
- LUAN Min, HU Jiang, YANG Xing-ming, et al. Isolation and identification of *Phyllobacterium* and *Rhodococcus* strains from soils and their free-living nitrogen-fixation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(3):574-576.
- [26] 江 月, 周建刚, 邹煜平, 等. 一种有固氮能力的节杆菌菌株的分离和初步鉴定[J]. *华中师范大学学报*, 2004, 38(2):210-214.
- JIANG Yue, ZHOU Jian-gang, ZOU Yu-ping, et al. Isolation and primary identification of a new nitrogen-fixation *Arthrobacter* strain[J]. *Journal of Central China Normal University*, 2004, 38(2):210-214.
- [27] 葛 灿, 石竹南, 颜志民, 等. 土壤中放线菌参与反硝化可能性研究[J]. *土壤学报*, 2004, 4(1):108-112.
- GE Can, SHI Zhu-nan, YAN Zhi-min, et al. Participant possibility of actinomycetes in soil denitrification[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 4(1):108-112.
- [28] 郭 艳, 张进良, 邓昌彦, 等. 猪粪堆肥升温期细菌分子生态学研究[J]. *河南农业科学*, 2010, 9:74-82.
- GUO Yan, ZHANG Jin-liang, DENG Chang-yan, et al. Study on the molecular ecology of bacterium in swine manure composting during the heating phase[J]. *Journal of Henan Agriculture Science*, 2010, 9:74-82.