

## 宁夏地区春季奶牛场牛舍土壤细菌群落特征

杨双鸣, 任文义, 苟妍, 张力莉, 徐晓锋\*

宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

杨双鸣, 任文义, 苟妍, 张力莉, 徐晓锋. 宁夏地区春季奶牛场牛舍土壤细菌群落特征[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4686-4698

Yang Shuangming, Ren Wenyi, Gou Yan, Zhang Lili, Xu Xiaofeng. Characteristics of soil bacterial communities in different cowsheds in a dairy farm of Ningxia in spring[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4686-4698

**摘要:**【背景】现代规模化生产模式下,牛舍环境管理是影响奶牛高效健康生产的重要因素。【目的】探讨牛场不同牛舍土壤细菌群落特征,为奶牛健康生产提供理论依据。【方法】采集宁夏某规模化奶牛场的哺乳犊牛岛、断奶犊牛舍、育成牛舍、低产泌乳牛舍、高产头胎泌乳牛舍、高产经产泌乳牛舍、干奶牛舍和病牛舍这8个不同牛舍的土样,每个牛舍6个重复,共48份土样。利用16S rRNA基因扩增子测序分析细菌群落结构与多样性,并对细菌群落的功能进行预测。【结果】不同牛舍土样细菌群落组成存在差异,并且8个牛舍中高产头胎泌乳牛舍土样的细菌群落多样性最高。哺乳犊牛岛土壤与其他牛舍土壤细菌群落在门水平上差异较大;泌乳期牛舍土样之间的细菌群落结构相似度较高。在门的水平上,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)是这8个牛舍土样共有的优势菌门。在属的水平上,嗜盐碱的盐单胞菌属(*Halomonas*)、具有潜在降解特性的*Fermentimonas*和栖海面菌属(*Aequorivita*)及致病菌的鸟杆菌属(*Ornithobacterium*)是犊牛期牛舍土样的优势菌属;嗜盐碱的*Truepera*是育成牛舍土样的优势菌属;致病菌的不动杆菌属(*Acinetobacter*)和*Parapedobacter*、耐药菌的*Pedobacter*是泌乳期牛舍土样的优势菌属。【结论】致病菌和参与硝酸盐呼吸的细菌主要分布在哺乳犊牛岛,嗜盐碱菌主要分布在断奶犊牛舍和育成牛舍,产甲烷的细菌主要分布在高产头胎泌乳牛舍。本研究分析了不同牛舍土壤细菌群落多样性,为奶牛健康生产提供理论依据。

**关键词:** 16S rRNA 基因扩增子测序; 牛舍土壤; 细菌群落

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发项目(20190410110)

Supported by: Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (20190410110)

\*Corresponding author: E-mail: xuxiaofengnd@126.com

Received: 2022-04-18; Accepted: 2022-06-25; Published online: 2022-08-09

## Characteristics of soil bacterial communities in different cowsheds in a dairy farm of Ningxia in spring

YANG Shuangming, REN Wenyi, GOU Yan, ZHANG Lili, XU Xiaofeng\*

School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

**Abstract:** [Background] Amid large-scale production, the environmental management of cowshed is the key to the milk production of dairy cows. [Objective] To explore the characteristics of soil bacterial communities in different cowsheds and thereby lay a theoretical basis for healthy production of dairy cows. [Methods] Soil samples were collected from 8 different cowsheds: new calf born area (NCA), weaned calf cowshed area (WCA), rearing heifers cowshed area (RCA), low-yield lactating cows cowshed area (LCA), high-yield first-calf lactating cows cowshed area (HFCA), high-yield multiparity lactating cows cowshed area (HMCA), dry cows cowshed area (DCA), and sick cows cowshed area (SCA), with 6 replicates from each cowshed and a total of 48 samples. Through the sequencing of 16S rRNA gene amplicons, the structures and diversities of the bacterial communities were analyzed and the functions of different communities were predicted. [Results] The bacterial community composition of soil samples was different among the cowsheds. Among the 8 cowsheds, HFCA boasted the highest bacterial community diversity, and NCA showed huge difference in the bacterial community of soil at phylum level from other cowsheds. Moreover, LCA, HFCA, and HMCA respectively showed high similarity in the community structure among soil samples. At the phylum level, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes* dominated all the soil samples. At the genus level, the haloalkaliphilic *Halomonas*, *Fermentimonas* and *Aequorivita* with potential degrading ability, and the pathogenic *Ornithobacterium* were dominant in the soil samples collected from cowsheds for calves. Haloalkaliphilic *Truepera* dominated RCA, and the pathogenic *Acinetobacter* and *Parapedobacter*, and the drug-resistant *Pedobacter* were the dominant genera in the soil samples collected from cowsheds for lactating cows. [Conclusion] Pathogenic bacteria and bacteria involved in nitrate respiration are mainly distributed in LCA and haloalkaliphilic bacteria are mainly found in WCA and RCA. Methanogenic bacteria are mainly discovered in HFCA. This study analyzed the diversity of soil bacterial community in different cowsheds to lay a theoretical basis for the healthy production of dairy cows.

**Keywords:** 16S rRNA gene amplicon sequencing; cowshed soil; bacterial community

奶牛养殖业逐渐发展形成了高度规模化、集约化、区域化的养殖模式, 这种模式和传统的养殖模式相比, 虽然提高了经济效益, 但是也限制了养殖动物的活动范围, 导致养殖场内部牛舍土壤容易遭到粪尿的污染, 而土壤是一个生态系统<sup>[1]</sup>, 畜禽的粪便中携带的大量病原微生物及粪便的理化性质都会影响土壤微生物

群落发生改变<sup>[2-3]</sup>, 不及时对这些粪污进行处理, 将会对畜禽健康和养殖场环境造成巨大的危害。粪污中含有大量产甲烷菌及其他微生物群落, 这些微生物影响了全球温室气体减排。刘羽等<sup>[4]</sup>对奶牛运动场温室气体的排放通量监测显示, 通过粪便发酵和奶牛生理活动产生的CH<sub>4</sub>和CO<sub>2</sub>的排放量占温室气体的91%。Leytem

等<sup>[5]</sup>研究表明, 每头奶牛通过贡献粪便量每年将产生大约 5.2 t 的 CO<sub>2</sub>。而 Witkowska 等<sup>[6]</sup>研究发现, 通过隔板使畜禽与粪便减少接触, 可改善动物福利, 减少对环境温室气体排放。

奶牛乳房炎是规模化奶牛场里常见的临床疾病, 是由病原微生物感染所引起的奶牛乳腺实质或间质的炎症<sup>[7]</sup>, 这种疾病造成奶牛奶产量下降, 给奶业生产带来很大的损失。据报道, 可引起乳房炎的致病菌已有 80 多种, 畜禽粪便可作为环境中病原微生物污染的重要潜在来源<sup>[8]</sup>。在环境卫生较差的奶牛场中, 奶牛乳头接近地面, 使致病菌容易通过乳头侵入乳池而引发乳房炎<sup>[8]</sup>。张雯等<sup>[9]</sup>对银川地区奶牛粪便中分离的条件致病菌的种类分析发现, 分离出的多是大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等与奶牛乳房炎相关的病原菌。伍清林等<sup>[10]</sup>研究表明, 牛舍空气中的细菌数量越多, 奶牛乳房炎的发生率越高。闫艳华等<sup>[11]</sup>在奶牛乳房及挤奶设备附近检测出多种丰富度较高的机会致病菌属。Wu 等<sup>[12]</sup>在可回收粪肥固体垫料上饲养的奶牛牛奶中发现了与乳腺炎有关的致病菌, 可回收粪肥固体垫料可能对奶牛的乳房健康构成威胁。

本研究通过采集某规模化奶牛场的不同牛舍土壤为材料, 利用 16S rRNA 基因扩增子测序, 分析不同牛舍土样细菌群落的多样性, 探讨环境致病菌及其他微生物群落在牛舍土壤之间的分布, 为奶牛健康生产和环境保护提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本的采集与处理

2020 年 5 月, 在宁夏某规模化奶牛场采集牛舍不同位置且距地表 5–10 cm 深度的土样进行混合至 100 g, 采集 8 个不同牛舍的土样共 48 份, 哺乳犊牛岛(new calf born area, NCA)、

断奶犊牛舍(weaned calf cowshed area, WCA)、育成牛舍(rearing heifers cowshed area, RCA)、低产泌乳牛舍(low-yield lactating cow cowshed area, LCA)、高产头胎泌乳牛舍(high-yield first-calf lactating cows cowshed area, HFCA)、高产经产泌乳牛舍(high-yield multiparity lactating cows cowshed area, HMCA)、干奶牛舍(dry cows cowshed area, DCA)和病牛舍(sick cows cowshed area, SCA) 8 个牛舍的土样各 6 份。用灭菌袋将土样封装, 并在 -20 °C 条件下冻存, 后将所有土样送至诺禾致源生物信息科技有限公司进行 16S rRNA 基因扩增子测序。

### 1.2 主要试剂和仪器

Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, New England Biolabs 公司; 胶回收试剂盒, Qiagen 公司; TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 建库试剂盒, Illumina 公司。核酸蛋白浓度测定仪, Eppendorf 公司; 梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

### 1.3 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

采用 CTAB 方法对样本的基因组 DNA 进行提取, 提取出的 DNA 纯度和浓度利用琼脂糖凝胶电泳技术和核酸蛋白浓度测定仪检测, 随后取适量的样本 DNA 于离心管中, 使用无菌水稀释样本至 1 ng/μL。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据测序区域的选择, 使用带 barcode 的特异引物 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCA G-3')和 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAA T-3')对 16S rRNA 基因的 V3+V4 区片段进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系(30 μL): 2×Phusion Master Mix 15 μL, 特异引物(2 μmol/L)共 3 μL, 样本 DNA 10 μL, 无菌水 2 μL。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

### 1.4 PCR 产物的混样和纯化

根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2%琼脂糖凝胶进行电泳检测 PCR 产物,割胶回收目标条带。对目的条带使用胶回收试剂盒回收产物。

### 1.5 文库构建和上机测序

使用 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 建库试剂盒构建文库,构建好的文库经过 Qubit 定量和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)定量合格后,使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

### 1.6 数据分析处理

利用 UPARSE 软件 V 7.0.1001 对所有样本的全部有效数据(effective tags)进行聚类,默认以 97%的一致性(identity)将序列聚类成为分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU);使用 QIIME 软件 V 1.9.1 计算 observed-OTU、Chao1、Shannon、Simpson、ACE 和 Goods-coverage 指数,计算 UniFrac 距离、构建 UPGMA 样本聚类树。使用 R 软件 V 2.15.3 绘制稀释曲线和主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)图,进行  $\beta$  多样性指数组间差异分析。FAPROTAX 是原核生物环境功能数据库,基于已发表文献证据,将细菌及古菌在环境中的生态作用进行归类,再汇总整理为 FAPROTAX 数据库,基于扩增子物种注释结果,绘制细菌群落功能组成丰度热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 OTU 分析

本实验用采集的 48 份土壤中所提取的 DNA 样本进行测序,共得到 7 736 个 OTU。如表 1 所示,OTU 数目在犊牛期牛舍土样(NCA、WCA)、RCA、DCA 各组 and 泌乳期的 HMCA 组之间差异不显著( $P>0.05$ ),而 HFCA 组只和 SCA

组之间的 OTU 数目不显著( $P>0.05$ ),与其他牛舍之间的 OTU 数目均差异显著( $P<0.05$ )。如图 1 所示,各牛舍土样共有的 OTU 数目为 610,每个牛舍土样均含独有 OTU,其中所有土样中 HFCA 组独有 OTU 数量最多为 696 个,LCA 组独有 OTU 最少为 197 个,表明不同群体牛舍的细菌组成存在一定差异。

表 1 牛舍土样细菌群落组成 OTU 数目

Table 1 OTU number of bacterial community composition in barn soil

Group	OTU number
NCA	1 306.17±103.96d
WCA	1 283.50±257.37d
RCA	1 281.83±157.13d
DCA	1 515.83±237.85bcd
LCA	1 636.33±213.17bc
HFCA	1 945.00±297.35a
HMCA	1 494.00±186.65cd
SCA	1 768.50±247.50ab

注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicated significant difference ( $P<0.05$ ).

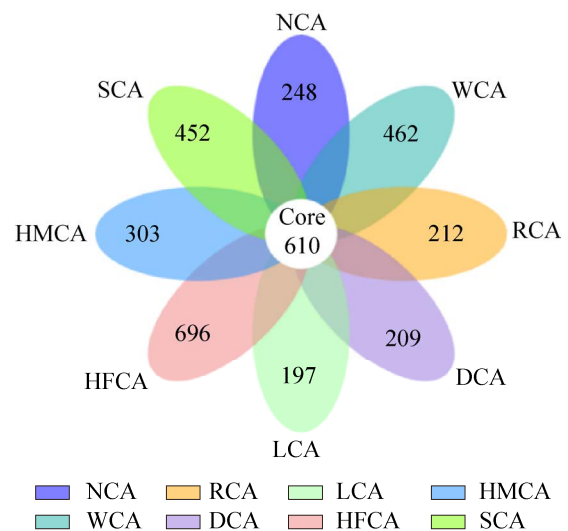


图 1 牛舍土样细菌群落组成 OTU 交集韦恩图

Figure 1 OTU intersection Venn diagram of soil bacteria community composition in cowshed.

## 2.2 稀释曲线

稀释曲线可以反映测序数据量的合理性和样本中物种的丰富度。由图 2 可知,随着 OTU 等级的增加,稀释曲线均趋平坦,表明各牛舍土样的均匀度均逐渐提高,测序深度足以覆盖样品中 97% 的微生物菌种,可以进行下一步分析。

## 2.3 不同牛舍土样细菌群落多样性分析

如表 2 所示,各牛舍土样细菌群落的 Goods\_coverage 指数(物种覆盖率)都接近 100%,通过这个数据也进一步证明了本样品序列被检测出来的完整性,表明在此水平上的测

序结果完全可以反映各牛舍土样中细菌群落组成状况。HFCA 组的 Shannon 指数最高,且与 HMCA、DCA、WCA、NCA 和 RCA 各组的细菌多样性差异显著( $P < 0.05$ ),表明 HFCA 组的细菌群落多样性高于其他牛舍;WCA 组的 Shannon 指数显著低于其他组( $P < 0.05$ ),表明 WCA 组的细菌群落多样性较低。

HFCA 组和 SCA 组的 Chao1 指数和 ACE 指数较高,均与 LCA 组的细菌群落丰富度无显著差异( $P > 0.05$ ),与其他牛舍土样比较均显著增加( $P < 0.05$ ),表明这两个牛舍的细菌群落丰富度与 LCA 组相似,且均高于其他牛舍。

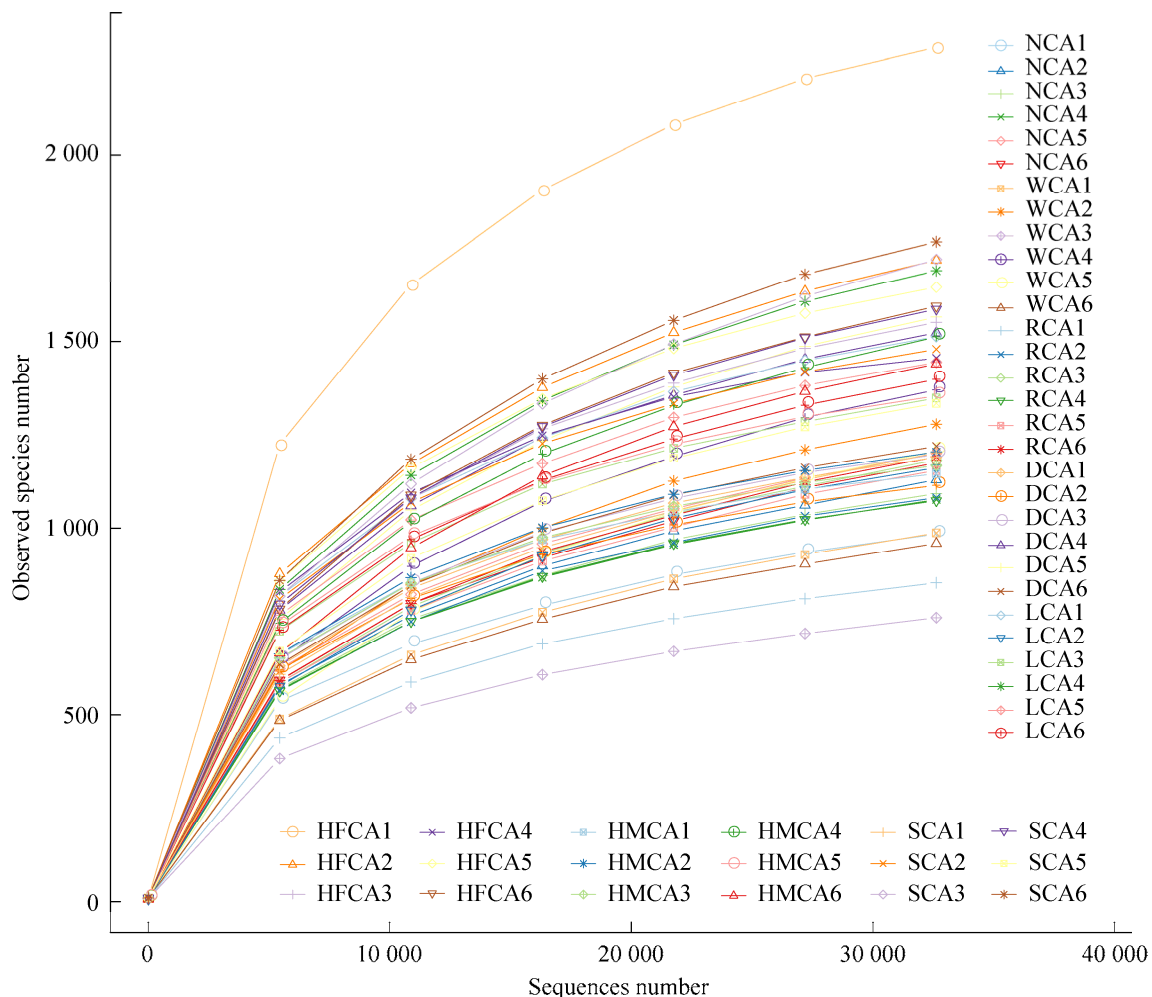


图 2 48 份土壤样品的稀释曲线

Figure 2 Dilution curves of 48 soil samples.

表 2 牛舍土样细菌群落  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Alpha diversity index of bacterial community in barn soil

Group	Shannon index	Simpson index	Chao1 index	ACE index	Goods_coverage
NCA	7.210±0.110c	0.979±0.004	1 443.493±131.876bc	1 453.598±148.650bc	0.990±0.002
WCA	6.382±0.490d	0.952±0.026	1 375.357±271.644bc	1 419.345±296.482c	0.990±0.002
RCA	7.073±0.504c	0.977±0.015	1 343.738±263.771c	1 381.306±226.792c	0.991±0.002
DCA	7.547±0.245bc	0.982±0.007	1 486.538±236.769bc	1 549.537±253.025bc	0.991±0.002
LCA	7.553±0.777abc	0.976±0.026	1 657.829±211.581ab	1 722.396±216.492ab	0.989±0.002
HFCA	8.143±0.555a	0.987±0.007	1 893.748±322.080a	1 983.892±334.398a	0.989±0.003
HMCA	7.240±0.710c	0.963±0.047	1 477.661±185.017bc	1 532.674±232.927bc	0.991±0.002
SCA	7.965±0.295ab	0.989±0.005	1 818.893±285.476a	1 888.005±287.250a	0.988±0.003

注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicated significant difference ( $P<0.05$ ).

## 2.4 $\beta$ 多样性分析

### 2.4.1 主坐标分析(PCoA)

如图 3 所示, 非泌乳期牛舍土样每组内的 6 个样本均分布聚集, 组内样本间距离近, 并

且这 5 组样本之间离散清晰, 表明这 5 个牛舍土样样品的组内差异小, 组内样本群落结构相似度均高于组间样本; 而泌乳期牛舍土样 (LCA、HFCA、HMCA)中每组内的 6 个样本较

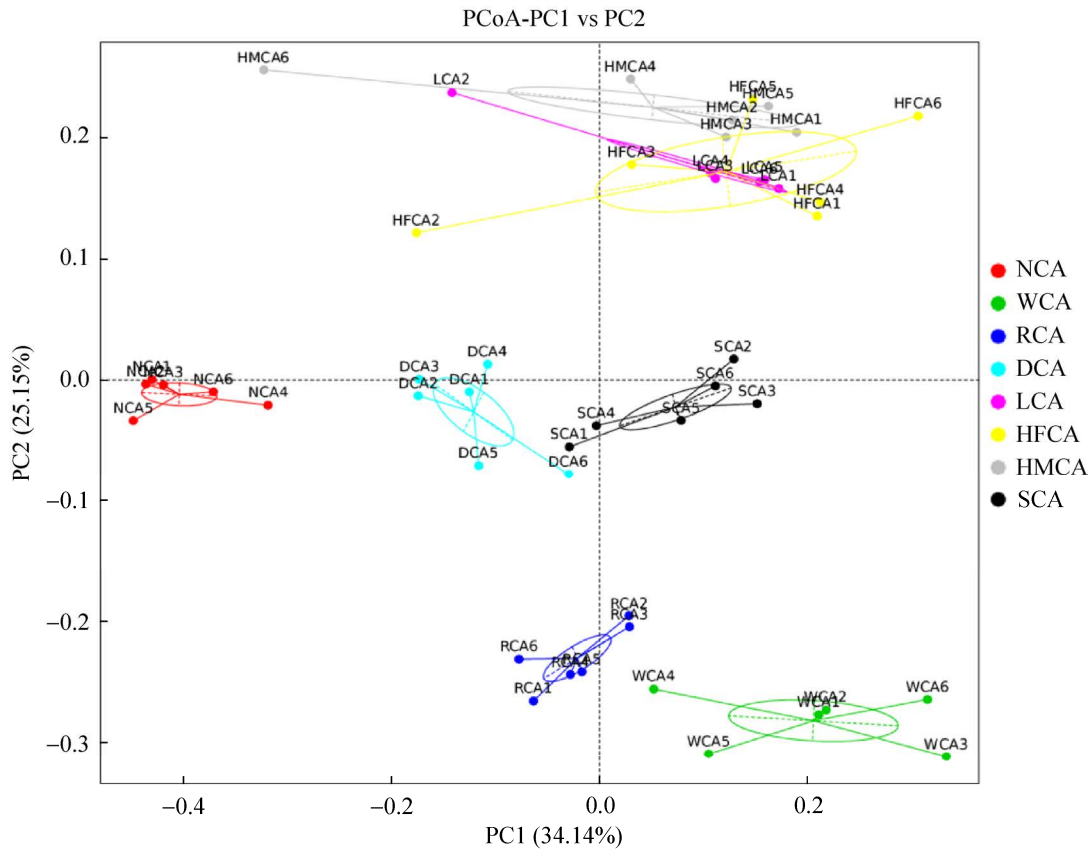


图 3 牛舍土样细菌群落基于 Weighted UniFrac 距离的 PCoA

Figure 3 PCoA of soil bacterial community in barn based on Weighted UniFrac distance.

为分散, 并且这 3 组样本之间距离较近, 表明 3 组泌乳期牛舍之间的土样细菌群落结构相似度较高。

#### 2.4.2 UPGMA 聚类树

以 weighted UniFrac 距离矩阵作 UPGMA 聚类分析, 8 个牛舍土样的细菌群落可以被聚成 3 类, 第 1 类包括 NCA 组, 第 2 类包括泌乳期牛舍 3 组土样(LCA、HFCA、HMCA), 第 3 类包括 SCA、DCA、RCA 和 WCA 组, 其中, NCA 组与其他 8 个牛舍土样细菌门水平差异性较大, 相似性较小。而 SCA 组和 DCA 组、HMCA 组和 LCA 组之间距离较近(图 4), 表明 SCA 组和 DCA 组、HMCA 组和 LCA 组之间细菌群落在门水平上具有很高的相似性。

### 2.5 不同牛舍土样细菌组成和群落结构分析

#### 2.5.1 牛舍土壤细菌门水平

根据物种注释结果, 选取 8 个牛舍土样在门水平上相对丰度含量前 10 的菌门进行柱状堆积图展示(图 5), 图中为单个微生物在不同样本中的分布趋势, 在门(phylum)水平上, 各牛舍土样的优势菌门为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、

变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。其中, 拟杆菌门在 NCA、DCA、HMCA 组中的相对丰富度最高, 分别为 43%、24%和 27%; 变形菌门在 WCA 组和 RCA 组中相对丰富度最高, 分别为 42%和 27%; 放线菌门在 SCA 组中相对丰富度最高为 30%; 厚壁菌门在 HFCA 组和 LCA 组中相对丰富度最高, 分别为 26%和 27%。

#### 2.5.2 牛舍土壤细菌属水平

根据物种注释结果, 选取 8 个牛舍土样在属水平上相对丰度含量前 10 的菌属进行柱状堆积图展示(图 6), 图中单个微生物在不同样本中的分布趋势, 在属(genus)水平上, 不同牛舍土样中优势菌属均不太相同, 其中在犊牛期牛舍土样(NCA、WCA)中共有的优势菌属为 *Fermentimonas*, 分别占 7.55%和 3.83%; NCA 组中独有的优势菌属为鸟杆菌属(*Ornithobacterium*), 占 8.81%, 栖海面菌属(*Aequorivita*)占 6.77%, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)占 6.23%, WCA 组中优势菌属还有盐单胞菌属(*Halomonas*), 占 31.40%; RCA 组的优势菌属有盐单胞菌属 (10.53%)、*Fermentimonas* (5.91%)和 *Truepera*

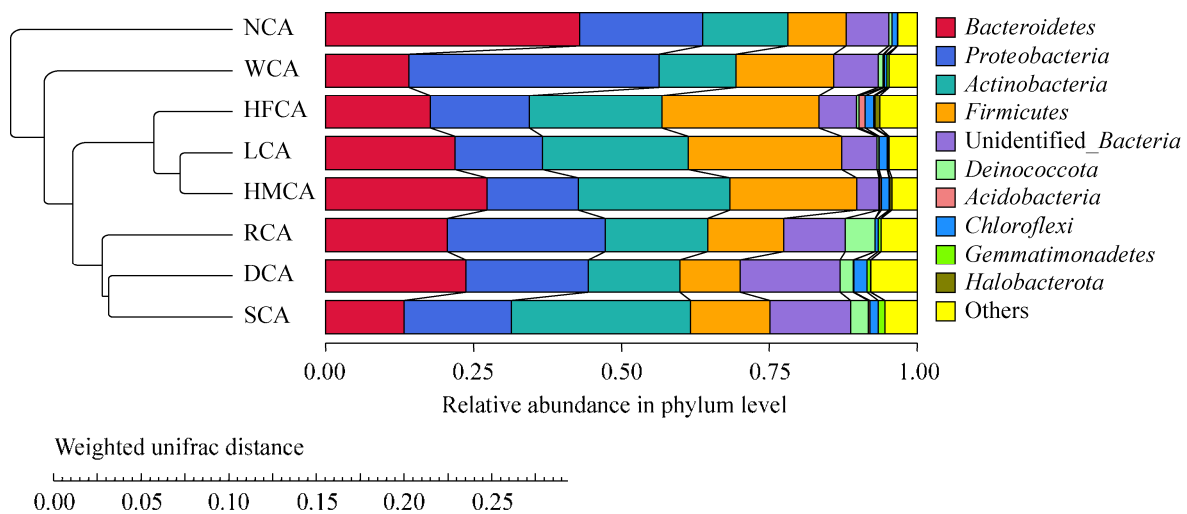


图 4 牛舍土样细菌群落基于 weighted UniFrac 距离的 UPGMA 聚类树

Figure 4 UPGMA cluster tree based on weighted UniFrac distance of soil bacterial community in cow barn.

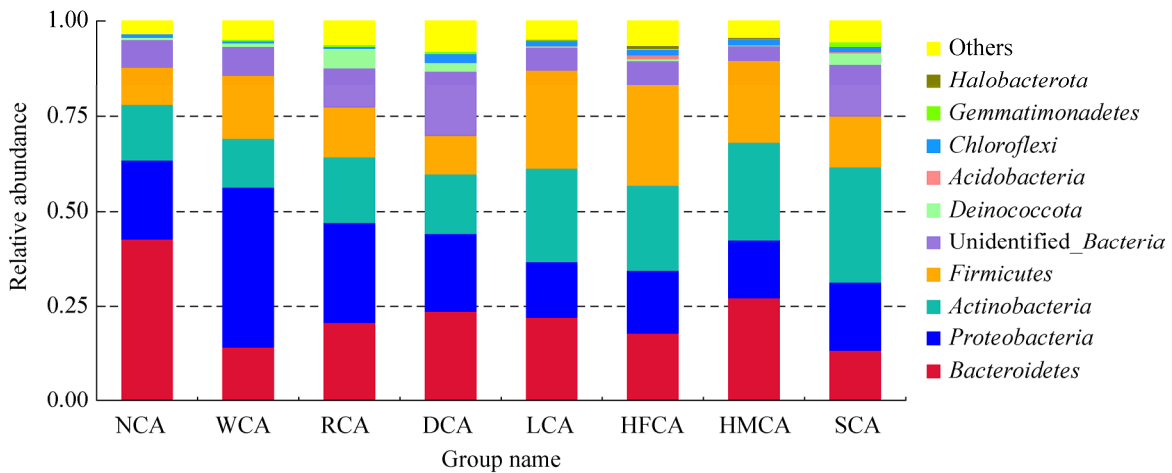


图 5 门水平上的物种相对丰度图  
Figure 5 Relative abundance of species at phylum level.

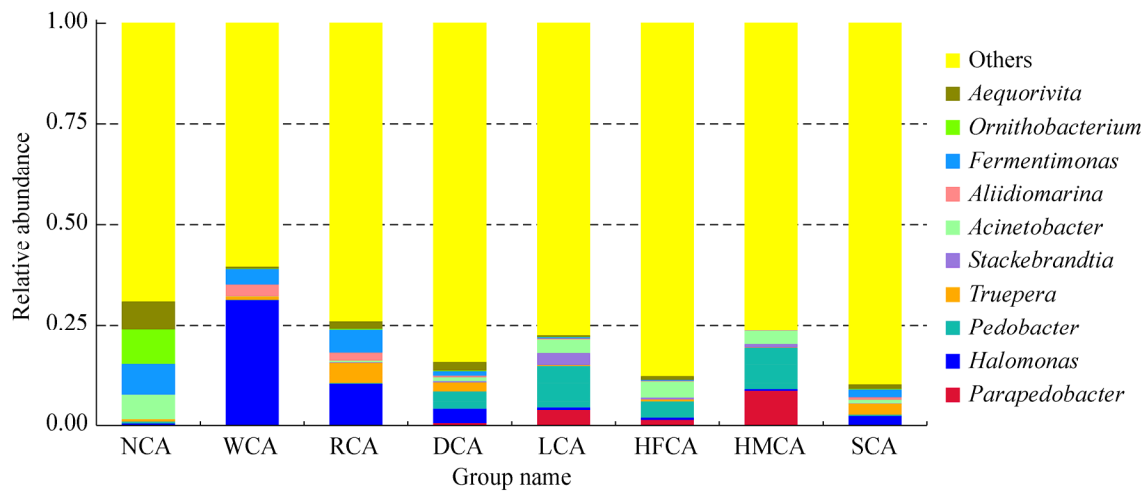


图 6 属水平上的物种相对丰度图  
Figure 6 Relative abundance of species at the genus level.

(5.03%); DCA 组的优势菌属为 *Pedobacter*、盐单胞菌属和 *Truepera*, 分别占 4.29%、3.75%、2.22%; 3 个泌乳期牛舍土样(LCA、HFCA、HMCA) 的优势菌属均为 *Pedobacter*、*Parapedobacter* 和不动杆菌属, 其中不动杆菌属在 HFCA 组中丰度较高 (3.97%), *Parapedobacter* 和 *Pedobacter* 在 HMCA 组中丰度较高, 分别为 8.80%和 10.27%; SCA 组中 *Truepera*、盐单胞菌属和 *Fermentimonas* 相对丰度较高。

### 2.5.3 菌群功能组成丰度分析

如图 7 所示, 处于犊牛期的两个牛舍土样 (NCA、WCA)细菌菌群功能组成差异较大,NCA 组中关于硝酸盐呼吸作用、人类病原体肺炎感染及污染物塑料降解等功能的细菌菌群丰富度较高, 而 WCA 组中碳氢化合物降解、化能异养等功能的细菌菌群丰富度较高; RCA 组中甲烷营养、延胡索酸呼吸、人类病原体腹泻及人类肠胃病原体等功能的细菌菌群丰富度较高; DCA 组中有关哺乳动物肠道等功能的细菌



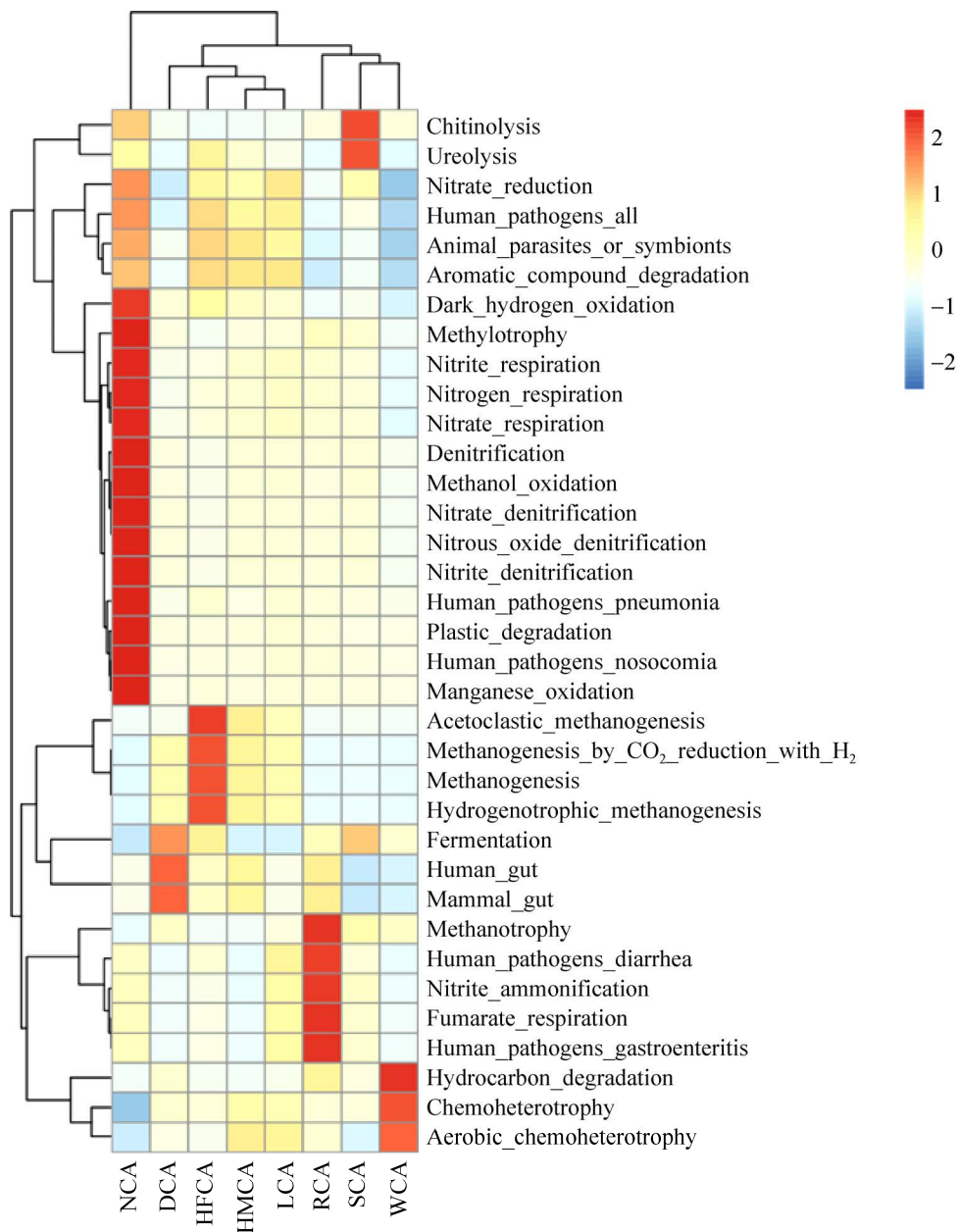


图7 牛舍土样细菌群落功能组成丰度热图

Figure 7 Heat map of functional composition abundance of soil bacterial community in cowshed.

菌群丰富度较高；在泌乳期的牛舍土样中 HFCA 组的细菌菌群在甲烷生成等方面的丰富度较高，而相比于 HFCA 组，LCA 和 HMCA 这两组的细菌菌群功能组成差异不明显，菌群丰度都较低。SCA 组的细菌菌群在尿素溶解等方面的丰富度较高。

### 3 讨论

高产头胎泌乳牛舍土壤的细菌群落的多样性和丰富度显著大于其他牛舍土壤细菌群落，夏季各牛舍土壤细菌群落结构存在明显差异，这与杨思瑞等<sup>[13]</sup>分析秋季各牛舍土壤细菌群落

的物种多样性没有差异的结果不同。土壤微生物的物种多样性与环境温度有关, 夏季温度较高, 到了秋季温度骤降, 在较高温度时, 土壤细菌群落的物种丰富度无明显变化, 而在低温下, 土壤中细菌群落的物种丰富度会有所下降<sup>[14]</sup>。哺乳犊牛岛土壤与其他牛舍土壤细菌群落组成差异较大, 而且哺乳犊牛岛土壤的细菌群落多样性较低, 可能哺乳中的犊牛粪便微生物比成年奶牛粪便微生物多样性低。已有研究发现, 与成年粪便菌群相比较, 胎粪微生物多样性较低, 个体间的差异更高<sup>[15]</sup>。通过UPGMA 聚类分析发现 8 个牛舍土样细菌群落共分成了两大类: 哺乳犊牛岛土样的细菌群落为一大类; 其他 7 个牛舍土样的细菌群落为一大类, 表明犊牛断奶前后土样细菌群落结构差异较大, 断奶后奶牛群体的牛舍土样细菌群落组成差异较小。而 Kim 等<sup>[16]</sup>研究发现, 断奶后 10–22 周龄猪粪便中的细菌群落组成结构连续发生变化, 直到 22 周龄之后细菌群落组成结构才趋于稳定。

不同牛舍土壤的优势菌门均为拟杆菌门、变形菌门、放线菌门和厚壁菌门, 这与相关研究结果毫无二致<sup>[11,17]</sup>, 与奶牛场堆积粪便中优势菌门相同<sup>[18]</sup>, 但与新鲜粪便中优势菌门略有差异<sup>[19]</sup>。泌乳期奶牛饲喂的全混合日粮为高能量、高蛋白的饲料<sup>[20]</sup>, 精饲料占比较高, 使奶牛采食中有过量的能量摄入, 有利于厚壁菌门丰富度增加<sup>[21]</sup>, 因此泌乳期的牛舍(LCA、HFCA、HMCA)之间细菌群落结构相似度最高, 并且厚壁菌门丰富度较高。哺乳犊牛岛土壤中专门分解碳水化合物的拟杆菌门<sup>[22]</sup>丰富度最高, 且通过 FAPROTAX 数据库的功能注释发现哺乳犊牛岛土样里的氮呼吸、亚硝酸脱氮作用和反硝化作用较高, 从而降低了土壤中氮素营养的含量, 这可能表明哺乳犊牛岛土壤中含有

较高的底物浓度( $\text{NO}_3\text{-N}$  和溶解有机碳)<sup>[23-24]</sup>。断奶犊牛舍土壤中变形菌门丰富度最高, 推测是因断奶犊牛的尿液排入土壤中混合导致氮含量较高, 使得富营养菌群的变形菌门在养分充足的土壤环境中迅速繁殖<sup>[25]</sup>。高艳霞等<sup>[26]</sup>研究发现, 犊牛断奶后 2 周的尿素氮浓度显著高于断奶前犊牛; 同时土壤随着氮的浓度增加, 变形菌门的相对丰度会随之增加<sup>[27]</sup>。还有研究表明, 奶牛场养殖用水中的优势菌群为变形菌门<sup>[11]</sup>, 表明变形菌门易于生长繁殖在含有粪便和尿液丰富的潮湿土壤环境中。高产头胎泌乳牛舍土样的细菌功能预测中关于甲烷功能的预测较多, 这与奶牛消化道大量产甲烷菌密切相关, 与甲烷排放在奶牛 2–3 岁达到峰值<sup>[28]</sup>的报道一致。

本实验对 48 个土壤样本的细菌群落丰度进行检测, 不同群体牛舍土壤中鉴定出的优势菌属在细菌群落组成上较为相似, 但也存在一定差异。*Fermentimonas* 主要分布在犊牛舍(NCA、WCA)、育成牛舍和病牛舍, 可对蛋白质进行降解<sup>[13]</sup>, 参与碳水化合物转运和代谢<sup>[29]</sup>, 可能也影响碳水化合物的发酵产生  $\text{CO}_2$ 、甲烷等气体。栖海面菌属主要分布在哺乳犊牛岛, 这类菌属是有机污染物降解菌, 值得注意的是, 栖海面菌属有反硝化相关基因, 可将硝酸盐转化为氮<sup>[30]</sup>, 这也是在菌群功能预测中哺乳犊牛岛土壤在硝酸盐呼吸和塑料降解相关功能表现出较高丰度的原因之一。不动杆菌属主要分布在哺乳犊牛岛、高产头胎泌乳牛舍、高产经产泌乳牛舍, 属于条件致病菌, 黏附力强, 易在潮湿的环境中生长繁殖<sup>[31]</sup>; 可引起伤口及皮肤感染<sup>[32]</sup>, 同时也可引起呼吸道感染等人类病原体感染, 这在本实验中, 哺乳犊牛岛土样中细菌群落发现有相应的功能组成; 在牛舍中, 泌乳期奶牛乳房增大, 易与潮湿的地面接触, 使土样中的不动杆菌属在乳房部位生长繁殖, 造

成乳房感染并引发乳房炎,不动杆菌属可能是引发乳房炎的外源病原菌<sup>[33]</sup>,而高产头胎泌乳牛舍和高产经产泌乳牛舍中不动杆菌属丰度较高,表明处于泌乳期的奶牛患乳房炎的风险较大。盐单胞菌属主要分布在断奶犊牛舍、育成牛舍、干奶牛舍和病牛舍,菌落需 NaCl 才能生长,且硝酸盐还原呈阳性<sup>[34]</sup>; *Parapedobacter* 主要分布在高产头胎泌乳牛舍、高产经产泌乳牛舍,属于鞘脂杆菌科,具有氧化酶和过氧化氢酶活性<sup>[34]</sup>。*Truepera* 主要分布在育成牛舍、干奶牛舍土样、病牛舍,它是嗜热的并且能耐受非常高的辐射<sup>[35]</sup>,此前也有研究表明,其细菌家族与消化过程有关,可以分解半纤维素等高分子量有机物<sup>[36-37]</sup>。*Pedobacter* 主要分布在干奶牛舍、高产头胎泌乳牛舍和高产经产泌乳牛舍,可编码各种各样的抵抗机制<sup>[38]</sup>,有一定的耐药性<sup>[39]</sup>,而且可将烷烃类物质降解转化并释放能量<sup>[40]</sup>。

## 4 结论

不同牛舍土壤细菌群落组成存在差异,在这 8 个牛舍中,高产头胎泌乳牛舍土壤的细菌群落丰富度最高;哺乳犊牛岛土壤与其他牛舍土壤细菌群落在门水平上差异较大;泌乳期的 3 个牛舍土壤之间的细菌群落结构相似度较高。各牛舍土壤的优势菌门均为拟杆菌门、变形菌门、放线菌门和厚壁菌门。嗜盐碱的盐单胞菌属、降解菌的 *Fermentimonas* 和栖海面菌属、致病菌的鸟杆菌属是犊牛期牛舍土壤的优势菌属;嗜盐碱的 *Truepera* 是育成牛舍土壤的优势菌属;致病菌的不动杆菌属和 *Parapedobacter*、耐药菌的 *Pedobacter* 是泌乳期牛舍土壤的优势菌属。致病菌和参与硝酸盐呼吸的细菌主要分布在哺乳犊牛岛,嗜盐碱菌主要分布在断奶犊牛舍和育成牛舍,产甲烷的细菌主要分布在高

产头胎泌乳牛舍。本研究分析了不同牛舍土样细菌群落多样性,探讨了环境致病菌在牛舍土壤之间的分布,为奶牛健康生产提供理论依据。

## REFERENCES

- [1] Wood JL, Liu WX, Tang CX, Franks AE. Microorganisms in heavy metal bioremediation: strategies for applying microbial-community engineering to remediate soils[J]. AIMS Bioengineering, 2016, 3(2): 211-229
- [2] Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(10): 579-590
- [3] 张俊华, 尚天浩, 刘吉利, 孙媛, 贾萍萍. 宁夏西吉县养牛场粪污和周边土壤重金属及细菌群落特征[J]. 应用生态学报, 2020, 31(9): 3119-3130  
Zhang JH, Shang TH, Liu JL, Sun Y, Jia PP. Characteristics of heavy metals and bacterial community in manure and surrounding soil of cattle farm in Xiji, Ningxia, China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(9): 3119-3130 (in Chinese)
- [4] 刘羽, 刘婕, 王朝元, 施正香, 李保明. 规模奶牛养殖室外运动场春季温室气体与氨气排放特性[J]. 农业工程学报, 2018, 34(22): 178-184  
Liu Y, Liu J, Wang CY, Shi ZX, Li BM. Emission characteristic of greenhouse gases and ammonia from open lot of scale dairy farm in spring[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(22): 178-184 (in Chinese)
- [5] Leytem AB, Dungan RS, Bjorneberg DL, Koehn AC. Emissions of ammonia, methane, carbon dioxide, and nitrous oxide from dairy cattle housing and manure management systems[J]. Journal of Environmental Quality, 2011, 40(5): 1383-1394
- [6] Witkowska D, Korczyński M, Koziel JA, Sowińska J, Chojnowski B. The effect of dairy cattle housing systems on the concentrations and emissions of gaseous mixtures in barns determined by Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. Annals of Animal Science, 2020, 20(4): 1487-1507
- [7] 富艳玲, 刘爱玲, 李旭东. 奶牛乳房炎防治技术研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(7): 51-54  
Fu YL, Liu AL, Li XD. Research progress on the prevention and cure of dairy cow mastitis[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010, 44(7): 51-54 (in Chinese)
- [8] 魏凡华, 狄学珍, 牛耀祖, 赵世媛, 李永琴, 徐婧祎,

- 李知新, 许立华. 银川地区奶牛乳房炎流行病学调查与分析[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(12): 127-128
- Wei FH, Di XZ, Niu YZ, Zhao SY, Li YQ, Xu JY, Li ZX, Xu LH. Epidemiological investigation and analysis of dairy cow mastitis in Yinchuan area [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 46(12): 127-128 (in Chinese)
- [9] 张雯, 马臣杰, 李武, 曾瑾, 邓光存, 吴晓玲. 银川地区规模化奶牛养殖场粪污可培养细菌种群分布多样性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2019, 35(1): 128-135
- Zhang W, Ma CJ, Li W, Zeng J, Deng GC, Wu XL. The study of diversity of culturable bacteria community in manure from large-scale dairy farms in Yinchuan[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2019, 35(1): 128-135 (in Chinese)
- [10] 伍清林, 金兰梅, 葛继文, 马高民, 王君, 叶子欣, 施望远. 乳牛舍内环境空气中细菌数量与乳房炎的关系研究[J]. 中国奶牛, 2010(1): 39-42
- Wu QL, Jin LM, Ge JW, Ma GM, Wang J, Ye ZX, Shi WY. Research on the relationship between the number of bacterium and mastitis in ambient air of dairy barn[J]. *China Dairy Cattle*, 2010(1): 39-42 (in Chinese)
- [11] 闫艳华, 曹慧慧, 董李学, 杜瑞焕, 郑百芹, 李爱军. 奶牛养殖场环境微生物群落结构及多样性研究[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(2): 31-37
- Yan YH, Cao HH, Dong LX, Du RH, Zheng BQ, Li AJ. Analysis of the diversity and community structure of environmental microbes in dairy farms[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 53(2): 31-37 (in Chinese)
- [12] Wu HM, Wang Y, Du BY, Li HY, Dong L, Hu HY, Meng L, Zheng N, Wang JQ. Influence of dairy cows bedding material on the microbial structure and antibiotic resistance genes of milk[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 830333
- [13] 杨思瑞, 杨卓, 火苗, 张洁, 张力莉, 李胜利, 徐晓锋. 荷斯坦奶牛不同群体牛舍土壤细菌菌群结构差异分析[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(2): 275-283
- Yang SR, Yang Z, Huo M, Zhang J, Zhang LL, Li SL, Xu XF. Analysis on difference of soil bacterial community structure in different groups of Holstein dairy cow barns[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2022, 34(2): 275-283 (in Chinese)
- [14] Št'oviček A, Azatyan A, Soares MIM, Gillor O. The impact of hydration and temperature on bacterial diversity in arid soil mesocosms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1078
- [15] 李晓斌, 马晨, 李凤鸣, 黄新新, 米热古丽·伊马木, 臧长江, 李佳豪, 李超, 马利鑫, 曹蕊. 哈萨克母羊分娩前与胎儿组织器官细菌的多样性[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(5): 965-972
- Li XB, Ma C, Li FM, Huang XX, Yimamu Mireguli, Zang CJ, Li JH, Li C, Ma LX, Cao R. Study on microbiota diversity of maternal and fetus at the late pregnancy of Kazakh ewe[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2021, 58(5): 965-972 (in Chinese)
- [16] Kim M, Morrison M, Yu ZT. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(1): 49-63
- [17] 李传海, 尚健, 聂文芳, 李立峰, 曹慧. 家鸽粪便细菌多样性的高通量测序分析及其环境意义[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(1): 116-122
- Li CH, Shang J, Nie WF, Li LF, Cao H. Illumina sequencing of 16S rDNA tag revealed bacterial communities in pigeon feces and its environmental implication[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(1): 116-122 (in Chinese)
- [18] 张雯. 银川地区规模化奶牛养殖场环境微生物群落分布及耐药性研究[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2018
- Zhang W. Study on environmental microbial diversity and antibiotic resistance of large-scale dairy farms in Yinchuan[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2018 (in Chinese)
- [19] 胡平. 基于宏基因组测序对奶牛运动场土壤和粪便微生物群落结构的分析[J]. 养殖与饲料, 2022, 21(2): 4-8
- Hu P. Analysis of microbial community structure of dairy cattle playground soil samples and feces based on metagenomic sequencing[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2022, 21(2): 4-8 (in Chinese)
- [20] Ferland MC, Guesthier MA, Cue RI, Lacroix R, Burgos SA, Lefebvre D, Wade KM. Effect of feeding system and grain source on lactation characteristics and milk components in dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(9): 8572-8585
- [21] Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, Krakoff J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 94(1): 58-65
- [22] Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(6): 1069-1079
- [23] Wei H, Peng CH, Yang B, Song HX, Li Q, Jiang L, Wei G, Wang KF, Wang H, Liu SR, et al. Contrasting soil bacterial community, diversity, and function in two

- forests in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1693
- [24] Huang Q, Wang JL, Wang C, Wang Q. The 19-years inorganic fertilization increased bacterial diversity and altered bacterial community composition and potential functions in a paddy soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 144: 60-67
- [25] 马龙. 不同施肥模式对设施菜田土壤微生物群落结构及氮循环的影响[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021
- Ma L. Effects of different fertilization patterns on soil microbial community and N cycle in greenhouse vegetable production[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese)
- [26] 高艳霞, 仁瑞清, 李建国, 曹玉凤, 李秋凤. 断奶应激对犊牛血液生化、免疫和内分泌的影响[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(8): 1294-1299, 1303
- Gao YX, Ren RQ, Li JG, Cao YF, Li QF. Effects of weaning stress on blood biochemical indicators, immunity and endocrine of dairy calves[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(8): 1294-1299, 1303 (in Chinese)
- [27] Zhou J, Guan DW, Zhou BK, Zhao BS, Ma MC, Qin J, Jiang X, Chen SF, Cao FM, Shen DL, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90: 42-51
- [28] Grandl F, Amelchanka SL, Furger M, Clauss M, Zeitz JO, Kreuzer M, Schwarm A. Biological implications of longevity in dairy cows: 2. Changes in methane emissions and efficiency with age[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(5): 3472-3485
- [29] Beye M, Bakour S, Traore SI, Rathored J, Labas N, Raoult D, Fournier PE. Draft genome sequence of *Fermentimonas caenicola* strain SIT8, isolated from the human gut[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2018, 13: 8
- [30] Zhang SF, Zhou HX, Sun CR, Hu Z, Wang H. *Aequorivita lutea* sp. nov., a novel bacterium isolated from the estuarine sediment of the Pearl River in China, and transfer of *Vitellibacter todarodis* and *Vitellibacter aquimaris* to the genus *Aequorivita* as *Aequorivita todarodis* comb. nov. and *Aequorivita aquimaris* comb. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(5): 3117-3122
- [31] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(3): 538-582
- [32] Hanski I, Von Hertzen L, Fyhrquist N, Koskinen K, Torppa K, Laatikainen T, Karisola P, Auvinen P, Paulin L, Mäkelä MJ, et al. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated[J]. *PNAS*, 2012, 109(21): 8334-8339
- [33] 曾学琴, 柳陈坚, 杨雪, 李晓然. 高通量测序法检测奶牛乳房炎关联微生物群落结构及多样性[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(9): 1437-1445
- Zeng XQ, Liu CJ, Yang X, Li XR. Microbial community structure and diversity of mastitis cows by 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(9): 1437-1445 (in Chinese)
- [34] 王士燕. 两株新菌的多相分类和兰花致病真菌拮抗细菌的筛选[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2016
- Wang SY. Taxonomic analysis of two novel bacteria and screening of antagonistic bacteria against pathogenic fungi of orchid[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2016 (in Chinese)
- [35] Albuquerque L, Simões C, Nobre MF, Pino NM, Battista JR, Silva MT, Rainey FA, Da Costa MS. *Truepera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new radiation resistant species and the proposal of *Trueperaceae* fam. nov.[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 247(2): 161-169
- [36] Eichorst SA, Joshua C, Sathitsuksanoh N, Singh S, Simmons BA, Singer SW. Substrate-specific development of thermophilic bacterial consortia by using chemically pretreated switchgrass[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(23): 7423-7432
- [37] Wang JQ, Liu ZP, Xia JS, Chen YP. Effect of microbial inoculation on physicochemical properties and bacterial community structure of citrus peel composting[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291: 121843
- [38] Viana AT, Caetano T, Covas C, Santos T, Mendo S. Environmental superbugs: the case study of *Pedobacter* spp.[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 241: 1048-1055
- [39] Yang Z, Xu JY, Sheng MY, Qiu JG, Zhu JC, Zhang J, He J. *Pedobacter puniceum* sp. nov. isolated from sludge[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(12): 4186-4191
- [40] 常思静, 杨蕊琪, 章高森, 刘光琇, 陈拓. 青藏高原土壤中一株原油降解菌的作用机制探究[J]. *冰川冻土*, 2018, 40(5): 1037-1046
- Chang SJ, Yang RQ, Zhang GS, Liu GX, Chen T. Investigation of crude oil-degrading mechanisms of a bacterial strain isolated from Tibetan Plateau soil[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2018, 40(5): 1037-1046 (in Chinese)