

张桃香,吴艺妍,田梓莹,等.粪肥对不同类型土壤中沙门氏菌存活动态的影响[J].江苏农业科学,2017,45(5):297-300.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.077

粪肥对不同类型土壤中沙门氏菌存活动态的影响

张桃香¹,吴艺妍¹,田梓莹¹,杨文浩²

(1. 福建农林大学林学院,福建福州 350002;

2. 福建农林大学资源与环境学院/福建省土壤环境健康与调控重点实验室,福建福州 350002)

摘要:猪粪和鸡粪是沙门氏菌的主要传播载体。主要探讨了猪粪和鸡粪对土壤中沙门氏菌存活行为的影响,为防控土壤沙门氏菌污染和人畜共患疾病的暴发提供参考。研究采集了 5 种南方典型农业土壤,通过添加猪粪和鸡粪 2 种粪肥,利用室内培养试验,开展了沙门氏菌在土壤中的存活试验,探讨其存活影响因素。结果表明:(1)添加猪粪和鸡粪的供试土壤中沙门氏菌浓度随着时间变化的趋势在培养初期有 1 个先升高后逐渐衰亡的过程。(2)添加猪粪土壤(21.11~45.26 d)中沙门氏菌的存活时间明显长于添加鸡粪的土壤(14.33~34.94 d),说明猪粪比鸡粪更能促进沙门氏菌在土壤中的存活。(3)土壤 pH 值($r=0.829$)、有机碳含量($r=0.567$)、总氮($r=0.466$)和钾含量($r=0.429$)是影响粪肥添加土壤中沙门氏菌存活的最重要因素。

关键词:猪粪;鸡粪;土壤;沙门氏菌;存活动态

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0297-04

近几十年来,我国畜禽集约化养殖业迅速发展,畜禽数量飞速递增,在有效解决了人类饮食需求的同时,粪便的排放量也在增加,带来严重的环境污染^[1]。资料显示,每年全国畜禽粪便年排放量达到 40 亿 t,已成为与工业废水、生活污水相并列的三大污染源之一^[2-3]。目前,大量畜禽粪便没有得到充分有效的利用,还有很多被随意排放到自然环境中,使土壤、水体及大气等自然环境受到了严重的污染^[2-4]。

畜禽粪便含有大量的病原微生物和寄生虫卵,畜禽粪便未经无害化处理施入农田后,病原微生物可以通过食物链进入人体,引发食源性疾病^[5-7]。据统计,在世界各国的细菌性食物中毒中,沙门氏菌引起的食物中毒排列榜首,我国内陆地区也以沙门氏菌为首位^[8],进食被沙门氏菌污染的食品可引起伤寒、腹泻及肠道炎症反应,甚至死亡^[6,9]。牛、羊、狗和鸡等动物是沙门氏菌的天然宿主,带菌动物粪便是沙门氏菌污染环境、食品的主要来源,人类通过接触畜禽粪便和食用污染土壤中的蔬菜水果等间接受到感染^[9-10]。据调查,沙门氏菌在畜禽粪便和土壤中的存活时间可长达几个月,然后通过地下水、植物等进入食物链^[11-12],因此,研究畜禽粪便中沙门氏菌在土壤中的存活对土壤生物污染能力的评估和管理对人类的健康极为重要。目前,对于沙门氏菌通过畜禽粪便进入土壤后的环境行为等相关研究尚处于起步阶段,且我国很少见沙门氏菌在农业与环境中存活的研究报道。因此,研究沙门氏菌在粪肥添加土壤中的存活动态对于沙门氏菌引起的土壤生物污染的评估、控制、预防和修复技术具有重要意义。

收稿日期:2016-09-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:41501272);福建农林大学林学院青年科学基金(编号:6112C035002)。

作者简介:张桃香(1985—),女,湖南邵阳人,博士,讲师,主要从事土壤微生物生态研究。E-mail:xsxzheda2009@163.com。

通信作者:杨文浩,博士,讲师,主要从事污染土壤生态恢复研究。E-mail:whyang@fafu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试病原菌为革兰氏阴性沙门氏菌,沙门氏菌抗利福平驯化浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$,其最适生长温度为 37.0 $^{\circ}\text{C}$ 。-80.0 $^{\circ}\text{C}$ 保存的沙门氏菌 37.0 $^{\circ}\text{C}$ 培养活化后,与脑心萃取液培养基(添加 100 $\mu\text{g/mL}$ 利福平)中恒温振荡培养(37.0 $^{\circ}\text{C}$,250 r/min)12 h 至沙门氏菌达到对数生长期初期,无菌磷酸缓冲液多次离心洗净沙门氏菌表面的培养基,无菌水稀释一定倍数后用紫外分光光度计测定其浓度,调节菌液浓度至沙门氏菌浓度为 1.0×10^7 CFU/mL。

1.2 供试粪肥

供试粪肥分别为猪粪和鸡粪。猪粪和鸡粪采集自福建福州闽侯养殖场,猪粪和鸡粪均为未经堆肥的新鲜粪肥,风干研磨过筛后备用。猪粪和鸡粪基本理化性质参照南京土壤研究所编的《土壤农化分析》进行分析,基本理化性质见表 1。

1.3 供试土壤

供试土壤为福建省主要农业土壤,包括水稻土、红壤、黄壤、紫色土和风沙土。每个土壤均采集了 3 个重复样品,每个样品均为 S 形多点采集土壤表土层(0~20 cm)的混合样,去除植物根系与碎石块,新鲜样品采集后用冰袋包装带回实验室马上过 2 mm 筛,一部分样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,加入适当比例的猪粪和鸡粪,用于接种沙门氏菌进行存活试验,同时测定添加猪粪和鸡粪后土壤的物理化学性质,另一部分风干后过 2 mm 筛土样,用于土壤物理化学性质测定。土壤理化性质参照南京土壤研究所编的《土壤农化分析》进行分析。猪粪和鸡粪添加前后土壤物理化学性质见表 2。

1.4 测定方法

供试土壤中以 1/25(质量比)添加粪肥,充分混匀,然后调节土壤含水量至 100% 土壤含水量(-33 kPa 压力下),室温培养 1 周后测定添加粪肥后土壤的化学性质,接种一定量

表 1 供试粪肥化学性质

类别	pH 值	有机碳 (%)	溶解态有机碳 (g/kg)	总氮 (g/kg)	总磷 (g/kg)	总钾 (g/kg)	C/N
猪粪	7.40	55.14	28.76	30.86	12.56	11.02	17.87
鸡粪	8.15	37.60	12.62	23.46	29.47	15.94	16.03

表 2 供试土壤物理化学性质

类别	pH 值	有机碳 (g/kg)	总氮 (g/kg)	总磷 (g/kg)	总钾 (g/kg)	C/N	溶解态有机碳 (mg/kg)
水稻土	6.61	25.80	1.63	0.45	26.55	15.83	62.42
水稻土 + 猪粪	7.13	44.30	2.94	0.87	26.92	15.07	301.72
水稻土 + 鸡粪	6.75	40.20	2.43	1.44	27.11	16.54	206.93
红壤	4.84	13.72	1.14	0.24	12.81	12.03	28.55
红壤 + 猪粪	6.43	28.60	2.18	0.48	13.04	13.12	172.17
红壤 + 鸡粪	6.15	24.50	1.97	1.19	13.37	12.44	108.43
黄壤	5.15	18.07	1.27	0.34	6.10	14.22	47.68
黄壤 + 猪粪	6.63	37.60	2.25	0.62	6.35	16.71	288.32
黄壤 + 鸡粪	6.26	32.10	1.84	1.23	6.67	17.45	179.54
紫色土	5.58	15.74	1.09	0.72	28.31	14.44	29.39
紫色土 + 猪粪	6.78	32.70	2.16	1.02	28.49	15.14	201.52
紫色土 + 鸡粪	6.49	28.00	1.67	1.60	28.69	16.78	143.61
风沙土	5.68	8.63	0.43	0.26	7.53	20.07	6.86
风沙土 + 猪粪	6.89	17.90	1.54	0.65	7.64	11.62	83.97
风沙土 + 鸡粪	6.32	15.30	1.23	1.26	7.94	12.44	62.72

沙门氏菌至添加猪粪和鸡粪的土壤中,接种土壤中沙门氏菌的最终浓度为 10^6 CFU/g,25 ℃ 恒温培养箱中避光培养,在培养过程中通过测定土壤的质量来调节土壤含水量的恒定。试验同时进行 3 个平行和空白处理。培养 0、1、2、3、5、7、10、15、20、25、30、35、40、45、55、65 d 后,采样测定土壤中沙门氏菌活细胞的浓度:0.1% 蛋白胨缓冲液混匀采样土壤,土壤悬浮液逐级稀释到适当浓度,涂抹至大豆酪蛋白琼脂培养基(添加 100 μg/mL 利福平),37 ℃ 培养箱培养过夜后计数,计算出培养不同时间后土壤中存活沙门氏菌的浓度,该方法的最低检测限为 100 CFU/g,连续 2 次未能在土壤中检测出沙门氏菌菌落时,停止取样。

1.5 统计方法

不同时间点检测的土壤中沙门氏菌的存活浓度均转化为 lg(CFU/g),然后通过 Weibull 单指数模型^[13]模拟:

$$\lg N_t = \lg N_0 - (t/\delta)^p;$$

式中: N_t 为取样时土壤中沙门氏菌的浓度, N_0 为土壤中沙门氏菌接种浓度, t 为取样时间, δ 为尺度参数, p 为弧度参数($p > 1$,拟合曲线为凸状; $p < 1$,拟合曲线为凹状)。

采用 SPSS 18.0 软件进行相关分析。图件制作采用 Origin 8.1 软件。

2 结果与分析

2.1 沙门氏菌在土壤中的存活动态

图 1 显示了沙门氏菌在添加猪粪和鸡粪土壤中的存活动态随时间的变化情况。水稻土、红壤、黄壤、紫色土和滨海风沙土中沙门氏菌随着培养时间延长存活浓度逐渐降低,但是所有供试土壤中沙门氏菌浓度随着时间变化的趋势在接种培养初期有 1 个先升高后降低的过程。接种 1 d 后添加猪粪的土壤中沙门氏菌浓度都有小幅度的上升,达到约 $3 \times$

10^6 CFU/g,培养 2 d 后水稻土中的沙门氏菌浓度升高幅度最大,上升至 1.5×10^7 CFU/g,风沙土中沙门氏菌的浓度上升至 4×10^6 CFU/g,而红壤、黄壤和紫色土中的沙门氏菌浓度开始下降,土壤中的沙门氏菌逐步进入衰亡期。

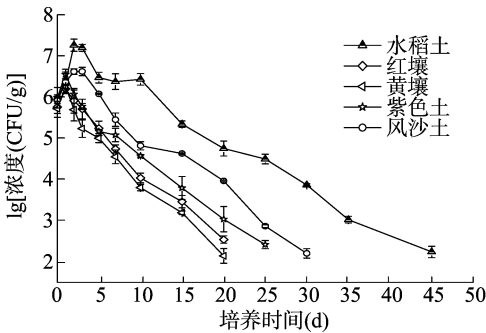


图 1 猪粪添加土壤中沙门氏菌的存活动态

水稻土和风沙土中的沙门氏菌浓度在培养第 3 天没有继续上升,而是保持高浓度,接种第 5 天后土壤中病原菌的浓度分别下降至 3.0×10^6 CFU/g 和 1.0×10^6 CFU/g,水稻土和风沙土中的沙门氏菌开始进入缓慢衰亡期。接种后 45 d 水稻土中沙门氏菌逐步接近最低检测限(10^2 CFU/g),风沙土中的沙门氏菌在培养 30 d 后达到最低检测限。红壤、黄壤和紫色土中沙门氏菌衰亡较快,均在接种 20~25 d 后迅速下降至最低检测限。与猪粪添加土壤中沙门氏菌的存活行为相比,添加鸡粪后所有土壤中沙门氏菌的存活时间明显减短(图 2)。

在接种培养初期,土壤中沙门氏菌的浓度也会经历小幅度上升然后降低的过程。水稻土和风沙土中沙门氏菌的存活浓度在培养前 2 d 分别保持在 6×10^6 CFU/g 和 4×10^6 CFU/g,水稻土中沙门氏菌存活时间最长,其次是风沙土。接种 1 d 后,黄壤、红壤和紫色土中沙门氏菌的浓度上升至 2×10^6 CFU/g,

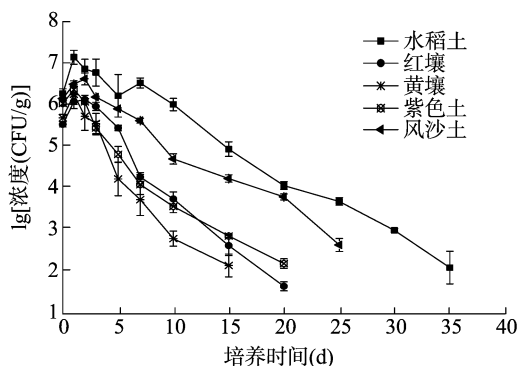
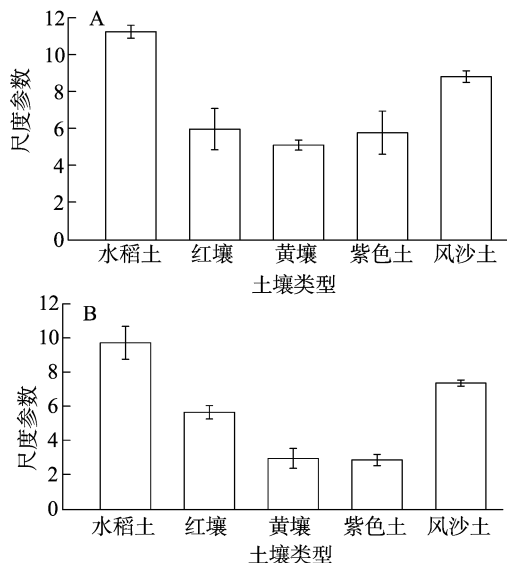


图2 鸡粪添加土壤中沙门氏菌的存活动态

然后进入快速衰亡期,培养 15 d 后黄壤和红壤中基本检测不到沙门氏菌,培养 20 d 后紫色土中沙门氏菌达到最低检测限。

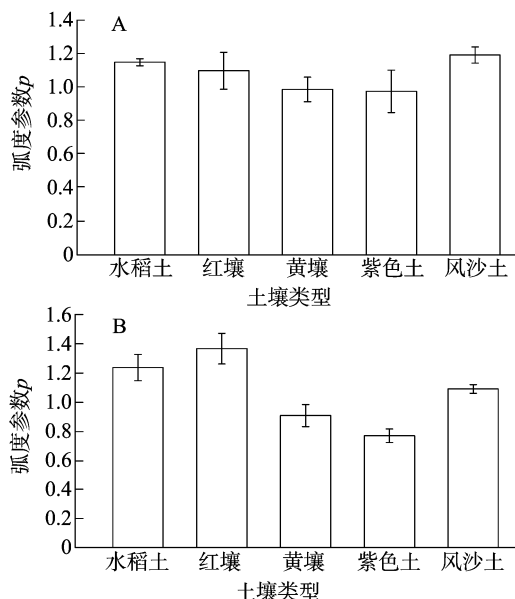
2.2 沙门氏菌在土壤中的存活模型

将添加猪粪和鸡粪土壤中不同培养时间沙门氏菌的存活浓度均转化为 \lg (CFU/g),然后通过 Weibull 单指数模型模拟,方程模拟显示沙门氏菌在水稻土、红壤、黄壤、紫色土和滨海风沙土中的存活方程决定系数(r^2)范围为 0.92~0.97,Weibull 单指数模型能较好地模拟沙门氏菌在施用猪粪和鸡粪土壤中的存活动态。由图 3 可知,不同土壤 δ (尺度参数)不同,猪粪添加土壤中的 δ 的范围为 5.13~11.29,而鸡粪添加土壤中 δ 值均减小,范围为 2.88~9.72,简单相关分析结果表明沙门氏菌存活时间(t_d)与 δ 呈正相关关系($r=0.742, P<0.01$)。

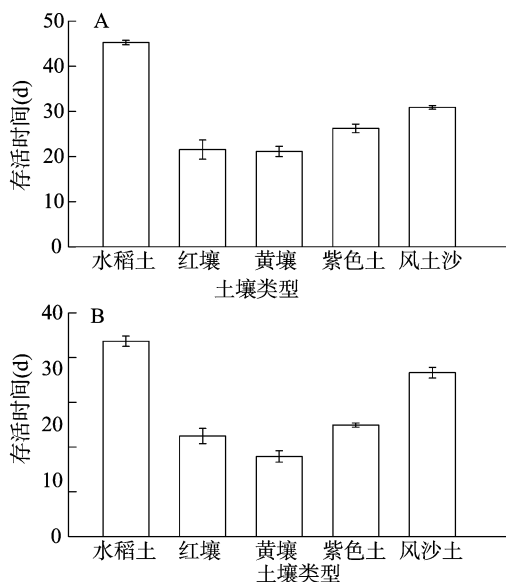
图3 猪粪(A)和鸡粪(B)添加土壤 Weibull 模型拟合参数(δ)

p 为弧度参数, $p>1$,拟合曲线为凸状, $p<1$,拟合曲线为凹状,在添加猪粪和鸡粪的土壤中,水稻土、红壤和风沙土中沙门氏菌的拟合曲线为凸状,黄壤和紫色土的拟合曲线为凹状(图 4)。

通过 Weibull 单指数模型计算得出所有添加猪粪土壤中沙门氏菌的存活时间长于添加鸡粪的土壤(图 5),说明猪粪比鸡粪更能促进沙门氏菌在土壤中的存活,所有土壤中存活时间最长的为添加了猪粪的水稻土(45.26 d);存活时间最短的土壤为添加鸡粪的黄壤,存活时间仅为 14.33 d。沙门氏菌在添加猪粪土壤中的存活时间顺序为:水稻土(45.26 d) > 风

图4 猪粪(A)和鸡粪(B)添加土壤 Weibull 模型拟合参数(ρ)

沙土(30.88 d) > 紫色土(26.23 d) > 红壤(21.52 d) > 黄壤(21.11 d)(图 5-A)。沙门氏菌在添加鸡粪土壤中的存活时间顺序为:水稻土(34.97 d) > 风沙土(29.31 d) > 紫色土(19.94 d) > 红壤(15.98 d) > 黄壤(14.33 d)(图 5-B)。

图5 猪粪(A)和鸡粪(B)添加土壤中沙门氏菌存活时间(t_d)

2.3 沙门氏菌存活与土壤理化性质的关系

本试验通过相关分析对沙门氏菌存活与土壤性质间的关系进行了综合探讨。简单相关分析结果(表 3)表明,沙门氏菌的存活时间与土壤的 pH 值($r=0.829$)、有机碳($r=0.567$)和土壤总氮($r=0.466$)呈极显著正相关,与土壤钾($r=0.429$)含量呈显著正相关,说明土壤 pH 值、有机碳含量、总氮和钾含量是影响粪肥添加土壤中沙门氏菌存活的最重要因素。

3 结论与讨论

本试验研究了施用猪粪和鸡粪对不同性质农业土壤中沙

表 3 存活时间与供试土壤性质相关性分析

项目	相关系数					
	pH 值	有机碳	总氮	总磷	总钾	溶解态有机碳
t_d	0.829 **	0.567 **	0.466 **	-0.108	0.429 *	0.321
						-0.128

门氏菌存活的影响,同样的培养温度和水分条件下,由于施用不同种类有机肥(猪粪和鸡粪),土壤中的沙门氏菌表现出不同的存活动态。试验结果表明,接种至添加了猪粪和鸡粪土壤中的沙门氏菌的浓度在培养初期先升高,然后随着培养时间逐渐降低至最低检测线,不同的土壤中沙门氏菌浓度升高和衰亡的趋势有明显不同。沙门氏菌存活动态可通过 Weibull 单指数模型得到较好的模拟,通过模型计算得出沙门氏菌在添加猪粪和粪土壤中的存活时间顺序均为:水稻土>风沙土>紫色土>红壤>黄壤,且添加猪粪土壤中沙门氏菌的存活时间(21.11~45.26 d)显著长于添加鸡粪的土壤(14.33~34.94 d),说明猪粪比鸡粪更能促进沙门氏菌在土壤中的存活。研究结果表明,土壤 pH 值、有机碳含量、总氮和钾含量是影响粪肥添加土壤中沙门氏菌存活的主控因子。大量研究表明,土壤 pH 值是影响土壤中外源病原菌存活的重要因素,本试验结果表明施用猪粪和鸡粪到土壤中后,大多数土壤转变为中性或者碱性,且土壤中的有机质和其他养分含量也得到了提升,促进了土壤中沙门氏菌的存活。

牛、羊、猪和鸡等动物是沙门氏菌的天然宿主^[8],我国是养殖大国,生猪存栏头数占世界总量的 50%,大型养猪场已突破 50 万头,养鸡场 100 万羽,全国大中型养殖场已高达 4 万多家^[1],由于各方面的原因,大部分猪场的猪粪都是未经任何处理而在自然环境中堆积或者直接排放,这给环境带来巨大的影响^[3-4,14],特别是一些人畜共患疾病给人畜健康构成巨大的威胁。猪粪和鸡粪是沙门氏菌的主要载体^[15-16],大量调查表明在我国很多省份的猪粪和鸡粪中已经检测到沙门氏菌^[17-18],如果被沙门氏菌污染的猪粪和鸡粪施入土壤,沙门氏菌会随着猪粪通过降雨、灌溉等途径进入土表 and 地下径流^[16,19]。本试验供试土壤为福建省主要农业土壤,猪粪等有机肥施用是有机废弃物农业资源化利用的主要途径,沙门氏菌在供试土壤中的存活时间在 20 d 以上,特别是沙门氏菌在施用了猪粪的水稻土中的存活时间长达 44 d,通过施肥进入水稻土的沙门氏菌在土壤中的蓄积时间较长,且本试验中检测的水稻土、红壤、黄壤、紫色土、潮土和滨海风沙土中沙门氏菌的存活时间均在 15 d 以上,说明本试验中所用到的主要土壤在施用猪粪和鸡粪后对地表水和地下水有较大的污染风险。

参考文献:

[1]郭冬生,彭小兰,龚群辉,等. 畜禽粪便污染与治理利用方法研究进展[J]. 浙江农业学报,2012,24(6):1164-1170.

[2]张田,卜美东,耿维. 中国畜禽粪便污染现状及产沼气潜力[J]. 生态学杂志,2012,31(5):1241-1249.

[3]刘辉,王凌云,刘忠珍,等. 我国畜禽粪便污染现状与治理对策[J]. 广东农业科学,2010,37(6):213-216.

[4]高定,陈同斌,刘斌,等. 我国畜禽养殖业粪便污染风险与控制策略[J]. 地理研究,2006,25(2):311-319.

[5]Saturveithan C, Arieff A, Premganes G, et al. *Salmonella osteomyelitis* in a one year old child without sickle cell disease;a case

report[J]. Malaysian Orthopaedic Journal,2014,8(2):52.

[6]Angelo K M,Chu A,Anand M,et al. Outbreak of *Salmonella* newport infections linked to cucumbers - United States,2014[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report,2015,64(6):144-147.

[7]Cevallos - Cevallos J M,Gu G,Richardson S M,et al. urvival of *Salmonella enteric typhimurium* in water amended with manure[J]. Journal of Food Protection,2014,77(12):2035-2042.

[8]Wang Y,Yang B W,Wu Y,et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar enteritidis on retail raw poultry in six provinces and two national cities in China[J]. Food Microbiology, 2015,46:74-80.

[9]Carrasco E,Morales - Rueda A,M Garcia - Gimeno R M. Cross - contamination and recontamination by *Salmonella* in foods;a review [J]. Food Research International,2012,45(2):545-556.

[10]Hanning I B,Nutt J D,Ricke S C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce:sources and potential intervention measures[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009,6(6):635-648.

[11]Bech T B,Johnsen K,Dalsgaard A,et al. Transport and distribution of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in loamy and sandy soil monoliths with applied liquid manure[J]. Applied and Environmental Microbiology,2010,76(3):710-714.

[12]Ailes E,Budge P,Shankar M,et al. Economic and health impacts associated with a *Salmonella typhimurium* drinking water Outbreak - Alamosa,CO,2008[J]. PLOS One,2013,8(3):e57439.

[13]Zhang T X,Wang H Z,Wu L S,et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu province, China[J]. PLoS One, 2013,8(12):e81178.

[14]叶小梅,常志州,陈欣,等. 畜禽养殖场排放病原微生物危险性调查[J]. 生态与农村环境学报,2007,23(2):66-70.

[15]Levantesi C,Bonadonna L,Briancesco R A,et al. *Salmonella* in surface and drinking water;occurrence and water - mediated transmission [J]. Food Research International, 2012,45(2,SI):587-602.

[16]Huong L Q,Forslund A,Madsen H,et al. Survival of *Salmonella* spp. and fecal indicator bacteria in vietnamese biogas digesters receiving pig slurry [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health,2014,217(7):785-795.

[17]王晓泉,焦新安,刘晓文,等. 江苏部分地区食源性和人源沙门氏菌的多重耐药性研究[J]. 微生物学报,2007,47(2):221-227.

[18]陈伟伟,林升清,马群飞,等. 福建省 2000—2002 年食品中沙门氏菌的监测与分析[J]. 中国食品卫生杂志,2003,15(5):406-410.

[19]Ongeng D,Vasquez G A,Muyanja C,et al. Transfer and internalisation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in cabbage cultivated on contaminated manure - amended soil under tropical field conditions in Sub - Saharan Africa[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011,145(1):301-310.