微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

APR 20, 2010, 37(4): 508−512
© 2010 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

鸡粪沼气池产甲烷菌多样性

郎会花　杨洪江*　张永刚

(天津科技大学生物工程学院 工业微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室　天津　300457)

摘　要: 采用分子生物学方法构建 16S rDNA 基因文库, 研究鸡粪沼气池发酵液中产甲烷菌的菌群结构。随机分析文库中 50 个克隆的 16S rDNA 基因序列, 结果发现, 其中 46 个克隆属于产甲烷菌属, 与 *Methanogenium marinum* strain AK-1 菌株的相似性为 99%−100%, 占总数的 92%; 3 个克隆(KD525、KD526 和 KD567)属于甲烷袋状菌属, 与 *Methanoculleus* sp. dm2 菌株的相似性均为 99%, 占总数的 6%; 1 个克隆(KD519)属于甲烷粒菌属, 与 *Methanocorpusculum bavaricum* 菌株的相似性为 99%, 占总数的 2%。另外, 同样分析了样品中甲基辅酶 M 还原酶 alpha 亚基 *mcrA* 基因氨基酸序列的差异。气相色谱法分析结果显示, 发酵液中甲酸含量为 28.85 g/L, 约占总有机酸含量的 81.7%; 沼气的主要成分为甲烷、二氧化碳和氢气, 分别约占总气体量的 55.5%、41.1%和 3.2%。

关键词: 鸡粪沼气池, 产甲烷菌, 多样性

Methanogenic Diversity in an Anaerobic Digester with Chicken Feces

LANG Hui-Hua　YANG Hong-Jiang*　ZHANG Yong-Gang

(*Key Laboratory of Industrial Microbiology*, *Ministry of Education*, *Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology*, *College of Biotechnology*, *Tianjin University of Science & Technology*, *Tianjin* 300457, *China*)

Abstract: Methanogenic diversity was characterized in an anaerobic digester with chicken feces by using a culture-independent approach. 50 clones of a 16S rDNA gene library were randomly selected and their sequences were phylogenetically analyzed. 46 of them (92%) was determined belonging to *Methanogenium* with similarities to *Methanogenium marinum* strain AK-1 between 99% to 100%; 3 clones (6%), KD525, KD526, and KD567, belonging to *Methanoculleus* with similarities 99% to *Methanoculleus* sp. dm2; one clone (2%), KD519, belonging to *Methanocorpusculum* with a similarity 99% to *Methanocorpusculum bavaricum*. Further more, the phylogenetic analyse of alpha subunit A of methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) clones were also performed. Gas chromatography assay showed that the content of formic acid was 28.85 g/L, 81.7% of the total volatile fatty acid of the fresh fermentation slurry; and the produced biogas from the digester was also determined, mainly composing of methane (55.5%), carbon dioxide (41.1%), and hydrogen (3.2%).

Keywords: Anaerobic digester with chicken feces, Methanogen, Diversity

---

基金项目: 天津科技大学启动基金项目(No. 0200135)

*通讯作者: ✉: hongjiangyang@tust.edu.cn

收稿日期: 2009-11-27; 接受日期: 2010-03-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

沼气发酵主要以畜禽粪便和植物秸秆等为原料, 依靠产甲烷菌群和其它微生物菌群的共同作用分解有机大分子, 产生沼气即甲烷气体。产甲烷菌群的种类在不同厌氧反应器中变化很大, 受发酵基质、发酵条件以及地域等多种因素影响, 稳定运行的厌氧反应器中一般存在一种或数种产甲烷菌。

产甲烷菌分离培养需要严格的厌氧条件, 因此通常采用不依赖于培养的分子生物学方法, 直接分析样品宏基因组 DNA 中 16S rDNA 序列的多样性, 确定产甲烷菌和其它微生物的菌群结构。近年来, *mcrA* 基因的序列分析也被用于产甲烷菌的分类研究[1−3]。*mcrA* 基因编码甲基辅酶 M 还原酶(MCR)的 α 亚基, MCR 是甲烷合成的关键酶[4], 由两种操纵子 MCRI 和 MCRII 编码合成, MCRI 存在于目前研究的所有产甲烷菌中[3], 而 MCRII 只存在于甲烷球菌目(Methanococcales)和甲烷杆菌目(Methanobacteriales)[5]。

统计结果显示, 我国每年畜禽粪便总量高达 41.2×10^8 t, 其中鸡粪总量达 22.5×10^8 t, 约占畜禽粪便总量的一半, 成为农村户用沼气池的主要原料之一[6]。鸡粪沼气池的工程及运行研究报道较多, 但是目前没有针对鸡粪沼气池中产甲烷菌的菌群结构展开研究。本文采用分子生物学方法, 分析 16S rRNA 以及 *mcrA* 基因序列的多样性, 研究以鸡粪为主要发酵原料的沼气池产甲烷菌的菌群结构。同时利用气相色谱方法分析了沼气池中挥发性有机酸(VFA)的含量及产生的沼气主要成分及含量。

1 材料与方法

1.1 材料

沼液样品采自河北省农村某养鸡场的鸡粪沼气池, 该沼气池已稳定运行 1 年, 样品采自沼液液面以下 50 cm 处。

1.2 产甲烷菌的多样性分析

参考文献[7−8]所述的方法, 提取沼液样品中的宏基因组 DNA, 作为模板分别用于扩增 16S rDNA 基因和 *mcrA* 基因片段。PCR 产物经过回收纯化后, 克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 进行 DNA 序列测定, 将所得的DNA序列上传GenBank, 获得相应序列号。利用 Ribosomal Database Project II 软件 Classifier, 对分离的菌株进行分类[9]; 通过 BLAST 查找对比, 在 GenBank 的已知序列中进行同源性分析, 确定与分离菌株同源程度最高的序列; 用 MEGA4.0 软件, 构建系统发育树, 分析各分离菌株的进化地位[10]。

16S rDNA 基因扩增引物序列为[11−14]: Arch21F: 5′-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3′, Arch958R: 5′-YCCGGCGTTGAMTCCAATT- 3′。

mcrA 基因扩增引物序列为[15−16]: mcrF: 5′-TAYGAYCARATHTGGYT-3′, mcrR: 5′-ACRTTCATNGCRTARTT-3′。

1.3 挥发性脂肪酸(VFA)含量的测定

参考文献描述的气相色谱测定方法[17], 利用 Agilent GC-7890 气相色谱仪测定 VFA 的含量。样品经过预处理后, 直接用于乙酸、丙酸、丁酸和戊酸的测定。预处理的样品经过酯化, 用于甲酸的测定。

1.4 沼气中主要气体成分及其含量的测定

收集从鸡粪沼气池产生的气体, 参照文献[17]叙述的气相色谱测定方法, 利用日本岛津 GB-2014 气相色谱仪分析气体的组成。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 的多态性分析

扩增和克隆宏基因组 DNA 中古菌 16S rDNA 约 0.9 kb 片段, 构建鸡粪沼液的 16S rDNA 基因文库。随机选取 50 个含正确插入片段的克隆进行测序, 测序长度为 714 bp 到 813 bp, 覆盖了大部分 16S rRNA 的高度保守序列[18]。所得序列提交至 GenBank, 获得序列号为 GU247755-GU247804。

利用 BLAST 对序列进行查找比对, 最相似序列如表 1 所示。在 50 个克隆中, 46 个克隆的序列与产甲烷菌属(*Methanogenium*)的 *Methanogenium marinum* strain AK-1 菌株同源程度最高[19], 相似性为 99%−100%; 3 个克隆(KD525、KD526 和 KD567)均与甲烷袋状菌属(*Methanoculleus*)的 *Methanoculleus* sp. dm2 菌株同源程度最高, 相似性为 99%; 1 个克隆(KD519)与甲烷粒菌属(*Methanocorpusculum*)的 *Methanocorpusculum bavaricum* 菌株高度同源, 相似性为 99%。

进一步利用 16S rRNA 专业网站 Ribosomal Database Project II 提供的工具 Classifier, 对所测得的 16S rDNA 序列进行分析, 分类结果如表 1 所示。与 BLAST 查找结果相似, 50 个克隆子中有 46 个同属产甲烷菌属(*Methanogenium*), 占总克隆数的 92%; 其余 4 个分别属于甲烷袋状菌属(KD525、KD526 和 KD567)和甲烷粒菌属(KD519)。

journal.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

利用MEGA4.0软件分析50个克隆的16S rRNA序列，构建相应的系统进化树(图1A)。结果显示，46个与*Methanogenium marinum* strain AK-1菌株同源的克隆被分成两组，即Group A和Group B。进一步构建进化分支图Cladogram (图1B)，分析这些序列得出相同结论。一般认为，分析16S rRNA基因序列能够准确地将真细菌和古菌分类到属(Genus)的水平，如果同源程度少于97%的细菌，可以大致认为是不同的种类(Species)[20]。上述46个克隆虽然与*Methanogenium marinum* strain AK-1菌株同源程度为99%−100%，超过97%，可能是同一种类(Species)，但是分析结果显示，它们有两个不同的祖先。

2.2 *mcrA* 基因编码蛋白的系统分析

利用PCR方法扩增*mcrA*基因约0.5 kb片段，经过克隆和酶切鉴定，随机选取10个含正确插入片段的克隆测序，序列上传GenBank，获得相应的序列号GU247805-247809。核酸序列转化为氨基酸序列后进行比对，找出最相似序列，构建系统进化树，结果如图2所示。KD675、KD681和KD685均与甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)的菌株*Methanospirillum hungatei* JF-1一致性为93%，相似性为97%；KD679与产甲烷菌属(*Methanogenium*)的*Methanogenium organophilum*菌株一致性为96%，相似性为98%；而KD676与甲烷八叠球菌*Methanosarcina barkeri* str. Fusaro菌株的一致性为83%，相似性为90%。其余5个克隆的序列，在进行BLAST比对时发现它们与GenBank中已知序列同源性很低，没有进行系统分析。

表1 产甲烷菌16S rDNA的系统分类

Table 1 Phylogenetic affiliation of 16S rDNA gene sequences of methanogens

克隆名称 Clone designation[a]	序列长度 Sequence length (bp)	克隆数 No. of clones[b]	同源性最高的序列(序列号) Most similar strains (Accession No.)	相似性(%) Similarity (%)	分类 Affiliation group
KD498 to KD569	714 to 813	46 (92)	*Methanogenium marinum* strain AK-1 (DQ177344)	99 to 100	产甲烷菌属 *Methanogenium*
KD525, KD526, KD567	742, 718, 787	3 (6)	*Methanoculleus* sp. dm2 (AJ550158)	99	甲烷袋状菌属 *Methanoculleus*
KD519	757	1 (2)	*Methanocorpusculum bavaricum* (AY196676)	99	甲烷粒菌属 *Methanocorpusculum*

注: a: KD498 to KD569, 包括50个克隆中除去KD519、KD525、KD526和KD567的所有克隆; b: 括号中数字为占克隆总数的百分比.
Note: a: KD498 to KD569, including all clones except KD519, KD525, KD526, and KD567; b: The number in brackets means the percentage of each type of clone in all clones.

journals.im.ac.cn

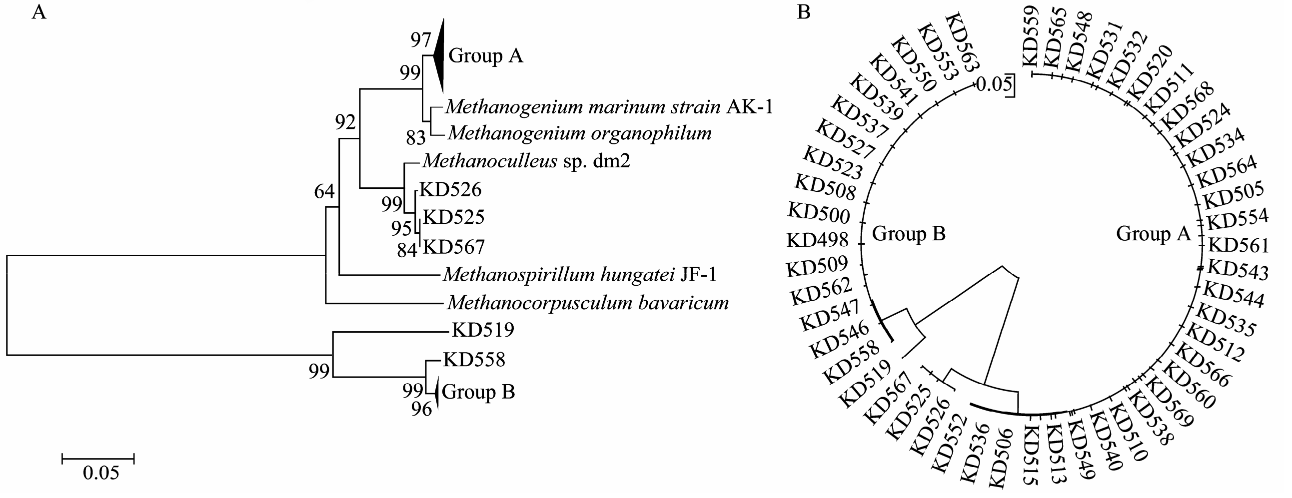

图1 16S rRNA基因序列的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequences

Note: A: Phylogram tree of the 50 clones and 5 reference strains. B: Cladogram tree of the 50 clones. Group A contains KD505, KD506, KD510, KD511, KD512, KD513, KD515, KD520, KD524, KD531, KD532, KD534, KD535, KD536, KD538, KD540, KD543, KD544, KD548, KD549, KD552, KD554, KD559, KD560, KD561, KD564, KD565, KD566, KD568, and KD569. Group B contains KD498, KD500, KD508, KD509, KD523, KD527, KD537, KD539, KD541, KD546, KD547, KD550, KD553, KD558, KD562, and KD563.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.3 挥发性脂肪酸(VFA)测定

沼液中挥发性脂肪酸(VFA)含量测定结果如图3所示，甲酸含量最高为28.85 g/L，约占总酸含量的81.7%；乙酸含量为3.99 g/L，约占11.3%；丙酸含量为1.60 g/L；丁酸含量为0.83 g/L；戊酸含量最少为0.023 g/L。

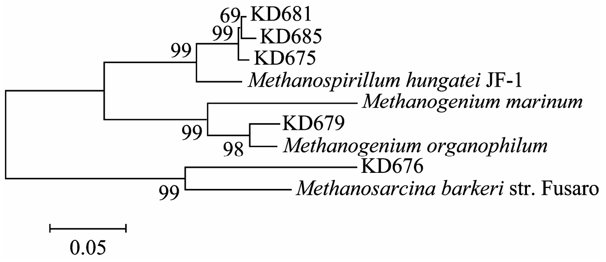

图2 ***mcrA*** **基因编码蛋白氨基酸序列的系统分析**
Fig. 2 Phylogenetic analysis of amino acid sequences encoded by *mcrA* genes

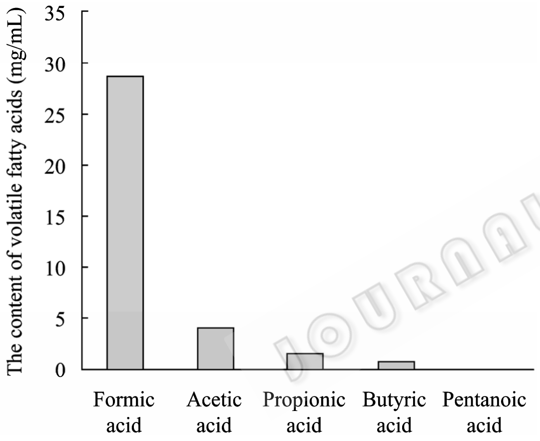

图3 挥发性脂肪酸含量测定
Fig. 3 Measurement of the content of volatile fatty acids

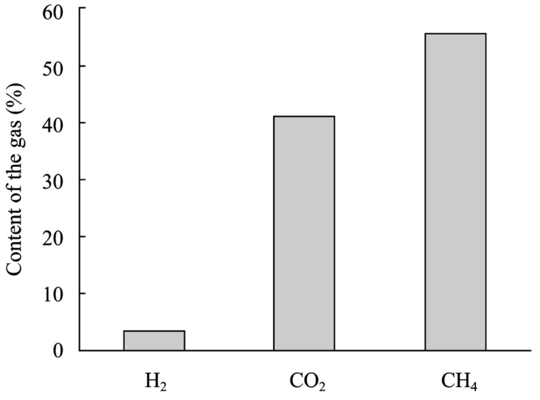

图4 沼气气体组成分析
Fig. 4 GC analysis of the composition and content of the biogas from the anaerobic digester with chicken feces

2.4 沼气中主要气体成分及其含量的测定

按照实验材料与方法中所述，利用气相色谱方法测定鸡粪沼气池发酵所产沼气的主要气体成分及含量，结果如图4所示。CH_4占气体总量的55.5%，CO_2占41.1%，H_2占3.2%，另外还检测到极少量C_3H_6气体。

3 讨论

16S rDNA和*mcrA*基因的分析结果有较大的出入，主要原因可能是由于产甲烷菌*mcrA*基因的多样性，已知PCR引物不能检测到所有已知或未知的产甲烷菌[2,21]。本研究对10个*mcrA*基因克隆进行分析，只有5个克隆与已知的*mcrA*基因具有较高的同源性，从另一个角度也说明*mcrA*基因的保守程度可能与原来估计的程度有所不同。另外，本研究分析*mcrA*基因克隆数目较少，也可能是造成分析结果不同的部分原因。

本研究采用分子生物学方法，首次分析了以鸡粪为主要发酵原料的沼气池的优势产甲烷菌群，结果发现产甲烷菌属(*Methanogenium*)占总数的92%，与其它发酵基质中的产甲烷菌群不同[22–23]，但是与鸡粪中分离出的产甲烷菌相一致，均属于产甲烷菌属[24]，说明发酵基质是决定沼气池中的产甲烷菌优势菌群的主要原因。

Methanogenium marinum strain AK-1属于嗜冷产甲烷菌，最适生长温度为25°C，最低生长温度为5°C，最适pH值为6.0–6.6，利用H_2或甲酸来还原CO_2产生甲烷[19]。本研究发现，该沼气池中甲酸含量占挥发性有机酸总量的81.7%，H_2的含量占气体总量的3.2%，说明该沼气池优势菌的产甲烷方式，可能与*Methanogenium marinum* strain AK-1相同。

参考文献

[1] Hales BA, Edwards C, Ritchie DA, *et al*. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog feat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and environmental Microbiology*, 1996(62): 668–675.

[2] Luton PE, Wayne JM, Sharp RT, *et al*. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 2002(148): 3521–3530.

[3] Springer E, Sachs MS, Woese CR, *et al*. Partial

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

gene-sequences for the A-subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1995(45): 554–559.

[4] Ermier U, Grabarse W, Shima S, *et al*. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*, 1997(278): 1457–1462.

[5] Lueders T, Chin KJ, Conrad R, *et al*. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology*, 2001(3): 194–204.

[6] 李轶冰, 杨改河. 中国农村户用沼气主要发酵原料资源量的估算. 资源科学, 2009, **31**(2): 231–237.

[7] Bruns MA, Zhou JZ, Tiedje JM. DNA recovery from soil of diverse composition. *Applied and environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 316–322.

[8] 张瑞福, 曹慧, 崔中利. 一种土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. 微生物学报, 2004, **43**(2): 276–282.

[9] Tiedje JM, Wang QG, Garrity M, *et al*. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(16): 5261–5267.

[10] Dudley J, Tamura K, Nei M, *et al*. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007(24): 1596–1599.

[11] Reed WD, Fujita Y, Delwiche EM, *et al*. Microbial communities from methane Hydrate-Bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(8): 3759–3770.

[12] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci*, 1992(89): 5685–5689.

[13] Hisako H, Michinari S. Culture-dependent and independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(23): 7642–7656.

[14] Deborah S, Kelley MO, Schrenk JR, *et al*. Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active Deep-Sea sulfide chimney. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(6): 3580–3592.

[15] Ashita D, Mark L. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the guaymas basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(8): 4592–4601.

[16] Erik S, Matthew S, Woese AR, *et al*. Partial gene sequences for the a subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**(3): 554–559.

[17] 焦瑞身, 周德庆. 微生物生理代谢实验技术. 北京: 科学出版社, 1990: 152–158.

[18] 方再光, 黄惠琴, 张开山, 等. 海绵 *Pachychlina* sp.体内古菌多样性非培养技术分析. 微生物学报, 2005, **45**(1): 121–124.

[19] Chong SC, Liu Y, Cummins M. *Methanogenium marinum* sp. Nov, a H_2-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H_2 utilization. *Ant onie van Leeuwenhoek*, 2002, **81**(3): 263–270.

[20] Goebel BM, Stackebrandt E. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, **94**(44): 846–849.

[21] Lueders T, Chin KJ, Conrad R, *et al*. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) gene in rice feld soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol*, 2001(3): 194–204.

[22] Regan JM, Steinberg LM. *McrA*-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(13): 443–542.

[23] 汪婷. 沼气发酵过程中产甲烷菌分子多样性研究及产甲烷菌的分离. 南京农业大学硕士学位论文, 2002.

[24] Miller TL, Wolin MJ, Kusel EA. Isolation and characterization of methanogens from animal feces. *Syst Appl Microbiol*, 1986(8): 234–238.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn