

T-RFLP 分析厌氧真菌传代频率对共存产甲烷菌菌群的影响

李袁飞 成艳芬* 朱伟云

(南京农业大学 消化道微生物研究室 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】建立瘤胃产甲烷菌 T-RFLP 多样性分析方法, 并研究厌氧真菌与产甲烷菌共培养液在不同时间传代对共存产甲烷菌菌群的影响。【方法】利用产甲烷菌 *mcrA* 基因特异性引物 PCR 扩增后, 选择合适内切酶对扩增产物进行内切, 分析内切后末端片段长度多态性, 测定共培养液在不同传代频率时共存产甲烷菌多样性的变化。【结果】利用 *Msp I* 内切酶分析发现, 末端片段长度约为 470 bp 的产甲烷菌为共培养液中的优势甲烷菌, 共培养液传代至第 15 代时, 片段长度约为 130 bp 和 200 bp 的产甲烷菌也成为共培养中的优势菌株; 比较发现, *Taq I* 能更好地内切共培养液中甲烷菌 *mcrA* 基因序列, 瘤胃内容物及 3 d 传代共培养液中产甲烷菌主要为末端片段长度约为 70、100、200、270、300、330 和 470 bp 的菌株, 共培养液在体外传代培养过程中, 末端片段长度约为 70、100、270 和 470 bp 的产甲烷菌变化更为显著。*Taq I* 比较分析不同传代频率(3、5 和 7 d)对共培养液中产甲烷菌菌群结构的影响表明, 3 d 传代的共培养液中产甲烷菌菌群与瘤胃内容物较为相似, 而 5 d 和 7 d 传代的共培养液中产甲烷菌菌群间差异较小, 但与瘤胃内容物差异较大, 导致不同传代频率的共培养液中产甲烷菌菌群间显著差异的最主要菌株为末端片段长度约为 100 bp 的产甲烷菌, 其次为末端片段长度约为 70 bp 和 270 bp 的产甲烷菌。【结论】利用建立的快速可行的瘤胃产甲烷菌 T-RFLP 方法分析表明, 传代频率显著影响厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中产甲烷菌的菌群结构, 3 d 传代共培养液内产甲烷菌群与瘤胃内容物更相似。

关键词: 厌氧真菌, 产甲烷菌, 末端限制性片段长度多态性

Effects of transfer frequency on community of methanogens co-cultured with anaerobic fungi by T-RFLP

LI Yuan-Fei CHENG Yan-Fen* ZHU Wei-Yun

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] A molecular-based approach, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), for community analysis of ruminal methanogens was developed and used to assess the

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31101735); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. KYZ201312)

*通讯作者: Tel: 86-25-84395523; Fax: 86-25-84395314; ✉: yanfencheng@njau.edu.cn

收稿日期: 2014-06-30; 接受日期: 2014-09-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-09

effects of transfer frequency on the community of methanogens co-cultured with anaerobic fungi. **[Methods]** The specific primers for *mcrA* genes were used to amplify the *mcrA* genes of methanogens and the amplicons were then digested with restriction enzymes. The size of each of the individual resulting terminal fragments were detected using DNA sequencer. **[Results]** With the analysis by *Msp* I, the dominant methanogens co-cultured with anaerobic fungi were those with terminal fragment of 470 bp and those of 130 bp and 200 bp were also dominant in the 15th transfers of 3-day co-cultures. Comparative study with *Taq* I showed that the dominant methanogens both in rumen digesta and 3-day co-cultures were those with terminal fragment of 70, 100, 200, 270, 300, 330 and 470 bp. The methanogens of 70, 100, 270 and 470 bp changed dramatically during *in vitro* transfers. Subsequently, the effects of transfer frequency on community of methanogens co-cultured with anaerobic fungi were assessed by *Taq* I and results showed that the community of methanogens in 3-day co-cultures was similar with rumen digesta, while they are significantly different from those in 5- and 7-day co-cultures, which was resulted from the shift of methanogens with terminal length of 100, 70 and 270 bp. **[Conclusion]** The molecular-based approach, T-RFLP, was suitable for analysis of ruminal methanogens. The community of methanogens co-cultured with anaerobic fungi was significantly affected by transfer frequency of the co-cultures, and that in 3-day co-cultures was similar to that in the rumen digesta.

Keywords: Anaerobic fungi, Methanogens, T-RFLP

全球气候变暖现象越来越引起人们的关注,并成为研究热点。IPCC^[1]报告指出,甲烷是第二大温室气体,2005年大气中甲烷浓度达到1 774 ppb,已经远远超过了过去65万年的自然范围。报告同时还指出,反刍动物瘤胃甲烷排放是甲烷排放的主要部分,占全球甲烷排放量的13%–19%^[2]。因此,近年来减少反刍动物甲烷排放的措施及反刍动物瘤胃甲烷生成机理研究受到广泛关注。

反刍动物瘤胃甲烷由产甲烷菌利用氢气、二氧化碳、甲酸、乙酸等简单化合物经过一系列酶促反应后生成,而这些简单化合物则是瘤胃内其他微生物如厌氧真菌、纤维降解细菌及原虫等降解日粮产生^[3]。厌氧真菌是瘤胃内重要的纤维降解菌之一。为了研究瘤胃内微生物间的代谢关系,成艳芬等^[4]根据厌氧真菌与产甲烷菌对抗生素的敏感性,建立了来自反刍动物瘤胃的厌氧真菌与产甲烷菌体外共培养体系,并对这种共培养体系进行了每3 d一次的连续传代后研究发现,共培养体系中的瘤胃产甲烷菌能与厌氧真菌共存并适应每3天传代的体外培养条件,这可能与共培养体系中厌氧真菌的生长代谢相关。厌氧真菌在体外传代培养过程中,一般需要每3 d传代一次,传代时间延长会影响厌氧真

菌的生长代谢,甚至导致厌氧真菌死亡。那么延长传代时间对厌氧真菌与产甲烷菌共培养体系中产甲烷菌会产生怎样的影响尚不清楚。

甲基辅酶M还原酶(MCR)是产甲烷菌生成甲烷最后一步反应的催化酶,将与CoM连接的甲基还原成甲烷。MCR只存在于产甲烷菌中,由3个不同的亚单位(α , β , γ)以 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 的方式排列,分子量约为300 kD。*mcrA*基因编码MCR的 α 亚单位,在进化过程中高度保守,也相对有一些变化,是较好的分析、鉴定产甲烷菌种类及多态性的基因,在瘤胃产甲烷菌多态性分析方面应用非常广泛^[5-7]。本研究利用产甲烷菌特异性*mcrA*基因,选择合适内切酶,建立了产甲烷菌末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphisms, T-RFLP)分析方法,并通过该方法研究了不同传代频率对厌氧真菌与产甲烷菌共培养系统中产甲烷菌菌群的影响,旨在为揭示瘤胃内厌氧真菌与产甲烷菌间的相互关系提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 瘤胃厌氧真菌与产甲烷菌共培养液的富集培养与传代:瘤胃内容物采自饲喂青草的装有永久

性瘤胃瘘管的奶牛,培养基参照 Davies 等^[8]方法配制,由缓冲液、基础培养基、无细胞瘤胃液、还原剂及氧化还原指示剂组成。底物为粉碎的直径约为 1 mm 的大麦秸,添加量为 1% (质量体积比)。瘤胃内容物 10 g 与厌氧稀释液^[9]40 mL 混合均匀后抽取 30 mL 加到预热至 39 °C、含有 2 g/L 氨苄青霉素的 3 瓶 90 mL 液体培养基中(10 mL/瓶),于 39 °C 分别静置培养 3、5、7 d。此过程重复 2 次,共 3 个重复,每个重复独立传代。每 3 d 传代一次的共培养液共传代 15 次,每 5、7 d 传代一次的共培养液各传代 9 次。

1.1.2 主要试剂和仪器: BIO101 FastDNA SPIN DNA 提取试剂盒, QBiogene, UK; FastPrep 珠磨仪, QBiogene, UK; *Taq* 酶, Promega, UK; PCR 仪(2720) Applied Biosystems, UK; CEQ 8000 基因分析仪, Beckman Coulter, UK。

1.2 总 DNA 提取

取 3 d 传代的共培养液第 2、4、9、15 代上清液及 5 d 和 7 d 传代的共培养液第 9 代上清液各 5 mL, 13 000 r/min 离心 5 min, 1 mL 磷酸缓冲液冲洗沉淀,离心后的沉淀及 20 mg 用于接种的瘤胃内容物 -20 °C 保存,用于 DNA 提取。DNA 提取参照 BIO101 FastDNA SPIN DNA 提取试剂盒使用说明进行,样品破壁过程稍有改动:珠磨仪上破壁 3 次,每次 30 s,中间间隔 30 s,将样品置于冰上冷却。

1.3 产甲烷菌 T-RFLP 分析

利用产甲烷菌通用引物 MLf (5'-GGTGGTGTM GGATTCACACARTAYGCWACAGC-3')和 MLr (5'-TTCATTGCRTAGTTWGG-RTAGTT-3')扩增长度约为 500 bp 的产甲烷菌 *mcrA* 基因^[10],下游引物 5'端带有 D4 荧光标记。PCR 反应体系总体积为 25 μ L,含 1 \times PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 1.75 mmol/L MgCl₂, 800 μ mol/L dNTPs, 500 nmol/L 上、下游引物, 1.25 U *Taq* DNA 聚合酶, 25 ng 模板 DNA。每个样品有 3 个重复。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 95 °C 30 s,

55 °C 30 s, 72 °C 7 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

将每个样品 3 个重复的 PCR 产物混合,用 MultiScreen PCR _{μ 96} Filter Plates 纯化 PCR 产物,用内切酶 *Taq* I 或 *Msp* I 对纯化后的 PCR 产物进行酶切。*Taq* I 的酶切反应体系为(总体积 20 μ L): 50 ng 纯化的 PCR 产物, 1 \times 酶切缓冲液, 10 U *Taq* I, 65 °C 酶切 5 h。*Msp* I 的酶切反应与 *Taq* I 相似,其反应体系中还含有 2 μ g BSA, 37 °C 酶切 5 h。酶切产物用 Montage SEQ₉₆ Cleanup Kit 试剂盒纯化,在 CEQ 8000 基因分析仪中进行末端片段长度的分析, DNA Size Standard Kit-600 用作内参,数据通过 CEQ 分析软件输出(含片段长度、片段峰高,峰面积等),峰面积小于最大峰面积 1% 的片段被认为是假阳性,后续分析中予以排除,数据导入 Fingerprinting II 软件进行相似性分析, SIMCA-P 软件进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 *Msp* I 内切分析与厌氧真菌共存的产甲烷菌多态性随传代次数的变化

本试验选取了代表性产甲烷菌菌株(GenBank 登录号: AB125111、AB244684、AB244692、AF313802、AF313804、AF313806、AY260437、AY260438、AY260439、AY260440 和 AY260441)的 *mcrA* 基因片段,同时选择了 *Hae* III (酶切位点 GG'CC)、*Hha* I (酶切位点 GCG'C)、*Msp* I (酶切位点 C'CGG)和 *Taq* I (酶切位点 T'CGA) 4 种内切酶,通过比较研究发现,内切酶 *Msp* I 与 *Taq* I 能较好地酶切产甲烷菌 *mcrA* 基因片段,因此本研究利用这两种内切酶分析 3 d 传代的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中产甲烷菌菌群随传代次数的变化。

Msp I 酶切 3 d 传代厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中产甲烷菌 *mcrA* 基因后的末端片段长度多态性分析图谱见图 1。由图 1 可知,瘤胃内容物中产甲烷菌主要是末端片段长度约 470 bp 的菌株,占 48.0% (按峰面积计算)。共培养液第 2、4、9 和 15

代中该菌分别占 59.5%、51.7%、44.5%和 13.9%。共培养液第 15 代中,除上述产甲烷菌外,长度约为 130 bp 和 200 bp 的产甲烷菌也是其中的优势菌株。末端片段长度约为 130 bp 的产甲烷菌在瘤胃内容物及共培养液中的比例分别为 4.9%、12.0%、13.2%、5.3%和 18.0%;末端片段长度约 200 bp 的产甲烷菌在瘤胃内容物及共培养液第 9 和 15 代中的比例分别为 3.5%、12.9%和 38.2%,该菌在共培养液第 2 和第 4 代未能检出。由此可知,末端片段长度约为 470 bp 的产甲烷菌在瘤胃内容物中占优势,在体外培养过程中逐渐减少,至第 15 代时仍为共培养液中的优势菌群;末端片段长度约为 130 bp 和 200 bp 的产

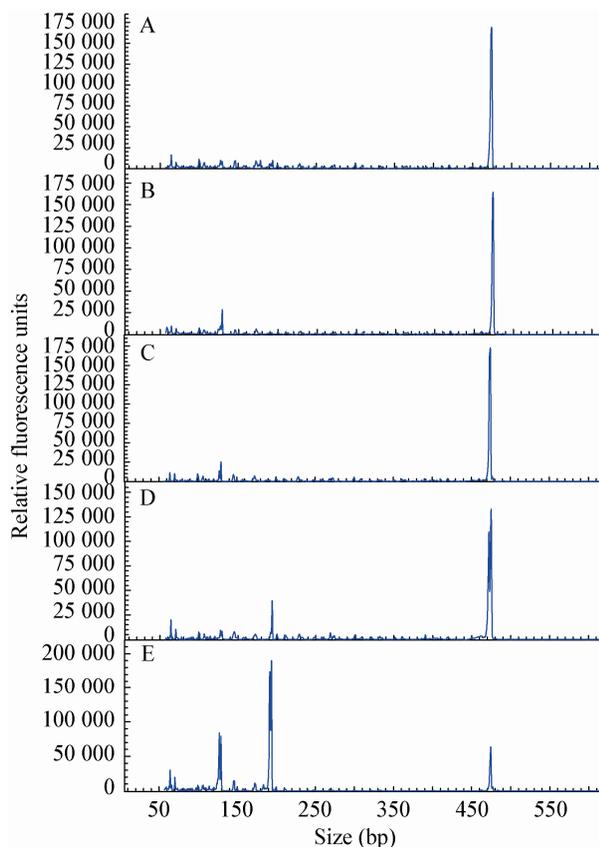


图 1 3 d 传代共培养液中产甲烷菌 T-RFLP 分析图谱 (*Msp I*)

Figure 1 T-RFLP profiles (*Msp I*) of methanogens in 3-day co-cultures

注: A: 接种瘤胃内容物; B-E: 第 2、4、9、15 代共培养液。
Note: A: Inoculum; B-E: The 2nd, 4th, 9th and 15th transfer of co-cultures.

甲烷菌在瘤胃内容物中所占比例较小,在体外培养过程中得到富集,到第 15 代时已经成为共培养液中的优势菌群。

对不同传代次数的共培养液中产甲烷菌菌群进行 O-PLS 分析(图 2),结果显示,瘤胃内容物及不同传代次数的共培养液中产甲烷菌菌群间差异显著,表现为得分图上分离效果很好,并且有较高的相关系数 Q^2 (cum)=96.6%。由载荷图可知,导致瘤胃内容物及不同传代次数的共培养液中产甲烷菌菌群间显著差异的主要菌株为末端片段长度约为 474 bp 的产甲烷菌,其次为末端片段长度约为 200 bp 的产甲烷菌。

2.2 *Taq I* 内切分析与厌氧真菌共存的产甲烷菌多态性随传代次数的变化

Taq I 酶切 3 d 传代厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中产甲烷菌 *mcrA* 基因后的 T-RFLP 分析图谱见图 3。由图 3 可知,瘤胃内容物中产甲烷菌主要是末端片段长度约为 70、100、200、270、300、330 和 470 bp 的菌株,占总产甲烷菌的比例分别为 22.1%、17.1%、4.4%、35.5%、4.3%、5.2%和 11.4%。末端片段长度约为 70 bp 的产甲烷菌在共培养液第 2、4 和 9 代比较稳定,分别占总产甲烷菌的 19.6%、19.2%和 23.6%,但到第 15 代时,该菌在共培养液中的比例急剧下降,只占总产甲烷菌的 7.9%。末端片段长度约为 100 bp 的产甲烷菌在共培养液第 2 代占总产甲烷菌的 34.0%;第 4 和第 9 代共培养液中该片段峰面积小于最大峰面积的 1%,因此被认为是假阳性的,即第 4 和第 9 代共培养液中未检测出该产甲烷菌;但第 15 代共培养液中该菌重新出现,成为共培养液中的优势菌之一,占总产甲烷菌的 12.1%。末端片段长度约为 200 bp 的产甲烷菌在瘤胃内容物及共培养液第 2、4 代均被检测到,但占总产甲烷菌的比例较低,第 9 和第 15 代共培养液中该片段峰面积小于最大峰面积的 1%,认为未能检测到该产甲烷菌。末端片段长度约为 270 bp 的产甲烷菌为瘤胃内容物中最主要的优势菌,该菌在共培养液中一直存在,但其所占比例随着传代次数增加呈下降

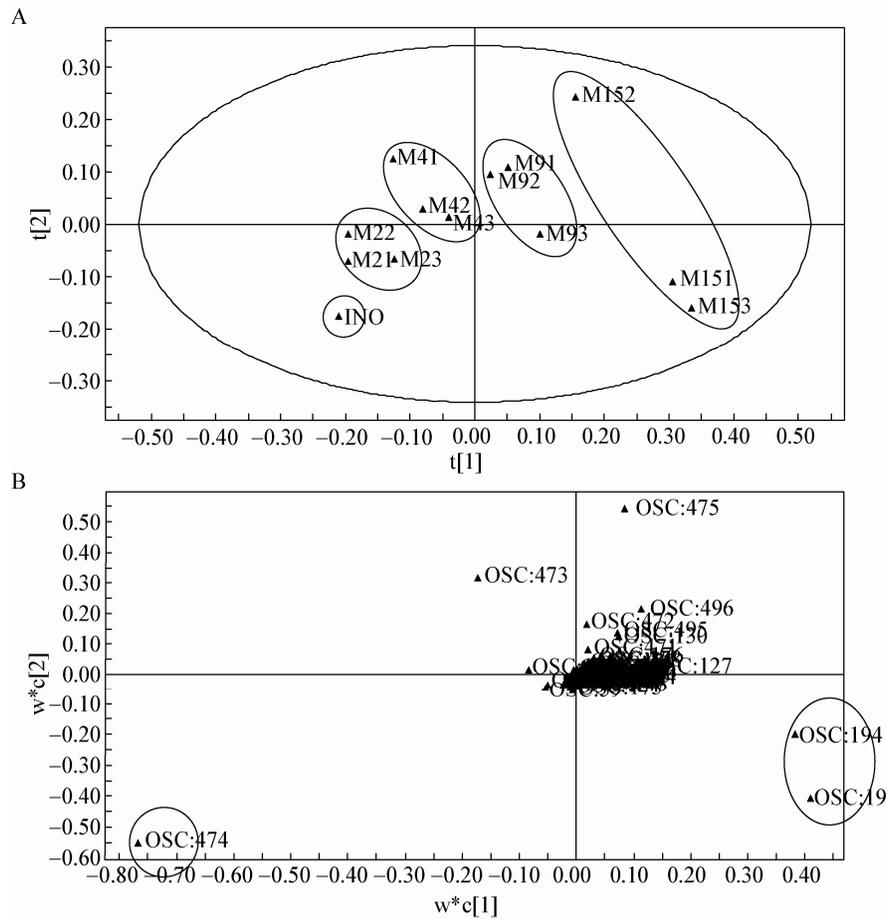


图2 O-PLS 分析共培养液中产甲烷菌菌群

Figure 2 O-PLS profiles of community of methanogens in co-cultures

注: A: 得分图; B: 载荷图. $R^2X(c_{\mu m})=62.9\%$; $R^2Y(c_{\mu m})=98.5\%$; $Q^2(c_{\mu m})=96.6\%$.

Note: A: Score plot; B: Loading plot. $R^2X(c_{\mu m})=62.9\%$; $R^2Y(c_{\mu m})=98.5\%$; $Q^2(c_{\mu m})=96.6\%$.

趋势,分别占总产甲烷菌的 14.0%、9.4%、11.5% 和 4.2%。末端片段长度约为 300 bp 的产甲烷菌在共培养液中也一直存在,其所占总产甲烷菌的比例分别为 1.1%、8.7%、4.5%和 6.0%。末端片段长度约为 330 bp 的产甲烷菌在共培养液中也一直存在,其所占总产甲烷菌的比例分别为 4.7%、4.9%、8.6%和 1.9%。末端片段长度约为 470 bp 的产甲烷菌在共培养液中所占比例随传代次数增加呈逐渐上升趋势,分别占总产甲烷菌的 12.0%、32.0%、34.9%和 38.0%。

对共培养液中产甲烷菌 T-RFLP 图谱(*Taq* I)进行 O-PLS 分析(图 4),结果显示,瘤胃内容物及不同传代次数的共培养液中产甲烷菌菌群间差异显

著,表现为得分图上分离效果很好,并且有较高的相关系数 $Q^2(c_{\mu m})=93.3\%$ 。由载荷图可知,导致瘤胃内容物及不同传代次数的共培养液中产甲烷菌群间显著差异的主要菌株分别为末端片段长度约为 70、100、270 和 470 bp 的产甲烷菌。

2.3 不同传代频率对厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中产甲烷菌菌群的影响

以上分析结果显示,与 *Msp* I 相比,内切酶 *Taq* I 能更好地酶切瘤胃内容物及共培养液样品中产甲烷菌 *mcrA* 基因片段,获得较多的酶切片段,因此研究不同传代频率对共培养液中产甲烷菌菌群的影响时所用内切酶为 *Taq* I。

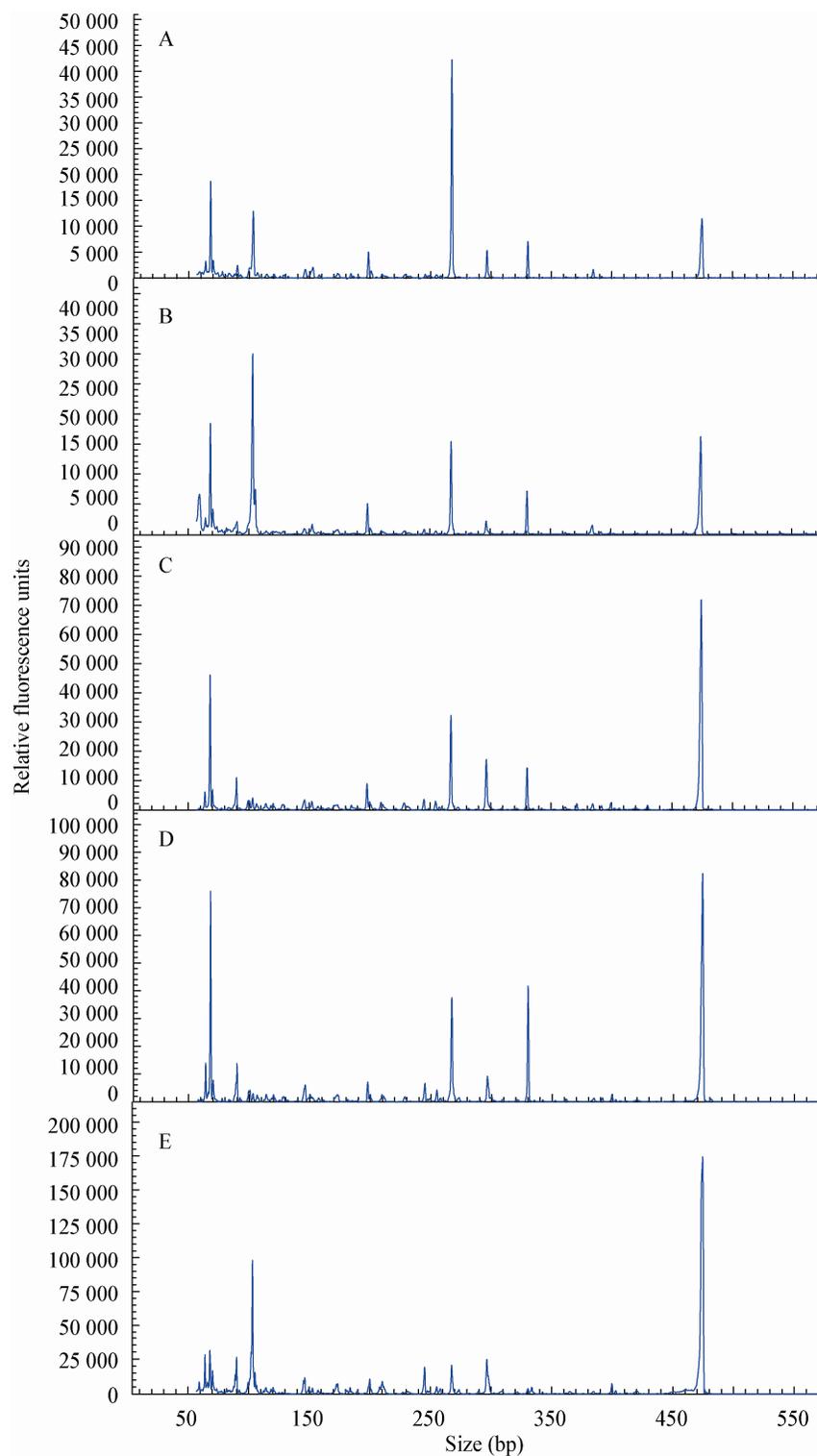


图3 3 d 传代共培养液中产甲烷菌 T-RFLP 分析图谱(*Taq I*)

Figure 3 T-RFLP profiles (*Taq I*) of methanogens in 3-day co-cultures

注：A：接种瘤胃内容物；B-E：第2、4、9、15代共培养液。

Note: A: Inoculum; B-E: The 2nd, 4th, 9th, and 15th transfer of co-cultures.

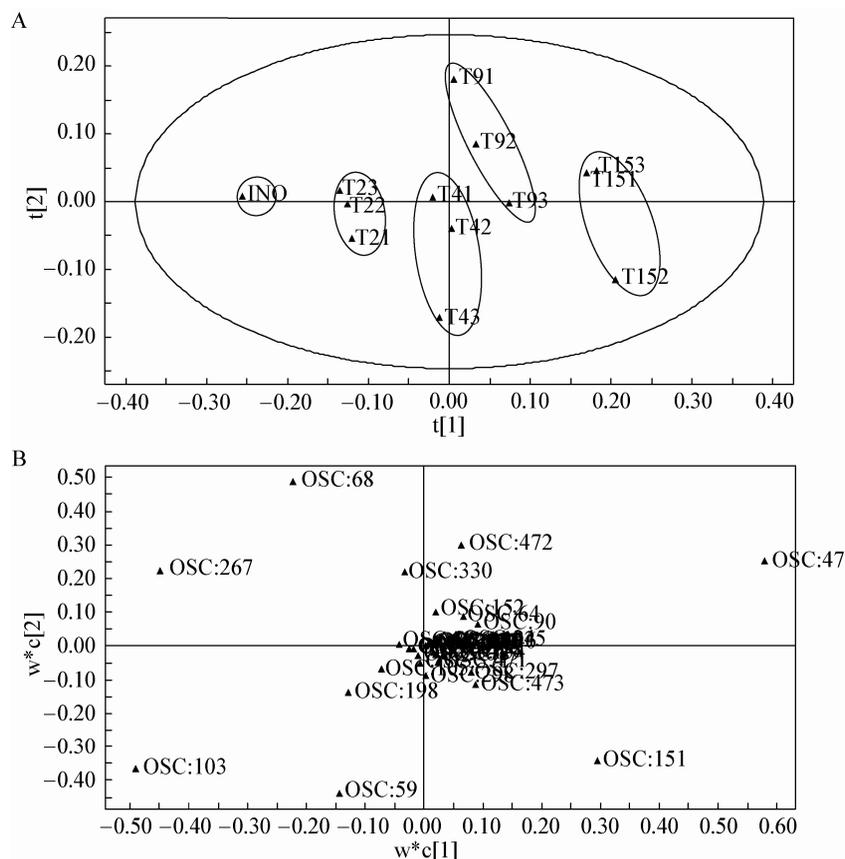


图 4 O-PLS 分析共培养液中产甲烷菌菌群

Figure 4 O-PLS profiles of community of methanogens in co-cultures

注: A: 得分图; B: 载荷图。 R^2X ($c_{\mu m}$)=51.6%; R^2Y ($c_{\mu m}$)=98.8%; Q^2 ($c_{\mu m}$)=93.3%。

Note: A: Score plot; B: Loading plot. R^2X ($c_{\mu m}$)=51.6%; R^2Y ($c_{\mu m}$)=98.8%; Q^2 ($c_{\mu m}$)=93.3%。

图 5 为不同传代频率(3、5 和 7 d)的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液第 9 代 T-RFLP 图谱。3 d 传代的共培养液中的优势产甲烷菌为末端片段长度约为 70、90、150、270、300、330 和 470 bp 的菌株, 占总产甲烷菌的比例分别为 23.6%、4.2%、3.2%、11.5%、4.5%、8.6%和 34.9%。5 d 传代的共培养液中的优势产甲烷菌为末端片段长度约为 70、100、150、300 和 470 bp 的菌株, 占总产甲烷菌的比例分别为 7.0%、29.5%、23.5%、8.2%和 15.3%。7 d 传代的共培养液中的优势产甲烷菌为末端片段长度约为 70、100、150、300 和 470 bp 的菌株, 占总产甲烷菌的比例分别为 4.6%、49.9%、15.9%、3.8%和 19.6%。

T-RFLP 图谱的相似性分析结果能更直接地反映出不同传代频率共培养液中产甲烷菌的菌群变

化情况(图 6)。3 d 传代的共培养液与瘤胃内容物处于同一分支, 而 5 d 和 7 d 传代的共培养液处于另一独立分支, 说明 3 d 传代的共培养液中产甲烷菌菌群与瘤胃内容物较为相似, 而 5 d 和 7 d 传代的共培养液中产甲烷菌菌群间差异较小, 但与瘤胃内容物的差异较大。

对不同传代频率的共培养液中产甲烷菌 T-RFLP 图谱进行 O-PLS 分析(图 7), 结果显示, 不同传代频率的共培养液中产甲烷菌菌群间差异显著, 并且有较高的相关系数 Q^2 ($c_{\mu m}$)=99.8%。由载荷图可知, 导致不同传代频率的共培养液中产甲烷菌菌群间显著差异的最主要菌株为末端片段长度约为 100 bp 的产甲烷菌, 其次为末端片段长度约为 70 bp 和 270 bp 的产甲烷菌。

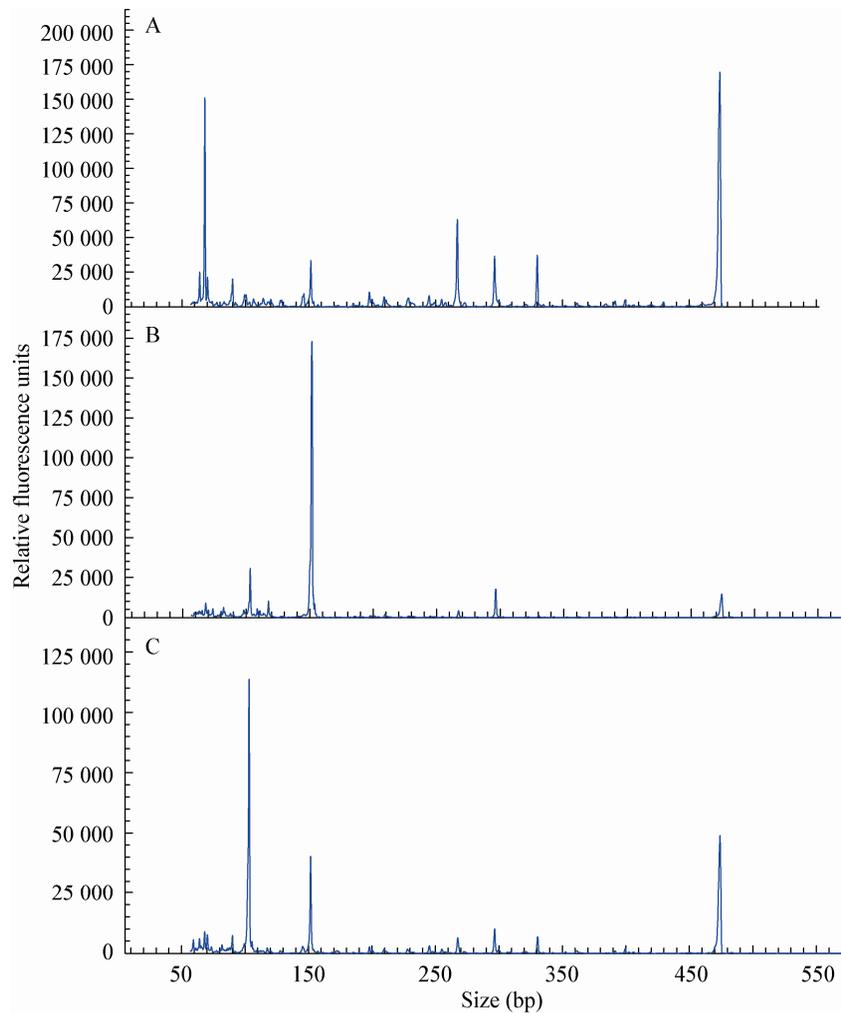


图5 不同传代频率第9代共培养液中产甲烷菌 T-RFLP 分析图谱

Figure 5 T-RFLP profiles of methanogens in 9th transfer of co-cultures with different transfer frequency

注：A-C：3、5、7 d 的传代共培养液。

Note: A-C: 3-, 5-, 7-day co-cultures.

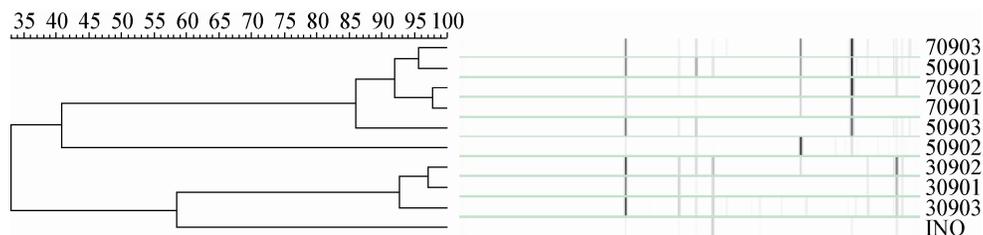


图6 不同传代频率共培养液中产甲烷菌相似性分析

Figure 6 Cluster analysis of T-RFLP fragments of methanogens in co-cultures with different transfer frequency

注：INO：接种瘤胃内容物；30901-30903：3 d 传代共培养物第9代3个重复；50901-50903：5 d 传代共培养物第9代3个重复；70901-70903：7 d 传代共培养物第9代3个重复。

Note: INO: Inoculum; 30901-30903: The 9th transfer of 3-day co-cultures; 50901-50903: The 9th transfer of 5-day co-cultures; 70901-70903: The 9th transfer of 7-day co-cultures.

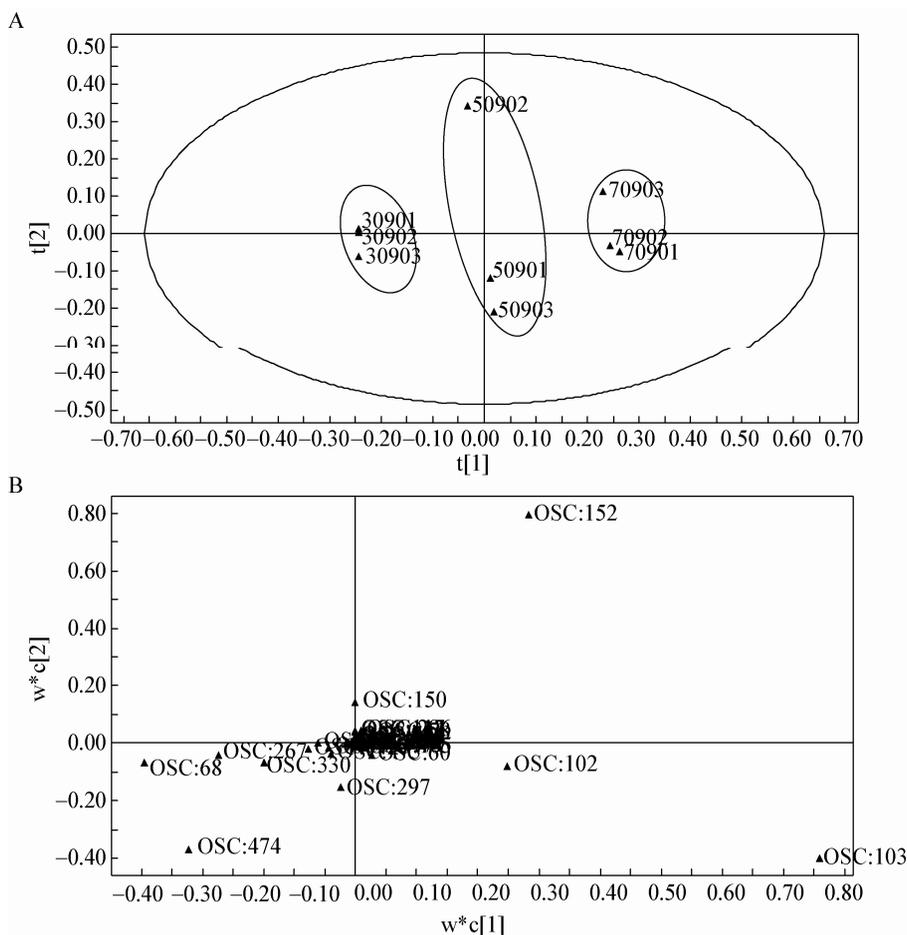


图7 O-PLS 分析不同传代频率对共培养液中甲烷菌菌群结构的影响

Figure 7 O-PLS analysis of methanogens in co-cultures with different transfer frequency

注: A: 得分图; B: 载荷图。 R^2X (c_{um})=84.2%; R^2Y (c_{um})=99.9%; Q^2 (c_{um})=99.8%。

Note: A: Score plot; B: Loading plot. R^2X (c_{um})=84.2%; R^2Y (c_{um})=99.9%; Q^2 (c_{um})=99.8%。

3 讨论

基于 PCR 的微生物多态性分析方法由于省时、省事、省力的特点已被广泛应用。T-RFLP 分析方法是微生物分子生态学重要的分析方法之一, 可以通过合适的内切酶获得相应的末端片段并能在较短时间内获得大量的 T-RFLP 数据^[11]。Wang 等^[12]利用 T-RFLP 方法分析了酮病奶牛瘤胃细菌菌群结构变化与挥发性脂肪酸的关系, Khafipour 等^[13]利用该方法研究了瘤胃微生物菌群结构与亚急性酸中毒的关系。目前还没有关于瘤胃产甲烷菌 T-RFLP 分析的报道。而瘤胃产甲烷菌由于其在反

刍动物甲烷排放中的重要作用受到广泛关注, 瘤胃内甲烷菌菌群结构也一直是研究热点^[14-16]。因此, 本文根据产甲烷菌 *mcrA* 基因特点, 利用合适的内切酶, 结合毛细管电泳, 建立了产甲烷菌 T-RFLP 分析方法。结果显示, 该方法能快速有效地获得产甲烷菌 *mcrA* 基因末端片段长度, 并结合相应软件分析能比较形象地反映不同样品中产甲烷菌的菌群结构, 并对不同样品内甲烷菌菌群结构进行比较, 是研究产甲烷菌多态性的一种较好的方法。

本研究利用 T-RFLP 方法分析了与厌氧真菌共存的产甲烷菌随传代次数增加的菌群变化情况。结

果表明,产甲烷菌菌群随着传代次数增加发生了明显改变,共培养体系中的某些产甲烷菌(如末端片段长度为 470 bp (*Taq* I)的产甲烷菌)得到富集,而某些产甲烷菌则逐渐消失(如末端片段长度为 200 bp (*Taq* I)的产甲烷菌),这可能与共存的厌氧真菌密切相关。结合成艳芬等^[4,17]对山羊瘤胃厌氧真菌与产甲烷菌共培养液的分析及奶牛厌氧真菌菌群分析发现,共培养液中厌氧真菌的种类不同则与厌氧真菌共存的产甲烷菌种类也有所不同。山羊瘤胃液获得的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中,厌氧真菌主要为 *Piromyces* 属菌株,与其共存的产甲烷菌为 *Methanobrevibacter* sp. NT7 及一种新的未培养产甲烷菌 LGM。而奶牛瘤胃液获得的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中,厌氧真菌主要为 *Caecomyces* 及 *Neocallimastix* 属菌株,在该共培养物的厌氧真菌 ARISA 分析中,没有发现与山羊瘤胃厌氧真菌 ARISA 相似的条带,即山羊瘤胃共培养液中的厌氧真菌菌株 *Piromyces* 在奶牛瘤胃共培养中没有检测到。同时,通过新的未培养产甲烷菌 LGM 的特异性引物 PCR 检测发现,奶牛瘤胃液共培养液中没有检测到该菌,即该菌在每 3 天传代的奶牛瘤胃液厌氧真菌与产甲烷菌共培养物中无法存活^[18]。成艳芬等^[19]研究指出,产甲烷菌共存能影响共培养液中厌氧真菌的菌群结构,本研究结合山羊瘤胃液与奶牛瘤胃液厌氧真菌与产甲烷菌共培养物分析发现,共培养液中厌氧真菌菌群结构也能反过来影响共存的产甲烷菌菌群结构。

为了进一步研究厌氧真菌对共存产甲烷菌菌群结构的影响,本研究对来自奶牛瘤胃液的厌氧真菌与产甲烷菌共培养物分别进行了 3、5 和 7 d 传代,厌氧真菌在 3 d 传代过程中生长良好,而纯厌氧真菌菌株进行 7 d 传代的体外培养则不能生长。通过对不同传代频率的共培养中产甲烷菌菌群结构分析发现,5 d 和 7 d 传代共培养中产甲烷菌菌群与 3 d 传代产甲烷菌菌群差异明显,末端片段长度为 70 和 470 bp 的产甲烷菌为 3 d 传代共培养物中的主要产甲烷菌,而末端片段长度为 100 和 150 bp 的产甲

烷菌为 5 d 传代共培养物中的主要产甲烷菌,末端片段长度为 100 bp 的产甲烷菌则为 7 d 传代共培养物中的绝对优势菌,占总甲烷菌比例达 50%。Cheng 等^[17]报道,不同传代频率显著影响共培养液中厌氧真菌菌群的结构,3 d 传代共培养中主要为 ARISA 片段长度分别为 383–392 bp 和 413–419 bp 的厌氧真菌菌株,而 5 和 7 d 传代共培养液中则主要为 ARISA 片段长度分别为 383–392 bp 和 354–358 bp 的厌氧真菌菌株。由于在厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中,产甲烷菌只能利用厌氧真菌代谢产物生长,因此,传代频率引起的厌氧真菌菌群变化也导致了产甲烷菌菌群发生相应的变化。

由本研究及前期研究可见,产甲烷菌共存能影响厌氧真菌的菌群结构;同时,厌氧真菌菌群结构的改变也能影响共存产甲烷菌的种类。但哪些厌氧真菌及产甲烷菌株发生了改变还有待鉴定,本研究尝试过分离鉴定发生改变厌氧真菌和产甲烷菌菌株,但没有成功,大部分发生改变的厌氧真菌菌株不能被滚管纯化,即这类菌株会在滚管纯化过程中消失,目前只能通过分子生物学手段获得这些菌株的 ARISA 片段长度。另外,共培养中发生改变的厌氧真菌与产甲烷间的相互关系还有待深入研究,如哪种厌氧真菌的变化会导致哪些相应的产甲烷菌的变化。

参考文献

- [1] Pachauri RK, Reisinger A. IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: IPCC, 2008, 104 (in Chinese)
IPCC. 气候变化2007: 综合报告. 政府间气候变化专门委员会第四次评估报告第一、第二和第三工作组的报告[核心撰写组, Pachauri, RK 和 Reisinger. A(编辑)]. IPCC, 瑞士, 日内瓦, 2008: 104
- [2] Liu Y, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 171-189
- [3] Hungate RE, Smith W, Bauchop T, et al. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 102(2): 389-397
- [4] Cheng YF, Mao SY, Pei CX, et al. Detection and diversity analysis of rumen methanogens in the co-cultures with anaerobic fungi[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6): 879-883 (in Chinese)
成艳芬, 毛胜勇, 裴彩霞, 等. 共存与厌氧真菌分离培养液中瘤胃甲烷菌的检测及其多样性分析[J]. *微生物学报*, 2006,

- 46(6): 879-883
- [5] Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, et al. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill[J]. *Microbiology*, 2002, 148(11): 3521-3530
- [6] Guo XF, Li HW, Li CQ, et al. RFLP analysis of *mcrA* gene from rumen liquid of Inner Mongolian Cashmere goats on different grazing stages[J]. *Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2008, 22(3): 68-72 (in Chinese)
郭雪峰, 李华伟, 李长青, 等. 内蒙古白绒山羊不同放牧期瘤胃甲烷菌 *mcrA* 基因的 RFLP 分析[J]. *山西师范大学学报: 自然科学版*, 2008, 22(3): 68-72
- [7] Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A, et al. The *mcrA* gene and 16S rRNA gene in the phylogenetic analysis of methanogens in the rumen of faunated and unfaunated cattle[J]. *Animal Science Journal*, 2012, 83(11): 727-734
- [8] Davies DR, Theodorou MK, Lawrence MI, et al. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces[J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(6): 1395-1400
- [9] Bryant MP, Burkey LA. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen[J]. *Journal of Dairy Science*, 1953, 36(3): 205-217
- [10] Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, et al. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill[J]. *Microbiology-SGM*, 2002, 148(11): 3521-3530
- [11] Kitts CL. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics[J]. *Biological Sciences*, 2001, 2(1): 17-25
- [12] Wang X, Li X, Zhao C, et al. Correlation between composition of the bacterial community and concentration of volatile fatty acids in the rumen during the transition period and ketosis in dairy cows[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(7): 2386-2392
- [13] Khafipour E, Li S, Plaizier JC, et al. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(22): 7115-7124
- [14] Wright ADG, Pimm C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(2): 337-349
- [15] King EE, Smith RP, St-Pierre B, et al. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(16): 5682-5687
- [16] St-Pierre B, Wright ADG. Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca (*Vicugna pacos*)[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12(1): 1
- [17] Cheng YF, Edwards JE, Allison GG, et al. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(20): 4821-4828
- [18] Jin W, Cheng YF, Mao SY, et al. Discovery of a novel rumen methanogen in the anaerobic fungal culture and its distribution in the rumen as revealed by real-time PCR[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 104
- [19] Cheng YF. Establishment of consecutive batch co-cultures of anaerobic fungi and methanogens from the rumen and study of the metabolism and microbial diversity in the co-cultures[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2008
成艳芬. 厌氧真菌与产甲烷菌共培养系统的建立及其代谢与菌群变化的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2008