

研究报告

一种厌氧真菌共培养甲烷菌株的分离及其甲烷生产特性解析

李与琦¹, 薛义涵¹, 郭子琦¹, 李凤鸣², 李晓斌², 朱伟云¹, 成艳芬^{*1}

1 南京农业大学 国家动物消化道营养国际联合研究中心 消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

2 新疆农业大学动物科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

李与琦, 薛义涵, 郭子琦, 李凤鸣, 李晓斌, 朱伟云, 成艳芬. 一种厌氧真菌共培养甲烷菌株的分离及其甲烷生产特性解析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2422-2435.

LI Yuqi, XUE Yihan, GUO Ziqi, LI Fengming, LI Xiaobin, ZHU Weiyun, CHENG Yanfen. Isolation and biomethane production characterization of a novel co-culture of anaerobic fungus and methanogen[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2422-2435.

摘要:【背景】开发生物甲烷资源是减轻化石燃料供求紧张的有效措施, 而秸秆类原料的预处理及甲烷生产方法需要不断创新, 从而进一步满足可持续发展。厌氧真菌与甲烷菌共培养能够通过假根侵入及纤维降解酶双重预处理秸秆并生产甲烷, 但目前全世界被报道的骆驼胃肠道来源的厌氧真菌分离培养物仅有 1 株。【目的】从新疆准噶尔双峰驼瘤胃内容物中分离出新型厌氧真菌和甲烷菌共培养物, 研究其在降解秸秆并联合生产生物甲烷方面的应用潜力。【方法】采用 Hungate 滚管纯化技术将从骆驼胃肠道中分离的厌氧真菌和甲烷菌共培养, 对其进行形态学及分子学鉴定, 随后厌氧发酵 5 种底物(稻秸、芦苇、构树叶、苜蓿秆和草木樨), 研究产甲烷量、降解效果及主要代谢产物等方面的特性。【结果】筛选到的共培养物中的厌氧真菌为 *Oontomyces* sp. CR1, 甲烷菌为 *Methanobrevibacter* sp. CR1。其在降解稻秸时表现出最高的木聚糖酶活力(21.64 IU/mL)及甲烷产量(143.39 mL/g-DM), 甲烷生产特性较分离自其他动物宿主的厌氧真菌共培养物更优。【结论】共培养厌氧真菌与甲烷菌菌株 CR1 是一种新型高效降解菌株资源, 其在利用木质纤维素生物质生产生物甲烷方面具有良好的应用前景。

关键词: 双峰驼; 厌氧真菌; 共培养; 甲烷菌; 生物甲烷

资助项目: 国家自然科学基金(32061143034); 中央高校基本科研业务费(KYYJ202003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32061143034) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (KYYJ202003).

*Corresponding author. E-mail: yanfencheng@njau.edu.cn

Received: 2022-08-24; Accepted: 2022-09-25; Published online: 2022-11-17

Isolation and biomethane production characterization of a novel co-culture of anaerobic fungus and methanogen

LI Yuqi¹, XUE Yihan¹, GUO Ziqi¹, LI Fengming², LI Xiaobin², ZHU Weiyun¹, CHENG Yanfen^{*1}

¹ Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

² College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Exploiting biomethane resources is an effective way to alleviate the shortage of fossil fuel supply nowadays. At the same time, the methods of lignocellulosic biomass pretreatment and methane production need to be innovated for sustainable development. The co-cultivation of anaerobic fungi and methanogens enables dual pretreatment of lignocellulosic biomass and methane production by rhizoid invasion and fiber-degrading enzymes. However, only one culture of anaerobic fungi isolated from camel gut has been reported in the world. [Objective] To isolate and identify the novel co-culture of anaerobic fungus and methanogen from the rumen contents of Xinjiang Bactrian camels, and investigate its application potential in degrading lignocellulosic biomass and producing biomethane. [Methods] The co-culture of anaerobic fungus and methanogen was isolated by Hungate rolling-tube technique from camel gastrointestinal tract and then identified based on the morphological and molecular characteristics. Further, the biomethane production, degradation efficiency, and primary metabolites of the co-culture were determined by anaerobic fermentation with five substrates (rice straw, reed, *Broussonetia papyrifera* leaves, alfalfa stalk, and *Melilotus officinalis*). [Results] The co-culture CR1 of anaerobic fungus and methanogen was composed of *Oontomyces* sp. CR1 and *Methanobrevibacter* sp. CR1, which had high xylanase activity (21.64 IU/mL) and biomethane production (143.39 mL/g-DM) when degrading rice straw. Furthermore, CR1 had better methane production property than the anaerobic fungal co-cultures isolated from other animals. [Conclusion] The co-culture CR1 of anaerobic fungus and methanogen is a novel degrading strain with high efficiency, which has a promising application prospect in the production of biomethane from lignocellulosic biomass.

Keywords: Bactrian camel; anaerobic fungi; co-cultures; methanogens; biomethane

能源的合理开发利用对于社会可持续发展至关重要。目前，化石燃料供求矛盾问题突出，加快了人们探索开发清洁能源的脚步。生物甲烷是清洁能源中的重要组成部分。其生产既可以缓解能源短缺的问题，又可以解决我国作为农业大国每年所废弃的各类秸秆。此外，秸秆发酵后产生的沼渣还可用作优质肥料^[1]。

然而，利用秸秆生产甲烷通常需要经过预处理、糖化及厌氧发酵等几个关键步骤^[2]，如何降低生产成本并开发对环境友好的处理方法是亟待解决的问题。

目前，一些物理和化学预处理方法可以改善秸秆的降解效果，从而提高甲烷生产效率。蒸汽爆破、微波等物理方法可以有效预处理

秸秆,但同时也会产生有毒物质,抑制厌氧发酵^[3-4]。其他工艺如酸和碱预处理也被广泛使用,但是化学预处理在很大程度上受到高能耗、腐蚀设备及后续需要酸碱回收的限制^[5]。畜牧业是甲烷排放的重要来源,约占人为甲烷排放的 40%^[6]。收集草食动物排放的甲烷不切实际,但是分离草食动物消化道中的共培养微生物进行秸秆生物预处理并厌氧发酵生产甲烷是一种值得尝试的方法^[7]。

骆驼作为新疆古老的畜种,具有耐旱耐粗饲的特点^[8]。其中,较高的耐粗饲料能力取决于骆驼瘤胃中独特的微生物群落。厌氧真菌是一类存在于骆驼消化道内的微生物,具有很强的纤维降解能力^[9-10]。真菌基因组学显示,厌氧真菌编码的碳水化合物活性酶活力比工业应用中常见的里氏木霉和黑曲霉高 4 倍以上^[10]。甲烷菌也广泛存在于草食动物消化道内,是一种严格厌氧且以甲烷为终产物的古菌。氢营养型甲烷菌可以利用厌氧真菌的代谢产物合成甲烷,从而减轻氢气对厌氧真菌氢体的抑制作用,促进氢体的代谢,进而提高厌氧真菌降解粗纤维的能力^[11-12]。当厌氧真菌与甲烷菌共同培养时,只需简单地与粗纤维共发酵就可以解决传统工业生产中分阶段完成的预处理、糖化和发酵任务^[13]。但厌氧真菌极端厌氧的生命需求及烦琐的分离培养条件阻碍了厌氧真菌纯培养及共培养菌株的分离和纯化,目前,全球范围内仅从骆驼胃肠道中分离出一株厌氧真菌并进行了纯培养^[14]。

因此,基于厌氧真菌与甲烷菌共培养物可以降解秸秆并生产甲烷的特性,本研究以新疆准噶尔双峰驼瘤胃内容物为分离来源,尝试从中分离出新型厌氧真菌和甲烷菌的共培养物,并从底物降解及厌氧真菌代谢的角度解析骆驼瘤胃内厌氧真菌共培养物生产甲烷的特性,从而为微生物预处理秸秆及生产生物甲烷提供新

型高效降解菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集与富集培养

采集新疆吉木乃县(47°00'N, 85°33'E)的准噶尔双峰驼 5 g 新鲜瘤胃内容物接种至含有 1 mL 抗生素的 90 mL Medium C 培养基中。将培养物在 39 °C 的恒温培养箱中静置培养,每 3 天传代 1 次。在连续传代 3 次后,以真菌生长(以稻秸漂浮在培养基中为标志)和甲烷产生(通过气相色谱仪检测)作为证明,确保获得厌氧真菌和甲烷菌的富集培养物^[15]。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

培养基 Medium C 的配制参照 Theodorou 等^[16]的方法。将培养基在连续通入 CO₂ 的条件下装入 180 mL 血清瓶中。分装后,121 °C 灭菌 20 min 备用。

1 600 U/mL 的青霉素、2 000 U/mL 的链霉素,新乡市华畜商贸有限公司;甲酸试剂盒, Megazyme 股份有限公司;葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法),上海荣盛生物药业有限公司;DNeasy PowerPlant Pro Kit,凯杰生物工程有限公司;乳酸(LD)试剂盒、D-木糖试剂盒,南京建成生物工程研究所。恒温培养箱,上海跃进医疗器械有限公司;鼓风烘箱,上海右一仪器有限公司;倒置显微镜,徕卡显微系统有限公司;气相色谱仪,安捷伦科技有限公司;pH 计,梅特勒托利多仪器有限公司;纤维分析仪,安康科技有限公司;马弗炉,上海一恒科学仪器有限公司。

1.1.3 底物准备

五种不同营养成分的木质纤维素底物分别为稻秸(rice straw, RS)、芦苇(reed, RD)、苜蓿秆(alfalfa stalk, AS)、构树叶(*Broussonetia papyrifera* leaves, BP)和草木樨(*Melilotus officinalis*, MO),

将底物收集后用蒸馏水冲洗3次,于鼓风烘箱中65℃烘干,粉碎并通过3 mm筛,收集后密封在室温条件下保存。

1.2 方法

1.2.1 富集分离

在分离培养阶段,利用 Hungate 滚管法分离纯化获得厌氧真菌和甲烷菌一对一共培养物^[17]。具体步骤为:1 mL 的培养物接种到9 mL 的厌氧稀释液(不含有无细胞瘤胃液和基础培养基的复合培养基)中,稀释2次后,将0.5 mL 稀释后的混合培养物接种到10 mL 琼脂培养基(添加2%的琼脂,底物为纤维二糖的复合培养基)后,在冰上快速滚管至液体凝固。将凝固后的培养基在39℃的恒温培养箱中静置培养3 d后,挑取形态不同的单菌落至9 mL 新鲜培养基中。分离培养步骤重复3次,直至琼脂培养基上单菌落形态一致^[18]。在分离后,将培养物在添加1% (质量体积分数)稻秸的培养基中于39℃的恒温培养箱中静置培养,每3天传代1次。以真菌生长(以稻秸漂浮在培养基中为标志)和甲烷产生(通过气相色谱仪检测)作为证明,确保获得厌氧真菌和甲烷菌的一对一共培养物^[15]。

1.2.2 形态特征鉴定

厌氧真菌的鉴定根据朱伟云等^[19]所描述的方法。取培养40 h的培养物少许,滴至载玻片上,在倒置显微镜上观察厌氧真菌的菌体、假根、孢子囊和鞭毛,并拍照记录。

1.2.3 分子学鉴定及系统发育分析

取培养40 h的培养物10 mL,于12 000×g离心10 min,沉淀用PBS清洗后,于-20℃保存。根据制造商的说明,使用 DNeasy PowerPlant Pro Kit 从沉淀物中提取DNA。厌氧真菌的PCR扩增根据 Hanafy 等^[20]的描述,使用引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAGTCGTAAGTAAGTAGG-3')和 NL4 (5'-TCAACATTAAGCGTA

GGTA-3')靶向扩增 LSU rRNA 基因的 ITS1、5.8S、ITS2 和 D1/D2 区域,PCR产物长度约为1 200–1 400 bp。PCR反应体系(50 μL): 10×*Taq* Mix 5 μL, 上、下游引物(4 μmol/L)各2.5 μL, gDNA (200 ng/μL) 0.5 μL, ddH₂O 39.5 μL。PCR反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 40个循环; 72℃ 20 min。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。PCR产物送往南京擎科生物科技有限公司进行桑格测序。

甲烷菌的PCR扩增根据黎印等^[21]的描述,使用引物 86F (5'-GCTCAGTAACACGTGG-3')和 1340R (5'-CGGTGTGT GCAAGGAG-3')靶向扩增甲烷菌16S rRNA基因序列,PCR产物长度约为1 254 bp。PCR反应体系(50 μL): 10×*Taq* Mix 5 μL, 上、下游引物(4 μmol/L)各2.5 μL, gDNA (200 ng/μL) 0.5 μL, ddH₂O 39.5 μL。PCR反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 40个循环; 72℃ 20 min。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物并测序。厌氧真菌和甲烷菌各自获得的序列与NCBI数据库中的序列进行比对并利用MEGA 11软件进行多序列分析以及系统发育树构建。所有原始序列均上传至NCBI GenBank数据库。

1.3 甲烷生产特性解析

1.3.1 试验设计

准确称量1 g底物至180 mL血清瓶中,准确分装90 mL培养基,共设置5个不同的处理组(1种厌氧真菌与甲烷菌共培养和5种底物),每组设置4个重复,并分别设置空白对照进行产气校正。随后在39℃下静置培养96 h。在发酵的12、24、32、40、48、60、72和96 h,使用 pressure transducer technique (PTT)技术测量顶空气体^[22],然后排尽气体。同时,连接一个真空气袋收集产气以确定成分。收集7 mL培养物发酵液用于pH的测定,同时收集4 mL培养物发酵液并储存在-20℃,用于乙醇、甲酸、乙

酸和乳酸的分析。收集 2 mL 培养物发酵液并将其储存在液氮中,用于 2 种降解酶酶活力分析。剩余培养物在 10 000×g 条件下离心 10 min 后弃上清液,将剩余的底物用去离子水洗涤,在鼓风干燥箱于 105 °C 干燥称重,计算干物质消失率、纤维素降解率及半纤维素降解率。

1.3.2 甲烷产量的测定

甲烷产量的测定方法按照 Li 等^[23]描述的步骤,将真空气袋中收集到的气体用 5 mL 手动进样针进样,使用安捷伦气相色谱仪进行测定。熔融石英毛细管柱为色谱柱。

1.3.3 pH 及酶活的测定

在发酵终点时,从每个发酵瓶中吸取 7 mL 上清液,并用 pH 计进行 pH 的测定。

按照 Li 等^[23]的方法测定 2 种酶活力。以发酵 96 h 的上清液为粗酶液,通过参考以不同浓度的葡萄糖溶液所建立的标准曲线,计算发酵液上清中所释放的葡萄糖含量,并计算羧甲基纤维素酶酶活力(IU/mL)。以发酵 96 h 的上清液为粗酶液,通过参考不同浓度的木糖溶液所建立的标准曲线为准,计算发酵液上清释放的木糖含量,并计算木聚糖酶酶活力(IU/mL)。

1.3.4 干物质、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、纤维素、半纤维素及木质素的测定

干物质的测定参考朱伟云等^[19]的方法,将发酵后的底物经去离子水洗涤后于鼓风干燥箱中 105 °C 烘干至恒重,通过测定发酵前后底物中的各组分含量来计算干物质消失率(digestibility of dry matter, DMD)、纤维素降解率及半纤维素降解率。根据 van Soest 等^[24]的方法,使用纤维分析仪和马弗炉来测定发酵前后底物中的中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)、酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)、纤维素、半纤维素以及木质素的含量。根据 Niu 等^[25]的方法计算纤维素和半纤维素含量。采用马艳艳等^[26]的方法计算底物发酵后各组分的消失率。

1.3.5 还原糖、单糖以及主要代谢产物浓度的测定

按照 Li 等^[7]的方法进行发酵液中还原糖浓度的测定。使用检测试剂盒分别进行发酵液中葡萄糖、木糖浓度的测定。

按照 Shi 等^[27]的方法进行乙酸及乙醇浓度的测定。发酵上清液经过处理后,经自动进样进入气相色谱仪进行乙酸和乙醇的测定。分别使用甲酸试剂盒和乳酸试剂盒进行发酵液中甲酸、乳酸浓度的测定。

1.4 数据处理

所有的实验数据在 Excel 2019 进行初步整理,随后使用 SPSS 26.0 中的 One-Way ANOVA 进行 Duncan 法多重分析,置信区间设定为 95%,数据为平均值±标准误的表示形式,并使用 Prism 8 进行数据可视化。

2 结果与分析

2.1 共培养物中厌氧真菌及甲烷菌的鉴定

为了筛选到具有粗纤维降解及甲烷生产功能的新型共培养菌株,选择准噶尔双峰驼瘤胃内容物作为共培养的分离来源。从中分离出的厌氧真菌具有单中心菌体(图 1),球形或椭圆形孢子囊,具有丝状假根。游动孢子呈球形,

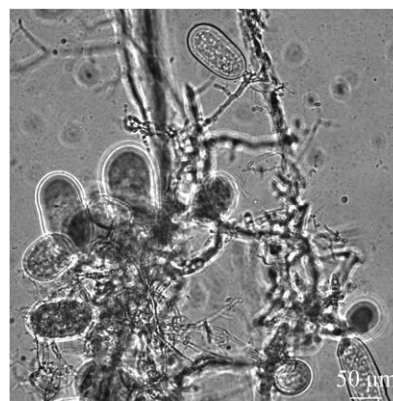


图 1 厌氧真菌 CR1 的形态学鉴定

Figure 1 Morphological characteristic of anaerobic fungus CR1.

单鞭毛状。在获得共培养物中厌氧真菌的测序原始序列后, 在 NCBI 数据库中进行了 BLAST 比对分析, 并与目前已经分离鉴定的 20 个属的厌氧真菌构建系统发育树(图 2)。结合该

来源的厌氧真菌的菌落形态、ITS1 序列及系统发育分析, 推断该菌株为 *Oontomyces* sp., 并将其命名为 *Oontomyces* sp. CR1 (GenBank 登录号为 ON514405)。

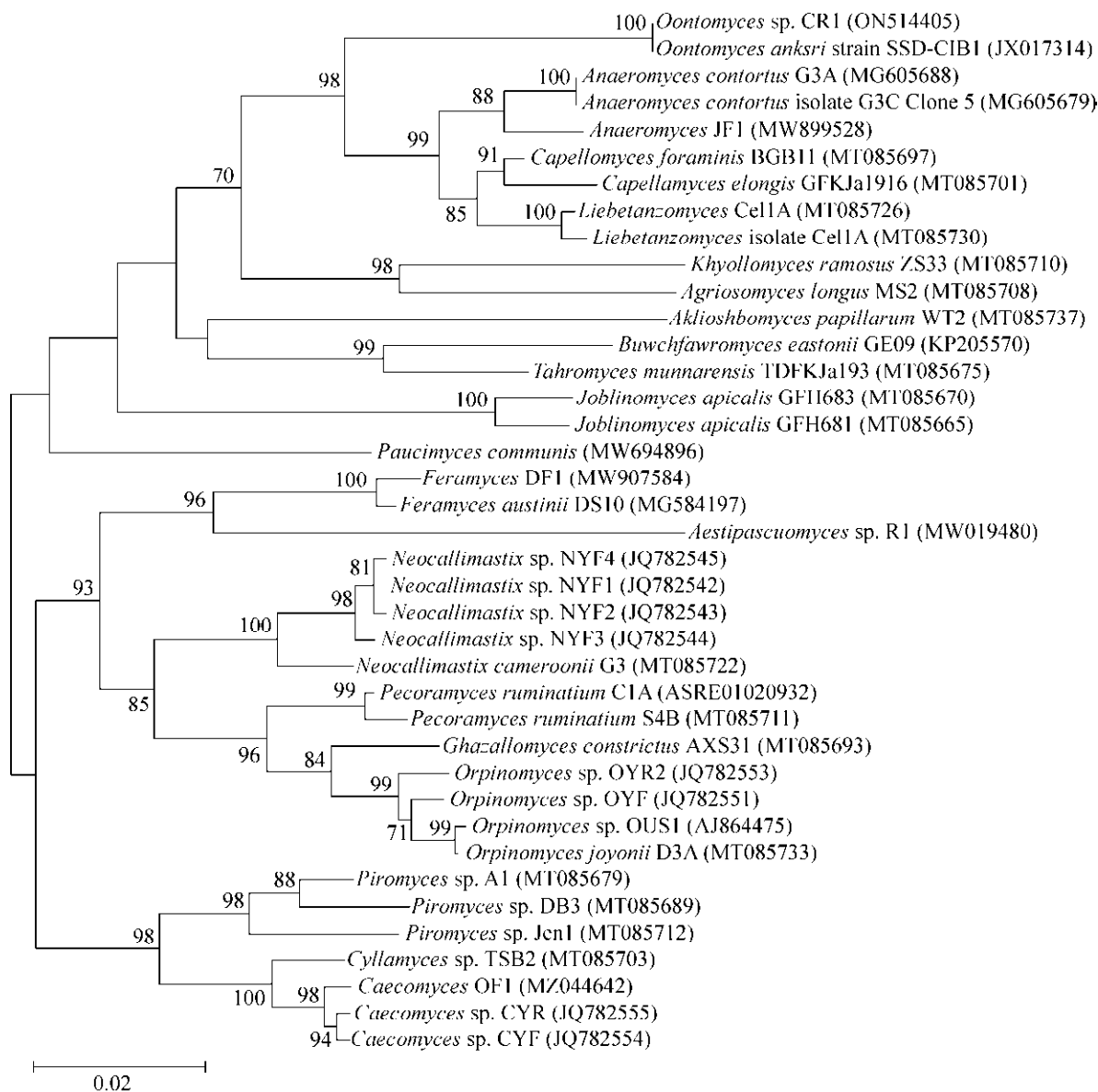


图2 厌氧真菌 *Oontomyces* sp. CR1 基于 ITS1 基因序列构建的系统发育树 统计支持率(来自 1 000 次重复)显示为具有超过 50% 引导支持的节点; 括号内数字: 菌株的 GenBank 登录号; 分支处数字: Bootstrap 支持率; 标尺: 0.02 差异的分支长度

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of strain *Oontomyces* sp. CR1 based on ITS1 gene sequence homology. Bootstrap values (from 1 000 replicates) were shown for nodes with more than 50% bootstrap support; Numbers in brackets: GenBank accession number of the strain; Numbers in branch points: Percentages supported by bootstrap; Bar: 0.02 nucleotide divergence.

共培养物中甲烷菌 16S rRNA 基因通过 BLAST 比对发现, 其序列与 *Methanobrevibacter ruminantium* CY4 的相似度最高(图 3), 属于甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter* sp.)。随后将 *Methanobrevibacter* sp. CR1 的 16S rRNA 基因序列

提交至 GenBank 数据库(登录号为 ON514439)。

2.2 共培养 CR1 的生长状态

厌氧真菌的产气曲线是描述其生长状态以及降解效果的重要指标。共培养 CR1 在 24–48 h 时生长速度最快(图 4A), 在 48 h 之后生长速率

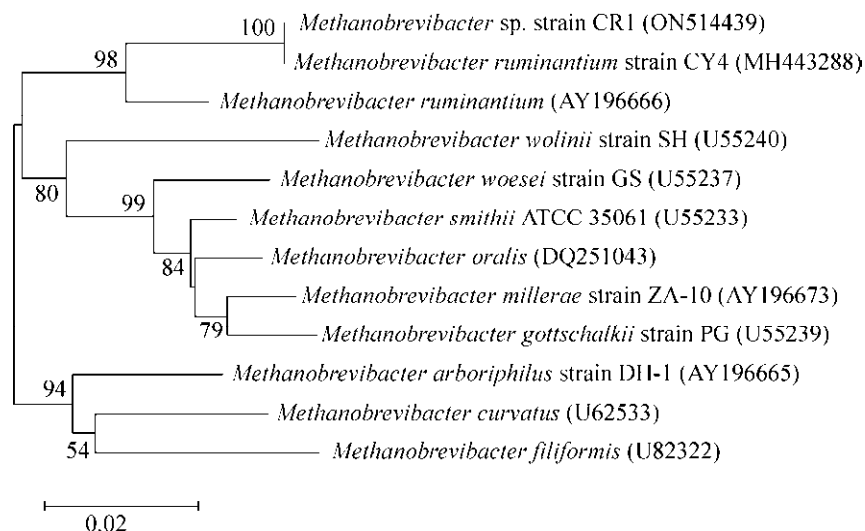


图 3 甲烷菌 *Methanobrevibacter* sp. CR1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 统计支持率(来自 1 000 次重复)显示为具有超过 50%引导支持的节点; 括号内数字: 菌株的 GenBank 登录号; 分支处数字: Bootstrap 支持率; 标尺: 0.02 差异的分支长度

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of strain *Methanobrevibacter* sp. CR1 based on 16S rRNA gene sequence homology. Bootstrap values (from 1 000 replicates) were shown for nodes with more than 50% bootstrap support; Numbers in brackets: GenBank accession number of the strain; Numbers in branch points: Percentages supported by bootstrap; Bar: 0.02 nucleotide divergence.

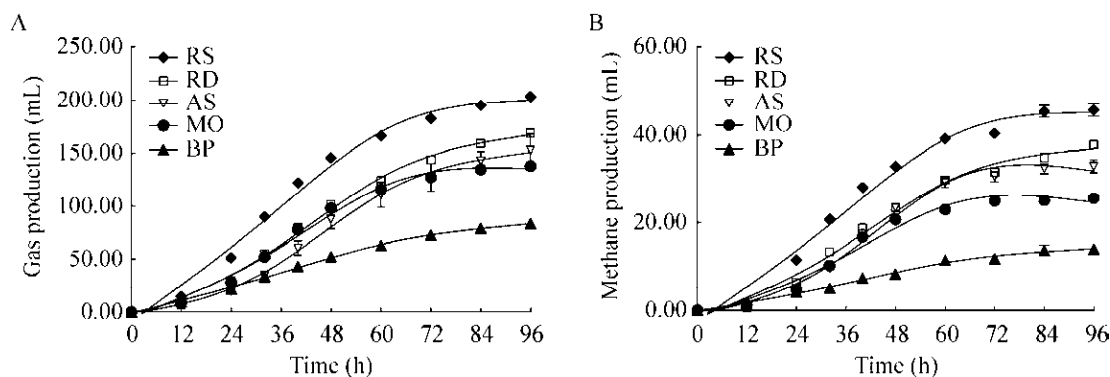


图 4 不同底物条件下共培养 CR1 的产气和产甲烷特性 A: 产气产量. B: 甲烷产量

Figure 4 Gas production and methanogenesis characteristics of co-culture CR1 under different substrate conditions. A: Gas production. B: Methane production.

逐渐变缓。当以稻秸为底物时生长速度最快且产气量最高, 其次是芦苇、苜蓿秆、草木樨以及构树叶。甲烷产量曲线(图 4B)具有和产气量相似的规律, 当以稻秸为底物进行厌氧发酵时具有最高的甲烷产量(表 1), 并且显著高于其他组($P<0.05$)。其中, 稻秸组的总产气量是构树叶组的 2.4 倍, 总甲烷产量是构树叶组的 3.1 倍。

2.3 共培养 CR1 的降解特性解析

为了进一步探究共培养 CR1 对不同类型底物的降解偏好, 我们研究了 5 种底物在降解前后的干物质变化以及结构变化。降解前稻秸组的纤维素、半纤维素含量显著高于草木樨和构树叶组($P<0.05$), 木质素含量显著低于草木樨、苜蓿秆和芦苇组($P<0.05$), 说明 5 种底物的成分结构具有显著差异(表 2)。降解后, 苜蓿秆的干物质降解率显著高于其他底物($P<0.05$) (图 5A), 而稻秸的纤维素降解率以及半纤维素降解率均显著高于其他底物($P<0.05$)

(图 5B、5C)。

我们预测不同底物降解效果的差异是由共培养 CR1 所分泌的各类纤维降解酶的差异造成的, 因此对上清液中 2 种分别代表纤维素降解的羧甲基纤维素酶酶活力以及代表半纤维素降解的木聚糖酶酶活力进行了检测(表 1)。结果发现稻秸组的羧甲基纤维素酶酶活力以及木聚糖酶酶活力均显著高于构树叶组($P<0.05$), 而且木聚糖酶酶活力是羧甲基纤维素酶酶活力的 77 倍; 纤维素和半纤维素降解率最低的构树叶组, 其 2 种酶活力也在所有实验组中最低。

2.4 共培养 CR1 的糖化能力解析

对于生物燃料生产, 糖化(saccharification)是继生物质预处理后的关键一步。因此, 我们进一步对共培养 CR1 发酵上清液中的总还原糖浓度、代表纤维素的葡萄糖以及代表半纤维素的木糖浓度进行了检测(图 6)。构树叶组的总还原糖浓度、葡萄糖浓度以及木糖浓度显著低

表 1 不同底物对共培养 CR1 产甲烷、酶活力及 pH 的影响

Table 1 Effects of different substrates on methane production, enzyme activity and pH of co-culture CR1

Substrate	Gas production (mL)	CH ₄ production (mL)	CH ₄ production (mL/g-DM)	CMCase (IU/mL)	Xylanase (IU/mL)	pH
Reed	169.23±1.78b	37.82±0.73b	125.34±5.71a	0.27±0.02b	12.69±1.13b	6.42±0.05b
<i>Broussonetia papyrifera</i> leaves	83.40±0.80d	14.62±1.48e	86.85±7.08b	0.19±0.02c	3.73±0.13c	6.70±0.04a
Alfalfa stalk	153.00±15.44bc	32.91±1.54c	88.81±2.06b	0.33±0.01a	4.64±0.17c	6.44±0.03b
<i>Melilotus officinalis</i>	138.07±2.97c	25.59±1.03d	93.66±5.71b	0.25±0.01b	4.20±0.92c	6.48±0.04b
Rice straw	203.53±0.35a	45.74±1.40a	143.39±7.12a	0.28±0.02ab	21.64±0.12a	6.35±0.01c

同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Values in the same column with different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$).

表 2 不同底物的营养成分组成

Table 2 Profiles of nutrient composition of different substrates

Substrate	NDF (%)	NDS (%)	ADF (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Reed	80.09±2.41a	19.91±2.41b	56.44±2.63a	38.40±1.20a	23.64±0.22b	17.68±1.23b
<i>Broussonetia papyrifera</i> leaves	32.09±4.86b	67.91±4.86a	16.40±2.59c	11.55±1.45c	15.69±2.28c	4.14±0.86c
Alfalfa stalk	69.73±0.91a	30.27±0.91b	54.32±0.75a	40.87±0.74a	15.42±0.15c	12.64±0.20b
<i>Melilotus officinalis</i>	71.84±2.05a	28.17±2.05b	52.91±1.42b	38.48±0.45b	18.93±0.63b	13.52±0.94a
Rice straw	77.15±3.56a	22.85±3.56b	45.51±2.09b	39.68±1.42a	31.75±1.44a	4.57±0.53c

同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Values in the same column with different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$).

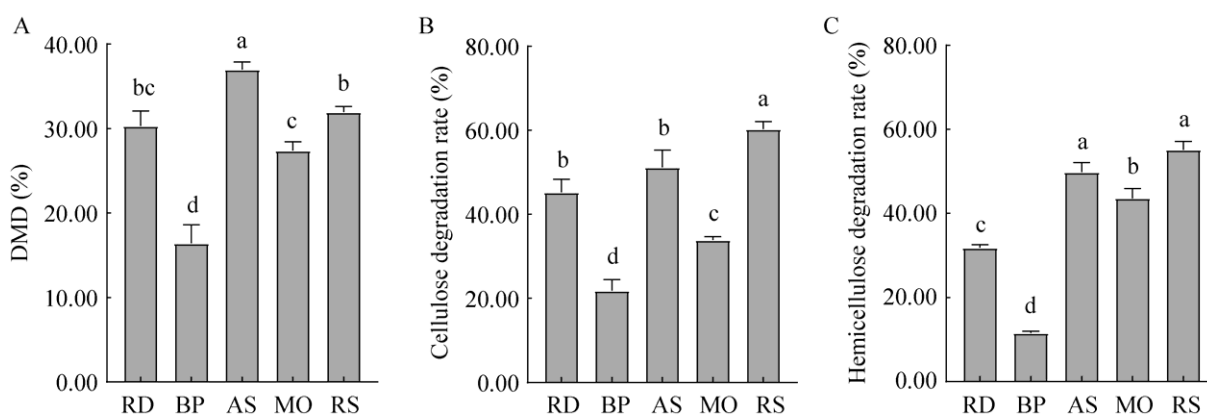


图5 不同底物条件下共培养 CR1 的降解特性 A: 干物质消失率. B: 纤维素的降解率. C: 半纤维素降解率. 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Degradation properties of co-culture CR1 under different substrate conditions. A: DMD. B: Cellulose degradation rate. C: Hemicellulose degradation rate. Values with different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$).

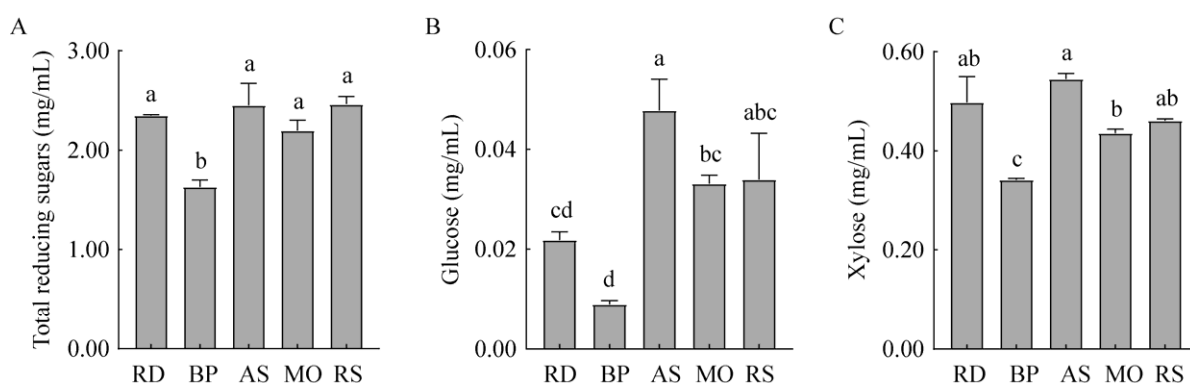


图6 不同底物条件下共培养 CR1 的糖化特性 A: 总还原糖. B: 葡萄糖. C: 木糖. 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Figure 6 Saccharification properties of co-culture CR1 under different substrate conditions. A: Total reducing sugars. B: Glucose. C: Xylose. Values with different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$).

于其他实验组($P<0.05$)。苜蓿秆组的 3 种糖的浓度均在所有实验组中最高。

2.5 共培养 CR1 的其他代谢产物分析

共培养 CR1 在降解秸秆生产甲烷的同时, 还会生成其他的代谢产物, 而厌氧发酵前后上清液中 pH 值的变化可以整体反映代谢产物的积累情况。厌氧发酵后, 构树叶组 pH 值最高(表 1), 而稻秸组上清液的 pH 值从 6.80 下降至

6.35, 显著低于其他底物组($P<0.05$)。上清液中各类有机酸的浓度与 pH 的结果相一致(图 7), 乙酸在共培养 CR1 的 4 种主要代谢产物中浓度最高, 其中稻秸组的乙酸浓度显著高于构树叶、苜蓿秆及草木樨组($P<0.05$)。构树叶和苜蓿秆组的乳酸浓度显著高于芦苇组和稻秸组($P<0.05$)。甲酸浓度在苜蓿秆组中最高, 而乙醇浓度在稻秸组中最高。

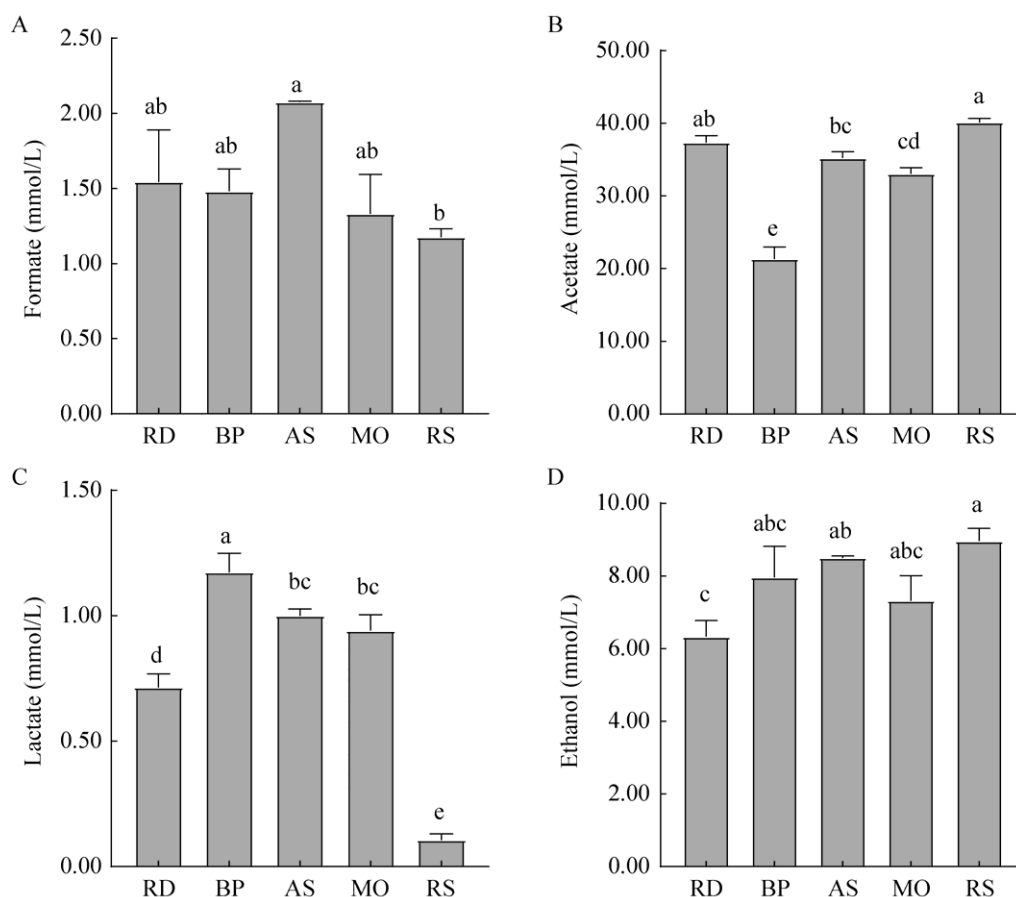


图 7 不同底物条件下共培养 CR1 的主要水溶性代谢产物 A: 甲酸. B: 乙酸. C: 乳酸. D: 乙醇. 不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$)

Figure 7 Primary water-soluble metabolites of co-culture CR1 under different substrate conditions. A: Formate. B: Acetate. C: Lactate. D: Ethanol. Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

3.1 一株新型厌氧真菌与甲烷菌共培养菌株的获得

草食动物胃肠道中分离出的厌氧真菌与甲烷菌共培养物被证明在甲烷、乙醇等清洁能源生产中具有广阔的发展前景^[7,27-28]。但目前从全球各类环境中仅分离到 20 个属的厌氧真菌^[29]，据预测仅占到瘤胃内所有厌氧真菌菌属的一半^[30]，这与大多数厌氧真菌菌株无法分离培养或难以体外培养有关。本文首次从新疆准噶尔

双峰驼瘤胃内容物中分离出 *Oontomyces* sp. 与 *Methanobrevibacter* sp. 的共培养菌株，填补了目前天然 *Oontomyces* sp. 共培养降解菌株资源的空白。此前，第 1 株 *Oontomyces* sp. 纯培养菌株也是从骆驼胃肠道中分离得到^[14]，这说明 *Oontomyces* sp. 可能是骆驼瘤胃厌氧真菌微生物群落中的优势菌属。Hanafy 等^[20]研究发现，厌氧真菌的属宿主偏好性很强，这为今后厌氧真菌的分离提供了参考，即为了获得某个属的厌氧真菌，其分离来源应尽可能和该厌氧真菌第一次发现时保持一致。

3.2 高效产甲烷共培养菌株的效能比较

通过与其他研究中“一对一”的厌氧真菌与甲烷菌共培养物的产甲烷特性进行比较,发现目前研究中共培养分离物里的甲烷菌均来自 *Methanobrevibacter*, 但本研究获得的菌株在底物降解、甲烷生产上均显著高于其他研究中获得的菌株(表 3), 我们认为这种差异与厌氧真菌的分离来源有关。从骆驼和牦牛瘤胃中分离的 CR1 和 Yaktz1 表现出相对较高的产甲烷效果^[31], 这暗示为了适应极端生境, 这些特种动物胃肠道中的微生物相比传统家畜具有更高效

的粗纤维降解效果。分离部位对产甲烷性能也有很大影响, 来自骆驼瘤胃内容物中的 CR1 产生的甲烷量是粪便中分离的 *Pecoramyces* sp. N3 产甲烷量的 2.8 倍^[17]。Xue 等^[33]也发现, 从骆驼瘤胃中分离出的纯培养菌株比从骆驼粪便中分离出的菌株具有更好的粗纤维降解效果。这表明较粪便而言, 胃肠道是分离更具生产价值的厌氧真菌的更优选择。此外, 本研究中的共培养 CR1 在发酵稻秸产甲烷时, 其性能要高于其他底物。这可能是本研究主要使用稻秸作为底物进行分离纯化工作所导致的结果。

表 3 本研究与其他研究中木质纤维素底物生产甲烷的性能比较

Table 3 Comparison of methanogenesis performance of lignocellulosic biomass in this study with other studies

Co-culture of anaerobic fungi and methanogens	Isolation source	Incubation time (d)	Substrate	Methane production (mL/g-DM)	Study
<i>Pecoramyces</i> sp. F1+ <i>Methanobrevibacter thaueri</i> CW	Goat rumen fluid	4	Rice straw	49.50	[17]
			Wheat straw	52.59	
			Maize stem	40.93	
			Corn cob	59.65	
			Wheat bran	43.32	
<i>Pecoramyces</i> sp. N3+ <i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	Camel feces	4	Rice straw	50.11	[17]
			Wheat straw	49.23	
			Maize stem	38.87	
			Corn cob	67.62	
			Wheat bran	70.87	
<i>Neocallimastix frontalis</i> + <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> Yaktz1	Yak rumen fluids	7	Wheat straw	76.32	[31]
			Corn stalk	83.70	
			Rice straw	80.14	
<i>Piromyces</i> + <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> Yak-G18	Yak rumen fluids	4	Wheat straw	32.31	[32]
			Corn stalk	33.33	
			Rice straw	29.51	
			Chinese wildrye	36.63	
			Medicago sativa	29.00	
<i>Pecoramyces</i> sp. F1+ <i>Methanobrevibacter thaueri</i>	Goat rumen fluid	3	Corn leaf blade	56.63	[7]
			Corn stem pith	49.23	
			Corn stem bark	67.98	
<i>Oontomyces</i> + <i>Methanobrevibacter</i> CR1	Camel rumen fluid	4	Rice straw	143.39	This study
			Reed	125.34	
			Alfalfa stalk	88.81	
			<i>Broussonetia papyrifera</i> leaves	86.85	
			<i>Melilotus officinalis</i>	93.66	

这也提示我们在今后的分离工作中应选择更多种类的底物, 以获得更多底物偏好的菌株。目前尚无关于 *Oontomyces* sp. 的基因组学报道, 进一步的比较基因组学研究将有助于揭示不同厌氧真菌的降解机制以及编码的碳水化合物活性酶基因的差异。

3.3 厌氧真菌与甲烷菌共培养物的代谢研究

有研究表明, 厌氧真菌与甲烷菌共培养物对于纤维素的降解以及甲烷生产效果优于细菌与甲烷菌共培养物^[34]。这表明瘤胃内厌氧真菌与甲烷菌存在更加亲密的互利共生关系, 这也是其在体外长期稳定共存的基础。虽然厌氧真菌的种类会影响其代谢产物结构, 本研究中获得共培养物代谢产物类型和比例与其他研究^[10,12]基本保持一致。与本课题组之前从骆驼胃肠道中分离的 *Oontomyces* sp. 纯培养研究相比^[33], 本研究结果中的乙酸浓度提高了 30%, 这种现象在很多研究中已被证实是甲烷菌共存提高厌氧真菌氢体代谢的标志^[10,12]。一方面, 甲烷菌缓解了氢气对厌氧真菌氢体的抑制作用, 促进了厌氧真菌氢体内乙酸和 ATP 的产生^[10], 从而促进厌氧真菌编码的碳水化合物活性酶基因的表达^[35], 提高了厌氧真菌的粗纤维降解效果; 另一方面, 甲烷菌可以利用厌氧真菌产生的氢气生成甲烷并从中获得能量。此外, 其他研究发现当抑制共培养中厌氧真菌的活力, 即使在培养基中持续补充氢气也不能满足甲烷菌的生长^[23], 这说明厌氧真菌同时也为甲烷菌提供了维持生命所需的营养物质。除种间氢转移外的其他研究将有助于进一步揭示厌氧真菌与甲烷菌之间“一对一”互利共生的关系。

本研究首次从骆驼瘤胃内容物中分离出一种新型厌氧真菌 *Oontomyces* sp. CR1 与甲烷

菌 *Methanobrevibacter* sp. CR1 共培养物, 并证明其相较其他研究在甲烷转化上有着显著提升效果。在后续的研究中将进一步扩大甲烷生产体系, 优化厌氧发酵过程中的各类条件并解析厌氧真菌与甲烷菌之间的互利关系, 从而进一步提高共培养厌氧真菌与甲烷菌 CR1 利用木质纤维素生物质生产生物甲烷的能力。

REFERENCES

- [1] LI Y, ALAIMO CP, KIM M, KADO NY, PEPPERS J, XUE J, WAN C, GREEN PG, ZHANG RH, JENKINS BM, VOGEL CFA, WUERTZ S, YOUNG TM, KLEEMAN MJ. Composition and toxicity of biogas produced from different feedstocks in California[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(19): 11569-11579.
- [2] BANNER A, TOOGOOD HS, SCRUTTON NS. Consolidated bioprocessing: synthetic biology routes to fuels and fine chemicals[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 1079.
- [3] SAPCI Z, MORKEN J, LINJORDET R. An investigation of the enhancement of biogas yields from lignocellulosic material using two pretreatment methods: microwave irradiation and steam explosion[J]. BioResources, 2013, 8(2): 1976-1985.
- [4] THEURETZBACHER F, LIZASOAIN J, LEFEVER C, SAYLOR MK, ENGUIDANOS R, WERAN N, GRONAUER A, BAUER A. Steam explosion pretreatment of wheat straw to improve methane yields: investigation of the degradation kinetics of structural compounds during anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 299-305.
- [5] ANU, KUMAR A, JAIN KK, SINGH B. Process optimization for chemical pretreatment of rice straw for bioethanol production[J]. Renewable Energy, 2020, 156: 1233-1243.
- [6] MCGOVERN E, MCCABE MS, CORMICAN P, POPOVA M, KEOGH K, KELLY AK, KENNY DA, WATERS SM. Plane of nutrition affects the phylogenetic diversity and relative abundance of transcriptionally active methanogens in the bovine rumen[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 13047.
- [7] LI YQ, HOU ZS, SHI QC, CHENG YF, ZHU WY. Methane production from different parts of corn stover via a simple co-culture of an anaerobic fungus and

- methanogen[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 314.
- [8] FAYE B. Camel farming sustainability: The challenges of the camel farming system in the XXIth century[J]. *Journal of Sustainable Development*, 2013, 6(12): 74-82.
- [9] TRINCI APJ, DAVIES DR, GULL K, LAWRENCE MI, BONDE NIELSEN B, RICKERS A, THEODOROU MK. Anaerobic fungi in herbivorous animals[J]. *Mycological Research*, 1994, 98(2): 129-152.
- [10] HESS M, PAUL SS, PUNIYA AK, van der GIEZEN M, SHAW C, EDWARDS JE, FLIEGEROVÁ K. Anaerobic fungi: past, present, and future[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 584893.
- [11] BOONE DR, WHITMAN WB, ROUVIÈRE P. *Diversity and Taxonomy of Methanogens*[M]//*Methanogenesis*. Boston, MA: Springer US, 1993: 35-80.
- [12] LI YQ, MENG ZX, XU Y, SHI QC, MA YP, AUNG M, CHENG YF, ZHU WY. Interactions between anaerobic fungi and methanogens in the rumen and their biotechnological potential in biogas production from lignocellulosic materials[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 190.
- [13] RABEE AE, FORSTER RJ, ELEKWACHI CO, KEWAN KZ, SABRA EA, SHAWKET SM, MAHROUS HA, KHAMISS OA. Community structure and fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi in dromedary camels[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59(1): 101-110.
- [14] DAGAR SS, KUMAR S, GRIFFITH GW, EDWARDS JE, CALLAGHAN TM, SINGH R, NAGPAL AK, PUNIYA AK. A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*)[J]. *Fungal Biology*, 2015, 119(8): 731-737.
- [15] CHENG YF, EDWARDS JE, ALLISON GG, ZHU WY, THEODOROU MK. 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.
- [16] THEODOROU MK, BROOKMAN J, TRINCI APJ. *Anaerobic fungi*[M]//*Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag, 2006: 55-66.
- [17] JIN W, CHENG YF, MAO SY, ZHU WY. Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 7925-7931.
- [18] OZKOSE E, THOMAS BJ, DAVIES DR, GRIFFITH GW, THEODOROU MK. *Cyllamyces aberensis* gen.nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2001, 79(6): 666-673.
- [19] 朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 姚文, THEODOROU MK. 厌氧真菌体外发酵筛选技术的研究[J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(3): 44-48.
- ZHU WY, MAO SY, WANG QJ, YAO W, THEODOROU MK. Study on the screening of anaerobic fungi by *in vitro* fermentation[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(3): 44-48 (in Chinese).
- [20] HANAFY RA, JOHNSON B, YOUSSEF NH, ELSHAHED MS. Assessing anaerobic gut fungal diversity in herbivores using D1/D2 large ribosomal subunit sequencing and multi-year isolation[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(9): 3883-3908.
- [21] 黎印, 金巍, 成艳芬, 朱伟云. 山羊瘤胃甲烷菌第七目菌株的富集、可利用底物及其主要共生菌的分析[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(9): 32-37.
- LI Y, JIN W, CHENG YF, ZHU WY. The *Methanomassiliicoccales* from goat rumen: enrichment, substrates and symbiosis bacteria[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(9): 32-37 (in Chinese).
- [22] THEODOROU MK, WILLIAMS BA, DHANOA MS, MCALLAN AB, FRANCE J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1994, 48(3-4): 185-197.
- [23] LI YF, JIN W, CHENG YF, ZHU WY. Effect of the associated methanogen *Methanobrevibacter thaueri* on the dynamic profile of end and intermediate metabolites of anaerobic fungus *Piromyces* sp. F₁[J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(3): 434-441.
- [24] van SOEST PJ, ROBERTSON JB, LEWIS BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [25] NIU DZ, ZUO SS, JIANG D, TIAN PJ, ZHENG ML, XU CC. Treatment using white rot fungi changed the chemical composition of wheat straw and enhanced digestion by rumen microbiota *in vitro*[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 237: 46-54.
- [26] 马艳艳, 李袁飞, 成艳芬, 朱伟云. 不同化学处理对稻草体外发酵动态变化的影响[J]. *草业学报*, 2014, 23(3): 350-355.
- MA YY, LI YF, CHENG YF, ZHU WY. Effects of

- different chemical treatments on fermentation characteristics of rice straw *in vitro*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2014, 23(3): 350-355 (in Chinese).
- [27] SHI QC, LI YQ, LI YF, CHENG YF, ZHU WY. Effects of steam explosion on lignocellulosic degradation of, and methane production from, corn stover by a co-cultured anaerobic fungus and methanogen[J]. Bioresource Technology, 2019, 290: 121796.
- [28] LI YQ, XU Y, XUE YH, YANG SH, CHENG YF, ZHU WY. Ethanol production from lignocellulosic biomass by co-fermentation with *Pecoramyces* sp. F1 and *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 in an integrated process[J]. Biomass and Bioenergy, 2022, 161: 106454.
- [29] HANAFY RA, DAGAR SS, GRIFFITH GW, PRATT CJ, YOUSSEF NH, ELSHAHED MS. Taxonomy of the anaerobic gut fungi (*Neocallimastigomycota*): a review of classification criteria and description of current taxa[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2022, 72(7): 005322.
- [30] WALLACE RJ, SASSON G, GARNSWORTHY PC, TAPIO I, GREGSON E, BANI P, HUHTANEN P, BAYAT AR, STROZZI F, BISCARINI F, SNELLING TJ, SAUNDERS N, POTTERTON SL, CRAIGON J, MINUTI A, TREVISI E, CALLEGARI ML, CAPPELLI FP, CABEZAS-GARCIA EH, VILKKI J, et al. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions[J]. Science Advances, 2019, 5(7): eaav8391.
- [31] WEI YQ, LONG RJ, YANG H, YANG HJ, SHEN XH, SHI RF, WANG ZY, DU JG, QI XJ, YE QH. Fiber degradation potential of natural co-cultures of *Neocallimastix frontalis* and *Methanobrevibacter ruminantium* isolated from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai Tibetan Plateau[J]. Anaerobe, 2016, 39: 158-164.
- [32] WEI YQ, YANG HJ, LONG RJ, WANG ZY, CAO BB, REN QC, WU TT. Characterization of natural co-cultures of *Piromyces* with *Methanobrevibacter ruminantium* from yaks grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau: a microbial consortium with high potential in plant biomass degradation[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 160.
- [33] XUE YH, SHEN R, LI YQ, SUN ZY, SUN XN, LI FM, LI XB, CHENG YF, ZHU WY. Anaerobic fungi isolated from Bactrian camel rumen contents have strong lignocellulosic bioconversion potential[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 888964.
- [34] PENG XF, WILKEN SE, LANKIEWICZ TS, GILMORE SP, BROWN JL, HENSKE JK, SWIFT CL, SALAMOV A, BARRY K, GRIGORIEV IV, THEODOROU MK, VALENTINE DL, O'MALLEY MA. Genomic and functional analyses of fungal and bacterial consortia that enable lignocellulose breakdown in goat gut microbiomes[J]. Nature Microbiology, 2021, 6(4): 499-511.
- [35] BROWN JL, SWIFT CL, MONDO SJ, SEPPALA S, SALAMOV A, SINGAN V, HENRISSAT B, DRULA E, HENSKE JK, LEE S, LABUTTI K, HE GF, YAN M, BARRY K, GRIGORIEV IV, O'MALLEY MA. Co-cultivation of the anaerobic fungus *Caecomyces churrovii* with *Methanobacterium bryantii* enhances transcription of carbohydrate binding modules, dockerins, and pyruvate formate lyases on specific substrates[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 234.