

共存于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

成艳芬¹, 毛胜勇¹, 裴彩霞¹, 刘建新², 朱伟云^{1*}

(¹ 南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

(² 浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

摘 要 对分离自山羊瘤胃的真菌分离培养液中甲烷菌进行 16S rDNA 扩增、DGGE 分析、RFLP 及测序分析, 研究共存于真菌分离培养液中甲烷菌的种类及其多样性。DGGE 结果显示: 从厌氧真菌分离至第 45 代, 甲烷菌多样性指数由 1.32 降至 0.99, 相似性最低为 34.7%; 第 45 代至 62 代, 多样性指数由 0.99 升至 1.15, 相似性最低为 89.2%。RFLP 多态性分析 69 个克隆共得到 5 个操作分类单元, 选择其中 6 个具有代表性的序列进行测序。序列及系统进化分析表明, 属于其中 3 个操作分类单元的克隆最相似菌都是 Uncultured archaeal symbiont PA202, 相似性均为 95%, 没有与这些克隆相似性较高的已培养甲烷菌, 属于另外 2 个操作分类单元的克隆最相似菌都是 Uncultured rumen methanogen 956, 相似性均为 97%, 最相似已知菌为 *Methanobrevibacter* sp. NT7, 相似性为 97%。结果表明, 真菌培养液中存在目前尚未分离培养的瘤胃甲烷菌。

关键词: 厌氧真菌; 甲烷菌; DGGE; RFLP

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0879-05

反刍动物瘤胃内栖息着各种微生物, 包括瘤胃细菌、原虫、厌氧真菌和甲烷菌。这些微生物互相作用、互相影响, 在瘤胃内形成一个复杂的降解饲料、给宿主动物提供挥发性脂肪酸和微生物蛋白的生物群落。甲烷是瘤胃微生物代谢的终产物之一, 它的产生是能量的损失, 也是温室气体之一, 因此瘤胃产甲烷菌的研究越来越受到重视。但是, 瘤胃内产甲烷菌不能利用复杂的有机物作为能量来源, 只能利用瘤胃细菌、原虫、厌氧真菌降解有机物产生的 H₂、CO₂、甲酸等生成甲烷^[1]。以粗饲料为主要日粮的反刍动物产生大量甲烷, 其瘤胃中的原虫和厌氧真菌数量也大幅度高于采食高精料的动物。瘤胃原虫上紧密附着着许多甲烷菌, 这些甲烷菌利用原虫的发酵产物生成甲烷, 因此原虫被认为与瘤胃甲烷的产生密切相关^[2]。但是关于厌氧真菌与瘤胃甲烷菌的研究很少, 现有的研究仅局限于单一厌氧真菌与单一产甲烷菌的共培养^[3,4], 而与厌氧真菌共存的瘤胃产甲烷菌的种类及其多样性研究则鲜有报道。

在瘤胃厌氧真菌分离培养过程中, 常使用抗生素如青霉素、链霉素抑制瘤胃细菌的生长, 达到富集培养的目的。瘤胃甲烷菌由于其特殊的细胞壁结构, 对青霉素、链霉素不敏感, 而且能利用真菌的发酵产物如 H₂、CO₂、甲酸等产生甲烷。本研究通过这

种分离培养方法获得瘤胃厌氧真菌和产甲烷菌菌群混合物, 并利用 PCR、DGGE、RFLP 等方法, 对真菌培养液中的甲烷菌进行了检测及分析, 研究与瘤胃厌氧真菌共存的甲烷菌种类多样性, 以探讨瘤胃厌氧真菌与产甲烷菌的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 厌氧真菌的分离培养: 厌氧真菌分离自饲喂全干草、装有永久性瘤胃瘘管的本地山羊, 培养基参照朱伟云等^[5]方法配制, 底物为粉碎稻草(直径约为 3mm), 加青霉素(1600IU/mL)和链霉素(2000IU/mL)抑制杂菌生长, 获得厌氧真菌。培养过程中每 3~4d 传代一次。

1.1.2 主要试剂和仪器: 珠磨仪(BioSpec, 美国); Taq 酶、pGEM-T 载体(Promega); 引物合成(Invitrogen); Qiaquick PCR 产物纯化试剂盒(Westburg, the Netherlands); PCR 仪(T1, Biometra, 德国); DCode DGGE 系统、GS-800 型密度校正扫描仪和 Molecular Analyst 1.61(Bio-Rad, 美国)。

1.2 总 DNA 提取和 PCR-DGGE

参照 Zoetendal 等^[6]利用珠磨仪提取总 DNA。利用两对古菌引物 344915^[7]、348691^[8]对总 DNA 进

基金项目: 国家自然科学基金项目(30530560); IAEA 项目(12665/RO)

* 通讯作者。Tel: 86-25-84395523; Fax: 86-25-84395314; E-mail: zhuweiyun@jau@hotmail.com

作者简介: 成艳芬(1980-), 女, 湖北公安人, 博士研究生, 主要从事瘤胃微生物研究。E-mail: yanfencheng@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-06; 接受日期: 2006-04-04; 修回日期: 2006-04-18

行 PCR 扩增, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。DGGE 参照朱伟云等^[9]的方法; DGGE 凝胶以 GS-800 型扫描仪扫描, 利用 Molecular Analyst 对 DGGE 图谱进行相似性分析, 再参照 Konstantinov 等^[10]的方法进行多样性分析。

1.3 克隆和 RFLP 分析

甲烷菌属于古菌, 因此本研究以古菌引物 w02-w17^[11]扩增近全长 16S rDNA 序列, 纯化后连接到载体 pGEM-T 上, 转入 *E. coli* JM109, 以 SP6、T7 进行插入子检测^[6]。用 *Taq* I、*Xho* I、*Hind* III、*Hinf* I 对所得克隆进行多态性分析。

1.4 序列分析及进化树建立

采用 ClustalX、MEGA3.1 软件对本研究得到的甲烷菌序列与 BLAST 分析所得相似性较高的序列进行比较, 绘制系统进化树。本研究所得序列在 GenBank 的登陆号为: DQ355967, DQ355968, DQ372972, DQ372973, DQ372974, DQ372975。

2 结果

2.1 真菌培养液中甲烷菌的检测

图 1 显示, 两对引物 344915、348691 对瘤胃液及真菌经过 62 代传代的培养液总 DNA 均能扩增, 得到条带清晰的 PCR 产物, 真菌培养 62 代, 即 200d 后, 仍能在其培养液中检测到甲烷菌的存在, 说明甲烷菌能与这些厌氧真菌长时间共存。

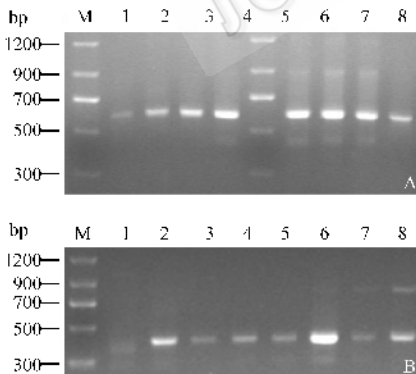


图 1 两对引物 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products amplified from anaerobic fungal culture DNA using primers 344915 (A) and 348691 (B). Samples: 1. Rumen fluid; 2. Fungal culture after 5 subculturing; 3. Fungal culture after 15 subculturing; 4. Fungal culture after 25 subculturing; 5. Fungal culture after 35 subculturing; 6. Fungal culture after 45 subculturing; 7. Fungal culture after 55 subculturing; 8. Fungal culture after 62 subculturing; M. DNA marker. (The same as follows).

2.2 真菌培养液中甲烷菌的多样性

两对引物的扩增产物均进行了 DGGE 分析, 引

物 344915 虽然能扩增样品中的甲烷菌, 但 DGGE 条带非常少, 说明只是扩增了部分产甲烷菌或是产物不能被分开(图片未显示), 因此在本研究中没有继续使用。引物 348691 扩增的 PCR 产物在 DGGE 图谱上形成较多的清晰的条带(图 2), 有些条带经传代后成为优势带, 说明在真菌培养液中这些甲烷菌得到富集(箭头 A、B); 同时, 真菌培养液传代过程中, 有些优势甲烷菌不再成为优势菌(箭头 C), 表明这些甲烷菌不能适应培养条件。有些甲烷菌条带先消失后又出现(箭头 D), 表明这些甲烷菌在真菌传代过程中, 由于不能适应培养条件数量先减少到 DGGE 不能检测的程度, 在生长繁殖过程中慢慢适应培养条件后, 数量增多。

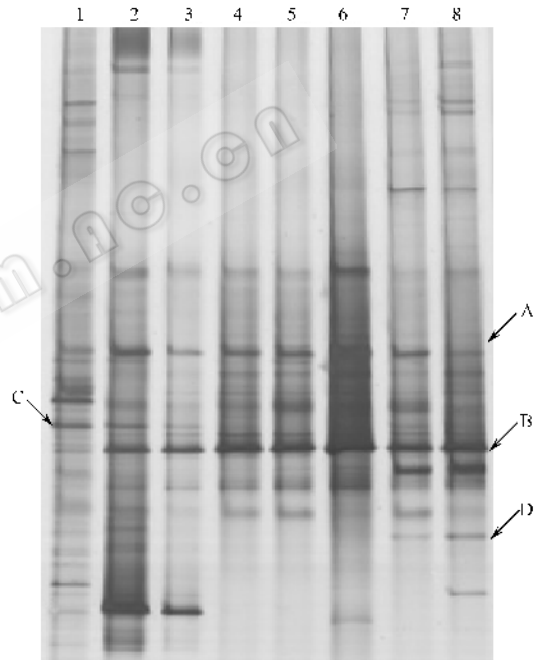


图 2 真菌培养液中甲烷菌 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE profiles of methanogens in anaerobic fungal culture.

相似性分析(图 3)表明: 真菌培养液第 5 代、第 15 代与第 25、35、45、62 代相似性很低, 仅为 34.7%, 说明从真菌分离至第 15 代, 甲烷菌处于适应培养液阶段, 菌群变化很大。第 25 至 62 代, 甲烷菌菌群相似性较高, 最低为 89.2%, 菌群趋于稳定。

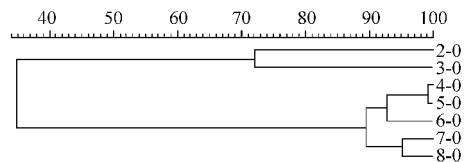


图 3 甲烷菌 DGGE 图谱相似性分析

Fig.3 Similarity analysis of DGGE profiles.

图 4 能更形象地显示在培养过程中甲烷菌多样

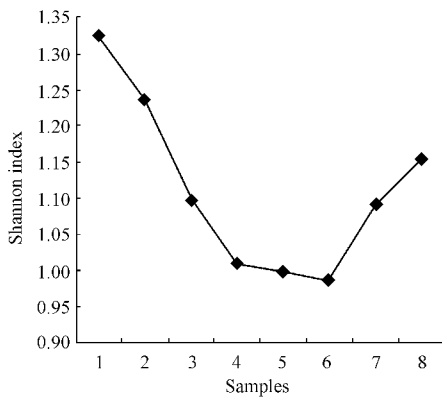


图4 DGGE 图谱多样性指数分析

Fig.4 Shannon index of DGGE profiles.

性的变化。从真菌来源的瘤胃液至第 25 代,甲烷菌菌群多样性急剧下降,由 1.32 降至 1.01,第 25 至 45

代,多样性指数比较稳定,第 45 代至 62 代,多样性指数上升,从 0.99 回升至 1.15,但没有恢复到最初的 1.32。结果说明一部分甲烷菌不能在真菌培养液传代过程中存活,一部分甲烷菌经过培养传代后适应了培养条件从而经过多代的培养后得到富集。

2.3 限制性内切酶多态性分析(RFLP)

利用古菌通用引物对真菌培养液中的甲烷菌进行克隆,共得到阳性克隆 69 个。分别用限制性内切酶 *Taq* I、*Xho* I、*Hind* III、*Hinf* I 对这些克隆进行 RFLP 分析,共得到 5 个 OTU(表 2)。由表 2 可知,OTU5 是克隆中数量占优势的主要甲烷菌类群,OTU5 所包含的克隆数占总克隆的 91.3%,OTU2、OTU3 分别占 2.9%,OTU1、OTU4 分别占 1.45%。

表 2 真菌培养液中甲烷菌克隆 RFLP 分析

Table 2 RFLP analysis of methanogens clones from anaerobic fungal culture

OTU	<i>Taq</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hinf</i> I	Clones
1	-	-	-	400, 200	19
2	-	-	1200, 500	850, 400, 200	31, 111
3	1100, 600, 450	-	-	400, 200	29, 74
4	600, 450	-	-	1200, 500, 750, 400, 200	61
5	600, 450	-	-	400, 200	1-1, 110, 99, 48, 123, 69, 102, 15, 63, 156, 132, 137, 16, 21, 159, 139, 1-7, 151, 2-11, 176, 64, 37, 163, 58, 65, 71, 72, 96, 180, 168, 70, 113, 13, 178, 104, 125, 91, 172, 85, 59, 90, 14, 181, 32, 146, 27, 17, 39, 36, 165, 30, 117, 12, 145, 38, 184, 149, 148, 62, 133, 161, 170, 177

Note: - 'denotes uncut band.

2.4 序列比较和进化树建立

为了初步探讨这些存在于厌氧真菌培养液中的甲烷菌的进化地位,分别从 5 个 OTUs 中选择 6 个克隆测序(克隆号为 19、31、61、74、85、102),将序列提

交 NCBI 进行 BLAST 分析。结果显示,克隆 19、74、85、102 的最相似菌均为 Uncultured archaeal symbiont PA202,相似性均为 95%,最相似已知菌为 Uncultured *Methanobacteriales archaeon* CSIRO1.04,相似性为

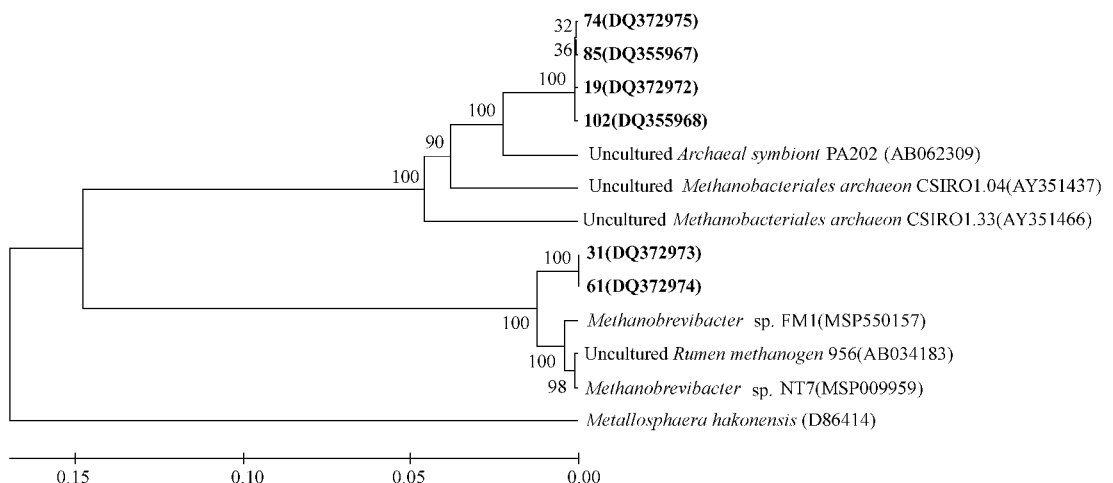


图 5 真菌培养液中甲烷菌克隆系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of six clones from the anaerobic fungal culture. Sequences determined in this study are marked in bold type. Accession numbers are given in parentheses. The root was determined by using archaea 16S rDNA gene sequence as an outgroup. The topology of the tree was estimated by bootstraps based on 1000 replications. Numbers at nodes are percentages support © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

92%。没有与这些克隆相似性较高 (>90%) 的已培养甲烷菌。克隆 31、61 的最相似菌均为 Uncultured rumen methanogen 956, 相似性均为 97%。最相似已知菌为 *Methanobrevibacter* sp. NT7, 相似性为 97%。在系统进化树中(图 5), 克隆 19、74、85、102 与克隆 31、61 处于两个截然不同的分支上, 进化关系较远, 由此可认为瘤胃真菌培养液中的这种甲烷菌是未知的新种。

3 讨论

在瘤胃中, 细菌、原虫、厌氧真菌和甲烷菌相互依赖、相互制约, 其中甲烷菌必须依赖于纤维降解细菌、原虫和厌氧真菌的发酵产物产生甲烷。Nakashimada 等报道, 将厌氧真菌 *Neocallimastix frontalis* 与甲烷菌 *M. formicicum* 共培养 7d, 培养液中没有 H₂ 和甲酸积累, 同时产生甲烷 16mmol/L; 与 *M. concilii* 共培养 17d, 培养液中乙酸产量降低, 产生甲烷 12mmol/L; 将这 3 株菌共培养 17d, 乳酸和乙醇产量降低, 产生甲烷 24mmol/L^[3]。因此, 本研究从瘤胃中分离到的混合厌氧真菌在发酵以稻草为底物的粗纤维过程中可能为其中的甲烷菌提供了良好的生长基质, 这些甲烷菌经过 60 余代的培养仍较好地共存于厌氧真菌培养液中。

瘤胃甲烷菌与厌氧真菌的这种共存关系也有助于瘤胃甲烷菌的分离培养。目前, 越来越多的甲烷菌被分离培养出来, Simankova 等^[12]从冷陆地分离培养到五株产甲烷古菌。Ma 等^[13]从厌氧消化器中分离到一种新的甲烷杆菌。但是, 由于培养条件的严格以及生长周期长等原因, 已知的瘤胃产甲烷菌只有极少数^[1]。本研究结果也表明存在于真菌培养液中的多数瘤胃甲烷菌是迄今未知的种。一般情况下, 甲烷菌的培养需要 20 多天传一代, 本研究通过与厌氧真菌共培养技术, 原本需要 20 多天传一代的甲烷菌也适应了 3~4d 传代的条件。因此, 本研究采用的与瘤胃厌氧真菌共培养技术途径不仅有助于我们对瘤胃甲烷菌的检测, 可能也为人们分离培养瘤胃甲烷菌提供一条新思路。

本研究利用两对引物(344915 与 348691) 分别扩增古菌 16S rDNA(图 1)。引物 344915 扩增的片段约 600bp, 其产物经琼脂糖凝胶电泳检测条带清晰明亮, 虽然这对引物的扩增片段更长, 有利于获得更多的系统进化信息, 但 DGGE 条带数少(图片未显示) 扩增多样性差, 这可能与 DGGE 检测灵敏度相关。Muyzer 等认为, DGGE 技术对小于 500bp 的 DNA

片段具有较好的分辨能力, 而对 500bp 以上的 DNA 片段的分辨效果不理想^[14]。本研究结果也表明, 另一对引物 348691 扩增约 400bp 片段, 其产物 DGGE 条带多且清晰。

本研究利用 RFLP 分析共获得 5 个操作分类单元, Whitby 等^[15]对 230 种内切酶进行了筛选, 最后选择 12 种内切酶对甲烷菌进行 RFLP 分析, 结果表明利用 *Xho* I、*Hind* III、*Hinf* I 这 3 种内切酶能快速可靠的区分不同甲烷菌。本研究中 *Xho* I 未能切开任何克隆, 可能是由于真菌培养液中存在的甲烷菌不含该酶的酶切位点或酶切位点较少, 不易被切开; *Hinf* I 能将所有克隆切开, 并且能较好地地区分不同种的操作分类单元。但是, 本研究所得酶切片长度与 Whitby 等^[15]分析的 71 种可培养甲烷菌酶切片长度不一致, 表明本研究所得克隆可能不属于这些可培养甲烷菌。16S rDNA 分析也表明, 这些产甲烷菌为迄今未知的新种。因此, 这些与厌氧真菌共存的甲烷菌种类及其特性仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 朱伟云. 瘤胃微生物. 见: 冯仰廉. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] Regensbogenova M, McEwan NR, Javorsky P, et al. A re-appraisal of the diversity of the methanogens associated with the rumen ciliates. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **238**: 307-313.
- [3] Nakashimada Y, Srinivasan K, Murakami M, et al. Direct conversion of cellulose to methane by anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* and defined methanogens. *Biotechnology Letters*, 2000, **22**: 223-227.
- [4] Joblin KN, Matsui H, Naylor GE, et al. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. *Current Microbiology*, 2002, **45**(1): 46-53.
- [5] 朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 等. 厌氧真菌体外发酵筛选技术的研究. 南京农业大学学报, 2001, **24**: 44-48.
- [6] Zoetendal EG, Akkermans ADL. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3854-3859.
- [7] Chan OC, Wolf M, Hepperle D, et al. Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 119-129.
- [8] Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, et al. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **232**: 153-163.
- [9] 朱伟云, 姚文, 毛胜勇. 变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化. 微生物学报, 2003, **43**(4): 503-508.

- [10] Konstantinov SR, Zhu WY, Williams BA, *et al.* Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**:225 – 235.
- [11] Leclerc M, Delbes C, Moletta R, *et al.* Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **34**:213 – 220.
- [12] Simankova MV, Kotsyurbenko OR, Lueders T, *et al.* Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, **26**:312 – 318.
- [13] Ma K, Liu X, Dong X. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, **55**:325 – 329.
- [14] Muyzer G, Brinkhoff T, Nubel U, *et al.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998, 1 – 27.
- [15] Whitby C, Earl J, Lanyon C, *et al.* The molecular diversity of the methanogenic community in a hypereutrophic freshwater lake determined by PCR-RFLP. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **97**:973 – 984.

Detection and diversity analysis of rumen methanogens in the co-cultures with anaerobic fungi

CHENG Yan-fen¹, MAO Sheng-yong¹, PEI Cai-xia¹, LIU Jian-xin², ZHU Wei-yun^{1*}

(¹ *Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

(² *College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract Rumen methanogen diversity in the co-cultures with anaerobic fungi from goat rumen was analyzed. Mix-cultures of anaerobic fungi and methanogens were obtained from goat rumen using anaerobic fungal medium and the addition of penicillin and streptomycin and then subcultured 62 times by transferring cultures every 3 ~ 4d. Total DNA from the original rumen fluid and subcultured fungal cultures was used for PCR/DGGE and RFLP analysis. 16S rDNA of clones corresponding to representative OTUs were sequenced. Results showed that the diversity index (Shannon index) of the methanogens generated from DGGE profiles reduced from 1.32 to 0.99 from rumen fluid to fungal culture after 45 subculturing, with the lowest similarity of DGGE profiles at 34.7%. The Shannon index increased from 0.99 to 1.15 from the fungal culture after 45 subculturing to that after 62 subculturing, with the lowest similarity at 89.2%. A total of 5 OTUs were obtained from 69 clones using RFLP analysis and six clones representing the 5 OTUs respectively were sequenced. Of the 5 OTUs, three had their cloned 16S rDNA sequences most closely related to uncultured archaeal symbiont PA202 with the same similarity of 95%, but had not closely related to any identified culturable methanogen. The rest two OTUs had their cloned 16S rDNA sequences sharing the same closest relative, uncultured rumen methanogen 956, with the same similarity of 97%. Their 16S rDNA sequences of these two OTUs also showed 97% similar to the closest identified culturable methanogen *Methanobrevibacter* sp. NT7. In conclusion, diverse yet unidentified rumen methanogen species exist in the co-cultures with anaerobic fungi isolated from the goat rumen.

Keywords : Anaerobic fungi ; Methanogens ; DGGE ; RFLP

Foundation item : Natural Science Foundation of China (30530560) ; IAEA project (12665/RO)

* Corresponding author. Tel : 86-25-84395523 ; Fax : 86-25-84395314 ; E-mail : zhuweiyunnjau@hotmail.com

First author. Tel : 86-25-84395523 ; E-mail : yanfencheng@yahoo.com.cn

Received : 6 March 2006 / Accepted : 4 April 2006 / Revised : 18 April 2006