

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(5):563-571; 4 May 2014  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.011

## 瘤胃降解粗纤维产甲烷的厌氧真菌与甲烷菌共培养物的分离鉴定

孙美洲, 金巍, 李袁飞, 毛胜勇, 成艳芬\*, 朱伟云

南京农业大学消化道微生物实验室, 江苏 南京 210095

**摘要** 【目的】本试验从瘤胃中分离鉴定降解粗纤维产甲烷的厌氧真菌与甲烷菌共培养物, 为深入探究甲烷菌对厌氧真菌代谢途径的影响及相关调节机制奠定基础。【方法】利用厌氧滚管技术从荷斯坦奶牛瘤胃内容物中分离厌氧真菌与甲烷菌共培养物, 通过形态学观察和 DAPI 染色以及甲烷菌 16S rRNA 基因序列分析方法分别对厌氧真菌及甲烷菌进行鉴定。【结果】从荷斯坦奶牛瘤胃中共分离到 28 株厌氧真菌与甲烷菌共培养物。共培养物中的厌氧真菌均为单中心菌株, 分别属于 *Piromyces*, *Neocallimastix* 和 *Caecomyces* 属, 所占百分比为 53.57%, 42.86% 及 3.57%。甲烷菌 16S rRNA 基因序列分析结果表明, 共培养物中的甲烷菌均为甲烷短杆菌。本研究共获得四种不同的厌氧真菌与甲烷菌组合, 分别为 *Piromyces*/类 *Methanobrevibacter olleyae* 菌株, *Neocallimastix*/类 *Methanobrevibacter olleyae* 菌株, *Neocallimastix*/类 *Methanobrevibacter thaueri* 菌株及 *Caecomyces*/类 *Methanobrevibacter olleyae* 菌株, 分别占总数的 53.57%, 39.29%, 3.57% 及 3.57%。【结论】分离得到的 28 株厌氧真菌和甲烷菌共培养物中, 占优势的为具有丰富丝状假根的厌氧真菌 *Piromyces* 和 *Neocallimastix* 以及类 *Methanobrevibacter olleyae* 属的甲烷短杆菌。本研究为进一步研究瘤胃内厌氧真菌与甲烷菌相互代谢关系奠定基础。

**关键词:** 厌氧真菌, 甲烷菌, 共培养

中图分类号: Q938 文章编号: 0001-6209(2014)05-0563-09

甲烷作为瘤胃代谢的终产物之一, 它的产生既是动物能量的浪费, 同时, 也对温室效应有一定影响, 因此瘤胃甲烷菌及甲烷形成机制的研究受到广泛关注。但瘤胃内甲烷菌不能直接降解动物日粮产生甲烷, 只能利用瘤胃内其它微生物发酵产生的简单化合物如甲酸、乙酸、 $H_2$  和  $CO_2$  等生成甲烷<sup>[1]</sup>。反刍动物瘤胃内栖息的微生物包括厌氧真菌、古菌、原虫和真细菌<sup>[2]</sup>。在长期进化过程中, 这些微生物

间形成了相互依存、相互制约的复杂关系, 并通过代谢等方面的协同作用在提高瘤胃粗纤维降解能力中发挥了重要作用。瘤胃内厌氧真菌由于其强大的粗纤维降解能力, 能够利用瘤胃中其他微生物不能利用的可发酵碳水化合物<sup>[3]</sup>, 在提高反刍动物粗饲料利用价值中扮演着尤为重要的角色。在瘤胃粗纤维降解过程中, 厌氧真菌能够通过假根系统侵袭植物细胞壁组织, 并产生纤维降解酶如纤维素酶、半纤维

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072052, 31101735); 中央高校基本科研业务费专项资金(KYZ201312)

\* 通信作者。Tel: +86-43770531153; E-mail: yanfencheng@njau.edu.cn

作者简介: 孙美洲(1989-), 女, 吉林白城人, 硕士研究生, 研究方向为消化道微生物学。E-mail: 1746956703@qq.com

收稿日期: 2013-10-27; 修回日期: 2014-01-26

素酶及木质素酶等以降解纤维素和半纤维素产生乙酸、甲酸、乳酸、 $H_2$  和  $CO_2$ 、琥珀酸以及少量的乙醇等<sup>[4-5]</sup>。而甲烷菌作为反刍动物瘤胃中主要的氢利用菌,则可利用厌氧真菌的代谢产物如  $H_2$ 、 $CO_2$ 、甲酸和乙酸等产生甲烷<sup>[1]</sup>。因此,瘤胃内厌氧真菌与甲烷菌在瘤胃粗纤维降解产生甲烷过程中可能存在某种密切关系。

目前已有的研究表明,甲烷菌可以和厌氧真菌在体外培养条件下形成共培养体系<sup>[6-7]</sup>。在该共培养体系中,甲烷菌不仅能够提高厌氧真菌的纤维降解能力,还能改变厌氧真菌的代谢途径<sup>[8]</sup>。但是这些厌氧真菌和甲烷菌共培养方面的研究主要集中在某些已经分离纯化的厌氧真菌菌株和甲烷菌菌株的简单组合<sup>[7-9]</sup>,而这种纯菌的简单组合并不能很好的反映瘤胃中厌氧真菌与甲烷菌的实际关系。Cheng 等<sup>[10]</sup>从瘤胃内容物中得到了厌氧真菌和甲烷菌的混合共培养体系,并研究了该共培养体系中的甲烷菌对厌氧真菌代谢的影响以及不同传代频率对共培养中微生物区系的影响。但该混合共培养体系中存在多种厌氧真菌和甲烷菌,无法深入研究共存甲烷菌对厌氧真菌代谢途径的影响及相关调节机制。因此,本研究拟通过厌氧滚管技术获得厌氧真菌与甲烷菌简单共培养物,并对其中厌氧真菌与甲烷菌进行鉴定,探讨瘤胃内厌氧真菌与甲烷菌间的共存关系,为进一步揭示瘤胃内微生物间代谢关系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 瘤胃内容物的采集

实验动物为南京农业大学江浦农场 3 头饲喂稻草和苜蓿并装有永久性瘘管的荷斯坦奶牛。早 7:00 和晚 19:00 各饲喂 1 次,每次干物质采食量为 9 kg,日粮精粗比为 3:7,自由饮水。奶牛瘤胃内容物通过负压装置从瘘管中采集,装入已灭菌充满  $CO_2$  的厌氧瓶并放入 39℃ 的保温瓶中,迅速带回实验室,进行厌氧真菌和甲烷菌共培养物的富集与分离培养。

### 1.2 厌氧真菌与甲烷菌共培养物的分离纯化

分离用培养基参照 Davies<sup>[11]</sup> 的方法配制。将 3 头奶牛的新鲜瘤胃内容物充分混合后,取 5 mL 接入已预热的含有抗生素(1600 U/mL 青霉素;

2000 U/mL 链霉素)的 90 mL 基础培养基(含有 1% 稻草)中,利用 Hungate 滚管技术进行厌氧真菌和甲烷菌共培养物的分离纯化,具体步骤参照 Ozkose<sup>[12]</sup> 等描述的方法进行。分离纯化大概步骤如下:将 0.5 mL 厌氧真菌与甲烷菌富集培养液接种至 4.5 mL 含琼脂糖的培养基中(接种前培养基在开水中煮沸,然后冷却至 50℃ 用于接种),冰上迅速滚管至培养基凝固并均匀分布于管壁,39℃ 静置培养 3 d 后,在倒置显微镜下观察厌氧真菌菌落形态,选择周围没有其他菌落的单一厌氧真菌菌落,根据甲烷菌自身荧光特点,在荧光显微镜下观察是否有荧光产生,如有荧光产生,则挑取该厌氧真菌菌落至新鲜的液体培养基中,同时,整个分离纯化过程用气相色谱仪(Shimadzu, GC-14B, Japan)检测是否有甲烷产生。滚管挑菌过程至少重复 3 次,直至显微镜检查滚管中所有菌落形态一致。厌氧真菌与甲烷菌共培养物每 3 d 传一代,39℃ 静置培养。分离培养过程中一直使用 PYG 培养基检测是否有细菌污染,去除有细菌污染的共培养物。

### 1.3 甲烷测定

甲烷的测定参照胡伟莲等<sup>[13]</sup>的气相色谱法。仪器及相关参数如下:GC-14B 型气相色谱仪(Shimadzu, GC-14B, Japan)柱温 80℃,汽化室温度 100℃,氢离子火焰检测器,检测温度 120℃,载气为氮气,压力 0.05 MPa,氧气压力 0.05 MPa,氢气压力 0.05 MPa,灵敏度(档)为  $10^{-1}$ ,衰减 3.0。

### 1.4 共培养物中厌氧真菌和甲烷菌的鉴定

1.4.1 厌氧真菌鉴定:根据朱伟云<sup>[1]</sup>描述的方法,取 100  $\mu$ L 培养液置于载玻片上,在正置显微镜(Eclipse 80i, Nikon, Japan)下观察厌氧真菌菌丝体,游动孢子囊以及游动孢子形态。结合 DAPI 染色结果,对厌氧真菌鉴定到属。DAPI 染色方法如下:吸取 1 mL 生长 3 天的真菌培养液于载玻片,滴加 10  $\mu$ L 50  $\mu$ g/mL DAPI(4',6-联脒-2-苯基吡啶,4',6-diamidino-2-phyllindole),暗室 5 min 进行细胞核染色并用荧光显微镜(Eclipse 80i, Nikon, Japan)观察细胞核分布情况。

1.4.2 甲烷菌鉴定:利用 16S rRNA 基因序列分析技术对共培养物中的甲烷菌进行鉴定。取培养 3 d 的共培养液 10 mL,12000  $\times$  g 离心 10 min,沉淀用 1 mL PBS(0.01 mol/L)清洗后 12000  $\times$  g 离心 5 min, -20℃ 保存沉淀用于 DNA 提取。参照 Zoetendal 珠

磨仪法<sup>[14]</sup>提取共培养物 DNA,并用 Nanodrop (Thermo Scientific, American) 测定 DNA 浓度。以甲烷菌 16S rRNA 基因通用引物 Met86F (5'-GCTCAGTAACACGTGG-3') 和 Met1340R (5'-CGGTGTGTGCAAGGAG-3') 扩增共培养液中甲烷菌 16S rRNA 基因序列<sup>[15]</sup>,PCR 产物经 1.2% 琼脂糖检测后送深圳华大基因上海分公司测序,测序结果提交 NCBI (GenBank 登录号: KF49307-KF49334) 并进行同源性比较,采用 MEGA6 软件进行系统进化分析并绘制系统进化树。

## 2 结果

### 2.1 共培养中厌氧真菌的鉴定

表 1. 厌氧真菌与甲烷菌共培养物中厌氧真菌的形态学鉴定

Table 1. Morphology of anaerobic fungi in co-cultures

genera	morphology	DAPI staining	co-culture
<i>Piromyces</i>	monocentric thallus; spherical or oval sporangium;	nuclei present in	L1-L4 ,A1 ,A5 ,A8 A10 ,
	filamentous rhizoids; uniflagellate zoospores	sporangium	A18 ,B1 , B3-B5 ,B24 ,B28
<i>Neocallimastix</i>	monocentric thallus; spherical or oval sporangium;	nuclei present in	A2-A4 , A6 ,A7 ,
	filamentous rhizoids; polyflagellate zoospores	sporangium	A9 ,A11-A16
<i>Caecomyces</i>	monocentric thallus; spherical sporangium; unbranched sporangiophores;	nuclei present in	B31
	uniflagellate zoospores	sporangium	

### 2.2 共培养物中甲烷菌的鉴定

共培养物中甲烷菌 16S rRNA 基因序列分析结果表明: 共培养物中的甲烷菌均属于甲烷短杆菌 (表 2)。其中, 15 株甲烷菌与 *Methanobrevibacter* sp. AK-87 最相似, 相似性为 99.8% - 100%, 占总甲烷菌的 53.57%; 7 株甲烷菌的最相似菌为 *Methanobrevibacter* sp. Z8, 相似性为 97.5% - 100%, 占总甲烷菌的 25%; 5 株甲烷菌的最相似菌为 *Methanobrevibacter* sp. NT7, 相似性为 99.8% - 99.9%, 占总甲烷菌的 17.86%; 剩余 1 株甲烷菌与 *M. thaueri* strain CW 最为相似, 相似性为 99.2%, 占总甲烷菌的 3.57%。在鉴定的 28 株甲烷菌中, 27 株 (*Methanobrevibacter* sp. AK-87, *Methanobrevibacter* sp. Z8 与 *Methanobrevibacter* sp. NT7 相似菌) 为类 *M. olleyae* 菌株, 属于甲烷短杆菌 RO 簇 (*M. ruminantium* (R) 与 *M. olleyae* (O)), 为共培养中的优势甲烷菌; 仅有 1 株 (*M. thaueri* strain CW 相似菌) 为类 *M. thaueri* 菌株, 属于甲烷短杆菌 SGMT 簇 (*M. smithii* (S)、*M. gottschalkii* (G)、*M. millerae* (M)

以荷兰斯坦奶牛瘤胃内容物为接种物, 通过 Hungate 滚管、抗生素筛选以及气相色谱检测, 分离纯化得到 28 个厌氧真菌与甲烷菌共培养物。对共培养物中的厌氧真菌进行形态学观察 (菌丝体、孢子囊及游动孢子观察) 和 DAPI 染色, 鉴定结果见表 1。共培养物中的厌氧真菌属于 *Piromyces*、*Neocallimastix*、*Caecomyces* 3 个属。其中单中心菌体、丝状假根、单鞭毛游动孢子的 *Piromyces* 菌株 15 株 (图 1), 占总厌氧真菌的比例为 53.57%, 单中心菌体、丝状假根、多鞭毛游动孢子的 *Neocallimastix* 菌株 12 株, 占总厌氧真菌的比例为 42.86%, 单中心球状菌体 *Caecomyces* 菌株仅 1 株, 占 3.57%。

和 *M. thaueri* (T))。

本研究所得 28 株甲烷菌之间的相似性结果显示, LGM-ZA4 作为唯一一株类 *M. thaueri* 菌株, 与其他 27 株甲烷菌的相似性为 93.2% - 94.5%。LGM-SL1、LGM-SL2、LGM-SL4 三株菌之间的相似性为 100%, 与其他 24 株类 *M. olleyae* 菌株相似性较低, 为 97.6% - 97.9%。剩余 24 株甲烷菌之间的相似性为 99.6% - 100%, 其中 LGM-ZA1、LGM-ZA7、LGM-ZA13 和 LGM-MB5 及 LGM-MB28 这 5 株菌之间的相似性为 100%, LGM-MB1、LGM-MB4 及 LGM-ZA8 和 LGM-ZA11 这 4 株菌之间的相似性为 100%, 除 LGM-ZA16 外, 剩余 14 株菌之间的相似性为 100%。

以 *Methanobacterium* 为外类群 (outgroup) 对本试验所得甲烷菌序列、最相似甲烷菌序列及相应模式菌株 16S rRNA 基因序列进行系统进化分析, 结果显示, 本试验所得甲烷菌主要分布于甲烷短杆菌的 RO 簇分支上 (27 株), 其中 LGM-SL1、LGM-SL2、LGM-SL4 三株菌虽属于 RO 簇, 但与本试验所得其

他 24 株 RO 簇甲烷短杆菌及 RO 簇模式菌株 (*M. ruminantium* 与 *M. olleyae*) 相似性较低 (97.1% - 97.9%) ,处于 RO 簇中较为独立的分支上 ,目前还

没有得到与这 3 株菌相似性更高的甲烷短杆菌模式菌株(图 2)。

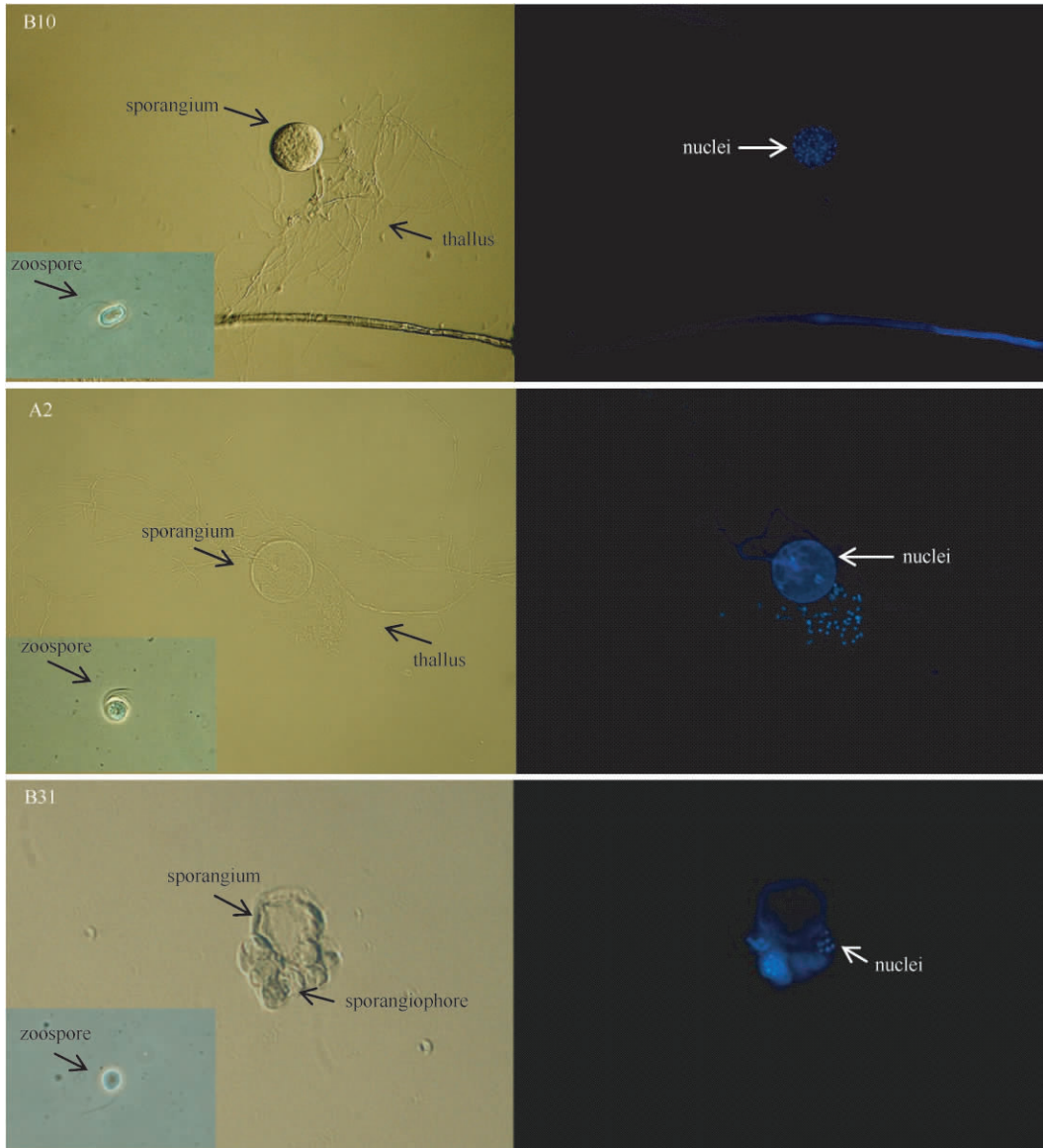


图 1. 厌氧真菌与甲烷菌共培养中厌氧真菌形态

Figure1. Morphology of anaerobic fungi in the co-cultures of anaerobic fungus and methanogen. Left , anaerobic fungal sporangia and their zoospores , Magnification about  $10 \times 40$ ; right , DAPI nuclei staining. Magnification about  $10 \times 20$ ; B10 , monocentric thallus , uniflagellate zoospores; A2 , monocentric thallus , polyflagellate zoospores; B31 , monocentric thallus , uniflagellate zoospores , unbranched sporangiophores.

### 2.3 共培养中厌氧真菌与甲烷菌相互关系

厌氧真菌形态学观察、DAPI 染色鉴定及甲烷菌 16S rRNA 基因序列分析结果表明 ,本试验分离到的 28 个共培养物中甲烷菌与厌氧真菌均符合“一对一”的关系 ,即每个共培养物中仅存在一种厌氧真菌和一种甲烷菌。根据共培养物中厌氧真菌和甲烷

菌种类的不同 ,可将本试验所得 28 个共培养物分为 4 类 ,分别为 *Piromyces* /类 *M. olleyae*、*Neocallimastix* /类 *M. olleyae*、*Neocallimastix* /类 *M. thaueri* 和 *Caecomyces* /类 *M. olleyae*。其中 *Piromyces* /类 *M. olleyae* 和 *Neocallimastix* /类 *M. olleyae* 是共培养中的优势菌群 ,所占比例分别达到 53.57% 和 39.29% ;

而后两类分别只有一个共培养物,仅各占共培养物的 3.57% (图 3)。研究结果还显示:本试验所得 15 株厌氧真菌 *Piromyces* 上均共存着甲烷短杆菌 RO 簇类 *M. olleyae* 菌株,没有 SGMT 簇甲烷短杆菌共

存;而厌氧真菌 *Neocallimastix* 上共存着 RO 簇与 SGMT 簇(类 *M. olleyae* 与类 *M. thaueri* 菌株)两类甲烷短杆菌,但类 *M. olleyae* 菌株仍是主要的共存甲烷菌。

表 2. 厌氧真菌与甲烷菌共培养物中甲烷菌的鉴定

Table 2. 16S rRNA gene sequencing of methanogens in 28 co-cultures of anaerobic fungus and methanogen

methanogen	nearest recognized taxon	accession	sequence	nearest type strain	sequence	associated	co-culture
		number	similarity		similarity		
LGM-SL3	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49333	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Piromyces</i>	L3
LGM-MB3	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49325	99.9	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Piromyces</i>	B3
LGM-MB8	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49328	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Piromyces</i>	B8
LGM-ZA5	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49311	99.9	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Piromyces</i>	A5
LGM-ZA10	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49316	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Piromyces</i>	A10
LGM-ZA18	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49323	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Piromyces</i>	A18
LGM-ZA2	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49308	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A2
LGM-ZA3	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49309	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A3
LGM-ZA6	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49312	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A6
LGM-ZA9	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49315	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A9
LGM-ZA12	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49318	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A12
LGM-ZA14	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49320	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A14
LGM-ZA15	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49321	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Neocallimastix</i>	A15
LGM-ZA16	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49322	99.8	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.1	<i>Neocallimastix</i>	A16
LGM-MB31	<i>Methanobrevibacter</i> sp. AK-87	KF49330	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.3	<i>Caecomyces</i>	B31
LGM-ZA8	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49314	99.9	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Piromyces</i>	A8
LGM-SL1	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49331	97.5	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	97.5	<i>Piromyces</i>	L1
LGM-SL2	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49332	97.5	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	97.5	<i>Piromyces</i>	L2
LGM-SL4	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49334	97.7	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	97.5	<i>Piromyces</i>	L4
LGM-MB1	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49324	99.8	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Piromyces</i>	B1
LGM-MB4	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49326	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Piromyces</i>	B4
LGM-ZA11	<i>Methanobrevibacter</i> sp. Z8	KF49317	100	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Neocallimastix</i>	A11
LGM-MB5	<i>Methanobrevibacter</i> sp. NT7	KF49327	99.9	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Piromyces</i>	B5
LGM-MB28	<i>Methanobrevibacter</i> sp. NT7	KF49329	99.8	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Piromyces</i>	B28
LGM-ZA1	<i>Methanobrevibacter</i> sp. NT7	KF49307	99.9	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Piromyces</i>	A1
LGM-ZA7	<i>Methanobrevibacter</i> sp. NT7	KF49313	99.8	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Neocallimastix</i>	A7
LGM-ZA13	<i>Methanobrevibacter</i> sp. NT7	KF49319	99.9	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	99.2	<i>Neocallimastix</i>	A13
LGM-ZA4	<i>Methanobrevibacter thaueri</i> strain CW	KF49310	99.2	<i>Methanobrevibacter thaueri</i> strain CW	99.2	<i>Neocallimastix</i>	A4

### 3 讨论

自 1975 年 Orpin 首次证实厌氧真菌的存在以来,国内外学者已先后从草食动物胃肠道和粪便中分离出 6 个属的厌氧真菌,包括单中心丝状假根 *Piromyces* 与 *Neocallimastix*、多中心丝状假根 *Anaeromyces* 与 *Orpinomyces* 以及球状菌体 *Caecomyces* 和 *Cyllamyces*<sup>[12]</sup>。Kittelman 等<sup>[16]</sup>对新西兰山羊、奶牛和鹿的 53 个样品中厌氧真菌的多样性研究表明,单中心丝状假根 *Piromyces* 和

*Neocallimastix* 在反刍动物瘤胃中占优势地位。本研究 28 个共培养物中 *Piromyces* 和 *Neocallimastix* 菌株共 27 株,占总厌氧真菌的 96.43%。相比于通过膨胀生长来破坏植物颗粒的球状厌氧真菌,丝状假根厌氧真菌 *Piromyces* 和 *Neocallimastix* 通过丰富假根侵袭植物片段<sup>[1]</sup>并在短时间内产生大量游动孢子<sup>[17]</sup>来快速获得有利的生存条件,因而这两个属的厌氧真菌在草食动物体内及以粗饲料为底物的体外培养条件下都占优势。

Pierre 等<sup>[18]</sup>研究表明,作为典型的氢营养型甲烷菌,甲烷短杆菌是草食动物消化道中的优势甲烷

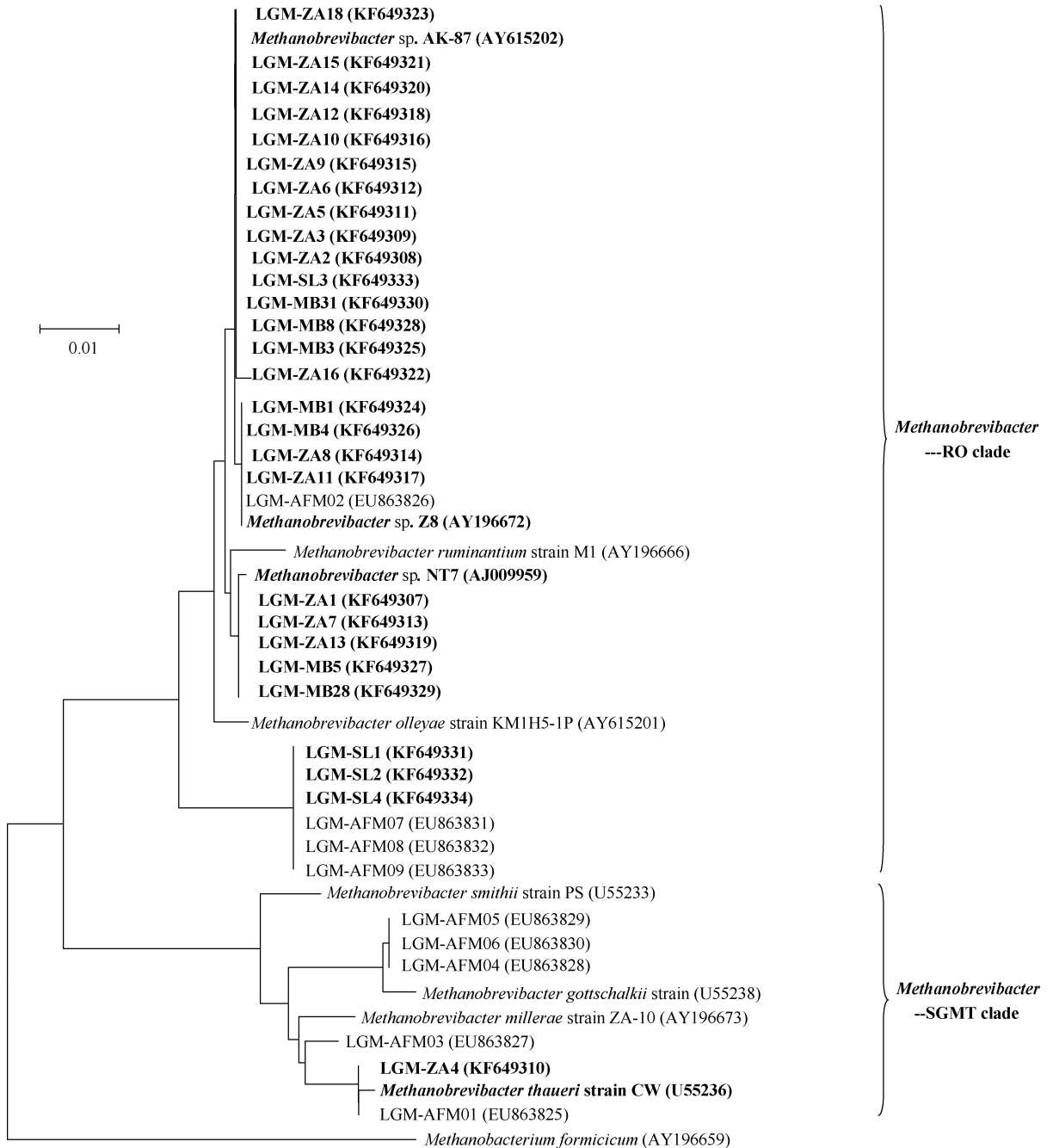


图 2. 厌氧真菌与甲烷菌共培养物中甲烷菌 16S rRNA 系统进化树分析

Figure 2. Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene sequences of the methanogens in co-cultures of anaerobic fungus and methanogen. The root was determined by using *Methanobacterium* 16S rRNA gene sequence as out group. The topology of the tree was estimated by bootstraps based on 1000 replications. Sequences determined in this study and the closest relatives were marked in bold type.

菌,同时作者根据系统进化关系的分布将甲烷短杆菌划分为两大类,即SGMT簇甲烷短杆菌和RO簇甲烷短杆菌。近年来有关甲烷短杆菌SGMT和RO簇在草食动物消化道内的分布研究表明,虽然甲烷短杆菌为草食动物消化道内的优势菌群,但SGMT

和RO簇甲烷短杆菌在不同动物中所占比例不同<sup>[18]</sup>,而这种分布的区别可能更好的反映甲烷短杆菌菌群在不同条件下产甲烷的能力<sup>[19]</sup>。本研究从荷斯坦奶牛瘤胃中获得的28个共培养物中的甲烷菌均属于甲烷短杆菌,其中RO和SGMT簇的甲烷

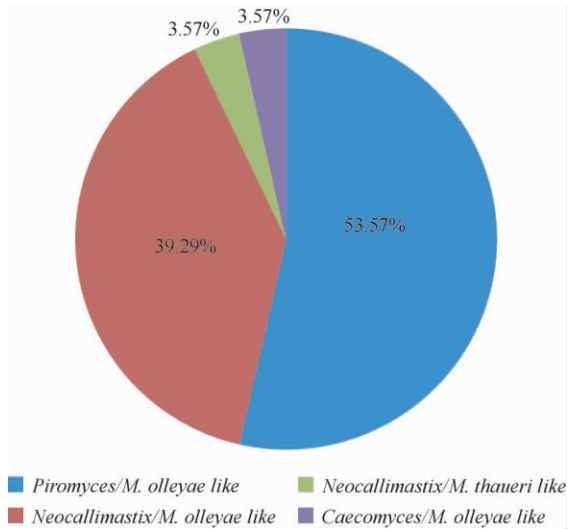


图 3. 4 类厌氧真菌与甲烷菌组合在共培养物中的分布比例

Figure 3. Percentage of 4 types of anaerobic fungus and methanogen in co-cultures.

短杆菌分别占总数的 96.43% 以及 3.57% ,说明 RO 簇甲烷短杆菌可能在共培养物的分离中更占优势。

目前,虽已有厌氧真菌和甲烷菌的分离培养及体外单纯组合特性的报道<sup>[6-7]</sup>,但有关厌氧真菌和甲烷菌自然存在条件下的相互关系尚不明确。Gordon 和 Phillips 推测,瘤胃中厌氧真菌和甲烷菌可能有类似于原虫和甲烷菌的自然共生关系<sup>[4]</sup>。在 Cheng 等对厌氧真菌与甲烷菌混合共培养研究的基础上<sup>[10]</sup>, Jin 等<sup>[20]</sup>从 6 种不同草食动物粪便样品中获得 8 株厌氧真菌和甲烷菌共培养物,但由于该研究所得菌株数量较少(每个样品最多获得 3 个共培养物),无法明确厌氧真菌与甲烷菌间的相互关系。本研究从荷斯坦奶牛瘤胃内容物中分离得到了 28 个厌氧真菌与甲烷菌共培养物,并确定了共培养物中厌氧真菌与甲烷菌存在“一对一”的共生关系,且以 *Piromyces* 和 *Neocallimastix* 属厌氧真菌与类 *M. olleyae* 组合为主。目前报道的来自于反刍动物且能利用甲酸及 CO<sub>2</sub> 的甲烷短杆菌仅有 *M. millerae* 及 RO 簇甲烷短杆菌<sup>[21]</sup>。作为瘤胃中数量占优的氢营养型甲烷菌,RO 簇甲烷短杆菌可在体外培养过程中利用厌氧真菌产生的氢气和甲酸迅速生长。结合 Griffith 2009 年的研究以及本文试验结果推测,*Piromyces* 和 *Neocallimastix* 属的单中心厌氧真菌在以稻草为底物的体外培养条件下可能具有一定的生长优势<sup>[22]</sup>,丰富假根也利于甲烷菌的附着<sup>[23]</sup>。甲

烷菌在体外纯培养时生长缓慢,一般需 15-20 d,而当它与厌氧真菌体外共培养时,传代时间缩短到 3-4 d,这暗示两者在代谢上可能存在更为密切的关系,厌氧真菌可能为甲烷菌的生长提供未知生长因子<sup>[10]</sup>,而两者间代谢关系还有待进一步深入研究。值得注意的是,尽管本研究获得了 28 株厌氧真菌与甲烷菌紧密连接的共培养物,但另有 30 株共培养物中的甲烷菌在分离纯化过程中逐渐消失,成为厌氧真菌纯培养,而这些厌氧真菌在甲烷菌消失后也可以生长良好。这暗示不是所有瘤胃厌氧真菌与甲烷菌都存在紧密连接,那么哪些厌氧真菌与甲烷菌关系密切? 哪些甲烷菌与厌氧真菌关系密切? 后续试验还需分离鉴定大量厌氧真菌与甲烷菌共培养物来回答这些问题。

厌氧真菌与甲烷菌共培养的研究不仅有助于进一步揭示反刍动物中厌氧真菌和甲烷菌的密切关系,还能为厌氧真菌在工业上的应用提供良好的思路。厌氧真菌与甲烷菌共培养可以把木质化纤维高效转化为甲烷,这是一股不可忽视的生物能源<sup>[20]</sup>。因此,本研究也为筛选优良的厌氧真菌和甲烷菌组合用于生物能源的工业生产提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] 朱伟云. 瘤胃微生物 // 冯仰廉. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] Davies DR, Trinc P, Brookman JL. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1996, 55: 926.
- [3] Joblin K, Campbell GP, Richardson A, Stewart C. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in co-culture with methanogens. *Letters in Applied Microbiology*, 1989, 9 (5): 195-197.
- [4] Gordon GL, Phillips MW. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutrition Research Reviews*, 1998, 11(1): 133.
- [5] Nagpal R, Puniya A, Singh K. In vitro fibrolytic activity of the anaerobic fungus, *Caecomyces* sp., immobilized in alginate beads. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2009, 18(4): 758-768.
- [6] Bauchop T, Mountfort DO. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 1981, 42( 6): 1103-1110.
- [ 7 ] Mountfort DO, Asher RA, Bauchop T. Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44( 1): 128-134.
- [ 8 ] Teunissen M, Kets E, den Camp HO, Vogels G. Effect of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on cellulolytic and xylanolytic enzyme activities. *Archives of Microbiology*, 1992, 157( 2): 176-182.
- [ 9 ] Nakashimada Y, Srinivasan K, Murakami M, Nishio N. Direct conversion of cellulose to methane by anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* and defined methanogens. *Biotechnology Letters*, 2000, 22( 3): 223-227.
- [10] Cheng YF, Edwards JE, Allison GG, Zhu W-Y, Theodorou MK. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresource Technology*, 2009, 100( 20): 4821-4828.
- [11] Davies DR, Theodorou MK, Lawrence MI, Trinci AP. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139( 6): 1395-1400.
- [12] 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. *Canadian Journal of Botany*, 2001, 79( 6): 666-673.
- [13] Hu W, Wang J, Lu J, Guo Y, Liu J. Rapid gas chromatogram determination of methane, organic acid in in vitro ruminal fermentation products. *Journal of Zhejiang University ( Agriculture & Life Science)* 2006, 32( 2): 217-221. ( in Chinese)  
胡伟莲, 王佳堃, 吕建敏, 郭嫣秋, 刘建新. 瘤胃体外发酵产物中的甲烷和有机酸含量的快速测定. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32( 2): 217-221.
- [14] Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64( 10): 3854-3859.
- [15] Wright A-DG, Pimm C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55( 2): 337-349.
- [16] Kittelmann S, Naylor GE, Koolaard JP, Janssen PH. A proposed taxonomy of anaerobic fungi ( class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS One*, 2012, 7( 5): e36866.
- [17] Griffith GW, Ozkose E, Theodorou MK, Davies DR. Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecology*, 2009, 2( 2): 87-97.
- [18] St-Pierre B, Wright A-DG. Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca ( *Vicugna pacos*). *BMC Microbiology*, 2012, 12( 1): 1.
- [19] King EE, Smith RP, St-Pierre B, Wright A-DG. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77( 16): 5682-5687.
- [20] Jin W, Cheng Y-F, Mao S-Y, Zhu W-Y. Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane. *Bioresource Technology*, 2011, 102( 17): 7925-7931.
- [21] Leahy SC, Kelly WJ, Altermann E, Ronimus RS, Yeoman CJ, Pacheco DM, Li D, Kong Z, McTavish S, Sang C. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS One*, 2010, 5( 1): e8926.
- [22] Griffith GW, Ozkose E, Theodorou MK, Davies DR. Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecology*, 2009, 2( 2): 87-97.
- [23] Rea S, Bowman JP, Popovski S, Pimm C, Wright A-DG. *Methanobrevibacter millerae* sp. nov. and *Methanobrevibacter olleyae* sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57( 3): 450-456.



# Isolation and identification of cellulolytic anaerobic fungi and their associated methanogens from Holstein Cow

Meizhou Sun, Wei Jin, Yuanfei Li, Shengyong Mao, Yanfen Cheng\*, Weiyun Zhu  
Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract** [Objective] We studied the microbial interaction between anaerobic fungi and methanogens in the rumen of Holstein Cow. [Methods] Co-cultures of anaerobic fungi with indigenously associated methanogen were isolated by Hungate roll-tube technique. The anaerobic fungi were identified by morphology and 4',6-diamidino-2-phenylindole nucleus staining and the methanogens were identified by 16S rRNA gene sequencing. [Results] A total of 28 co-cultures of anaerobic fungus with indigenously associated methanogen were obtained. The anaerobic fungi in the co-cultures were identified as monocentric genera *Piromyces*, *Neocallimastix* and *Caecomyces*. The indigenously associated methanogens were *Methanobrevibacter olleyae* like and *Methanobrevibacter thaueri* like strains. Four different phlotypes of fungus-methanogen co-cultures were obtained, which were *Piromyces/Methanobrevibacter olleyae* like strains, *Neocallimastix/Methanobrevibacter olleyae* like strains, *Neocallimastix/Methanobrevibacter thaueri* like strains and *Caecomyces/Methanobrevibacter olleyae* like strains. [Conclusion] Our study isolated and identified 28 co-cultures of anaerobic fungus and associated methanogens, which provided new materials for further study the mechanism of methane emission in the rumen.

**Keywords:** anaerobic fungi, methanogens, co-cultures

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31072052,31101735) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities(KYZ201312)

\* Corresponding author. Tel: +86-13770531153; E-mail: yanfencheng@njau.edu.cn

Received: 27 October 2013/Revised: 26 January 2014

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) ,在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。