

利用 16S rRNA 基因克隆文库技术分析 德昌水牛瘤胃产甲烷菌的多样性

杨承剑^{1,2}, 韦升菊^{1,2}, 梁辛^{1,2}, 梁贤威^{1,2*}, 邹彩霞^{1,2}

(1.中国农业科学院广西水牛研究所, 广西 南宁 530001; 2.农业部(广西)水牛遗传繁育重点实验室, 广西 南宁 530001)

摘要: 选取 3 头 5 岁左右的健康雌性德昌水牛作为试验动物, 采用机械破壁法提取瘤胃内容物总 DNA, 用产甲烷菌特异性引物 Met86F/Met1340R 扩增 16S rRNA 基因, 构建 16S rRNA 基因克隆文库, 分析德昌水牛瘤胃产甲烷菌区系组成。结果表明: 试验共获得 99 个 16S rRNA 基因序列, RDP 分析表明 94.2% 的序列为甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 16S rRNA 序列, 按照 97% 的相似性划分为 19 个分类操作单元, 其中 96 个序列 (17 个 OTUs) 占总序列的 97.0%, 与已知细菌的 16S rRNA 序列的相似性 >97%; 3 个序列 (2 个 OTUs) 占总序列的 3.0%, 与已知细菌 16S rRNA 序列的相似性为 90%~97%; 系统发育树分析表明, SGMT 簇序列和 RO 簇序列所占总序列的比例分别为 75.8%、1.0%, 部分序列与 *Methanobrevibacter* 中任何已知相似序列都相隔较远, 它们可能代表 *Methanobrevibacter* 中新种。以上结果表明, 德昌水牛瘤胃产甲烷菌以 *Methanobrevibacter* 产甲烷菌为优势菌群, 其中有许多未培养的产甲烷菌需进一步分离培养, 并对其功能进行分析。

关键词: 德昌水牛; 瘤胃; 产甲烷菌; 16S rRNA; 多样性

中图分类号: S823.8⁺3; S852.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)04-0382-07

16S rRNA library-based analysis of ruminal methanogens diversity in Dechang water buffalo

YANG Cheng-jian^{1,2}, WEI Sheng-ju^{1,2}, LIANG Xin^{1,2}, LIANG Xian-wei^{1,2*}, ZOU Cai-xia^{1,2}

(1. Guangxi Buffalo Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530001, China; 2. Key Laboratory of Buffalo Genetics, Breeding and Reproduction technology, Ministry of Agriculture, Nanning 530001, China)

Abstract: Three femal Dechang water buffaloes were used in this study. Total DNA were extracted by bead-beating method. Primers of Met86F/Met1340R were used to amplify the 16S rRNA of archaea for the construction of library. Results showed that 99 sequences were obtained. RDP analysis showed that 94.2% sequences are classified to genus *Methanobrevibacter*. Based the 97% similarity, these sequences were assigned to 19 OTUs. Ninety-six sequences showed $\geq 97\%$ sequence similarity to known species, three sequences had sequence similarity to known species in the range of 90% to 97%. Phylogenetic analysis indicated that 75.8% archaeal sequences in the rumen of Dechang water buffaloes belonged to SGMT clade, only 1.0% sequences belonged to RO clade. There are some sequences far from all known species on the phylogenetic tree. They may represented new species in *Methanobrevibacter* genu in the rumen of Dechang water buffaloes. It can be concluded that *Methanobrevibacter* genu is the dominant archaea in the rumen of Dechang water buffaloes. Further study should be done for the isolation of uncultured methanogens and their function analysis.

Key words: Dechang water buffalo; rumen; methanogen; 16S rRNA; diversity

收稿日期: 2014-06-24

基金项目: 广西自然科学基金青年基金项目(2012GXNSFBA053070); 广西水产畜牧兽医局科技计划项目(桂渔牧科1304516); 广西特聘专家岗位专项(2014GXTPZJ018); 农业部“948”项目(2011-G26)

作者简介: 杨承剑(1981—), 男, 湖南江华人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物消化道微生物的研究, ycj0746@sina.com; *通信作者, liangbri@126.com

德昌水牛是中国地方水牛优良品种之一,属于沼泽型水牛,其体格较大,体质结实,生长发育快,适应性广,役力强,主要分布于海拔为 480~2 520 m 的四川省凉山彝族自治州安宁河流域的德昌、西昌、冕宁、会理等县和渡口市的米易县^[1]。深入研究德昌水牛的消化生理以及营养特性有助于地方水牛品种的保护以及开发利用。

瘤胃是反刍动物独特的消化器官,其中栖息有数以亿计的微生物,包括细菌、产甲烷古菌、原虫和真菌等。这些微生物之间的互作对于饲料的消化利用具有重要作用,可以脂肪酸和微生物蛋白的形式为宿主提供能量。近年来,对于产甲烷古菌的研究已成为研究者们关注的重点。饲料被消化过程中所产生的中间代谢产物,如氢、甲酸、乙酸、甲醇等,可通过产甲烷菌还原二氧化碳进而生成甲烷^[2]。反刍动物的甲烷排放意味着能量的损失以及温室气体的增加^[3]。目前,已有研究^[4-5]表明,多种动物体内均可分离出产甲烷菌。部分研究也利用非培养方式,如 16S rRNA 基因克隆文库分析、real-time PCR 等方法研究瘤胃内产甲烷菌的多样性及数量^[6-8]。不同肥胖程度的人类或者不同品种的猪肠道中的产甲烷菌结构也存在差异^[9-10]。这些研究表明,胃肠道中产甲烷菌的结构组成可能与物种的特异性或与特定功能紧密相关^[11]。作为四川特色遗传资源品种之一,德昌水牛瘤胃微生物可能具有其独特的微生物区系,但目前关于德昌水牛瘤胃微生物的组成,尤其是产甲烷菌多样性方面的研究仍处于空白。笔者利用 16S rRNA 基因克隆文库技术分析德昌水牛瘤胃中产甲烷菌的结构组成及多样性,旨在为进一步探索德昌水牛瘤胃微生物生态系统功能以及品种资源保护提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 供试水牛及饲料

选用 3 头体况基本一致的 5 岁左右的健康成年雌性德昌水牛,饲养于广西壮族自治区水牛研究所水牛场(国家级重点种畜场)。供试水牛每天 08:00 和 16:00 定时饲喂,自由饮水,自由采食粗料。补充适量精料(每天每头 5.0 kg)。

粗料由玉米青贮料、木薯渣、啤酒渣、新鲜象草组成。精料配方:玉米 53.5%、豆粕 6.0%、麦麸 15.0%、棉粕 17.0%、磷酸氢钙 1.5%、贝壳粉 1.0%、食盐 2.0%、小苏打 3.0%、预混料 1.0%。精料营养水平:NE 6.83 MJ/Kg, CP 16.75%, Ca 0.80%, P 0.94%, CF 4.54%。预混料组成:V-E 3 000 IU/kg, V-D 150 kIU/kg, V-A 500 kIU/kg, Cu 1.3 g/kg, Fe 4.0 g/kg, Mn 3.0 g/kg, I 80 mg/kg, Zn 6.0 g/kg, Co 80 mg/kg, Se 50 mg/kg。

1.2 方 法

试验期 30 d,第 30 天晨饲前通过胃管式瘤胃液采样器采集瘤胃内容物 250 mL,装入干净充满二氧化碳厌氧瓶中,置于碎冰块中冷藏,迅速带回实验室,保存于-80 °C 冰箱,备用。

1.3 总 DNA 的提取

用宽口吸头从充分混匀的瘤胃内容物样品(约 250 mL)中吸取 1.5 mL(包括固液两相),12 000 g 离心 5 min,去除上清液,收集沉淀,依据文献^[12]所描述的机械破壁及试剂盒提取相结合的方法从沉淀样品中提取总 DNA。

1.4 PCR 扩增及 16S rRNA 克隆文库构建

利用产甲烷菌特异性引物 Met86F/Met1340R^[6]扩增 16S rRNA 基因序列。引物序列如下:Met86F, 5'-GCTCAGTAACACGTGG-3'; Met1340R, 5'-CGGTGTGTGCAAGGAG-3'。PCR 反应体系如下:10×Buffer 5 μL; dNTP(10 mmol/L) 1 μL; MgCl₂(25 mmol/L) 4 μL; TaqDNA 聚合酶(5 U/μL) 0.8 μL; 1 μL 总 DNA(1~10 ng/mL), Met86F 和 Met1340R 引物(10 μmol/L)各 1 μL; 加无菌双蒸水至 50 μL。反应条件如下:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 40 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。利用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(美国 Promega)纯化 PCR 产物。将来自 3 头牛的等体积 PCR 产物混合后,按照厂家说明书连接到载体 pMD19-T(日本 Takara)上进行克隆,经蓝白斑筛选,随机挑取白色克隆,用 pMD19-T 通用引物 M13-47(5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3')和 RV-M(5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3')对

阳性克隆进行验证,将PCR检测为阳性的克隆送上海生工生物技术有限公司测序。

1.5 16S rRNA 基因序列分析

对测序获得的序列用Decipher软件去除嵌合体序列^[13]。使用Ribosomal Database Project (RDP) Release 11中的Classifier程序对所有序列进行分类^[14]。用Mothur软件划分分类操作单元(OTU),将相似性大于97%的序列视为同一个OTU^[15]。选取每个OTU代表序列,利用Blast程序在Genbank中搜索相似性最高序列。用Clustal X Version 1.83软件进行多重比对,通过MEGA 4.0(Molecular evolutionary genetics analysis, MEGA)软件计算出序列的系统进化距离,采用Neighbor-Joining方法构建系统发育进化树,1000次随机抽样,计算自举值(Bootstrap)以评估系统发育树的置信度。本研究所获得的序列在DDBJ数据库里的登录号为AB905615~AB905718。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因克隆文库分析

从建立的德昌水牛瘤胃产甲烷菌16S rRNA基因克隆文库中,随机挑选107个阳性克隆进行测序。对测得的序列进行处理,剔除嵌合序列后获得99个序列,RDP分析结果表明,99个序列均属于古细菌域(Archaea)序列,其中93个序列(占总序列数的94.2%)归属*Methanobrevibacter*的16S rRNA序列、5个(占总序列数的4.8%)归属*Methanosphaera*(甲烷球菌属)的16S rRNA序列、还有1个(占总序列数的1.0%)归属unclassified_ *Methanobacteriaceae*(未分类甲烷杆菌)的16S rRNA序列。以97%序列相似性为阈值,用Mothur软件对序列进行分析,99条序列可分为19个OTUs(表1)。

表1 德昌水牛瘤胃产甲烷古菌16S rRNA基因序列分析

Table 1 Sequence analysis of archaeal 16S rRNA gene from the rumen of Dechang buffaloes

OTUs序号	代表序列	序列数	相似序列GenBank登录号	相似序列所属细菌	相似性/%
1	32	39	U55239	<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	98
2	30	10	U55239	<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	98
3	D6	8	U55239	<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	98
4	D62	8	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	99
5	7	8	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	98
6	35	5	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	98
7	19	3	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	99
8	6	3	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	99
9	D4	1	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	97
10	D59	1	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	98
11	D64	1	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	97
12	D24	1	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	97
13	D16	1	NR_042785	<i>Methanobrevibacter millerae</i> strain ZA-10	97
14	D51	4	NR_115171	<i>Methanosphaera stadmanae</i> strain MCB-3	97
15	D66	2	NR_115171	<i>Methanosphaera stadmanae</i> strain MCB-3	95
16	D49	1	NR_042784	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> strain M1	99
17	D11	1	NR_043024	<i>Methanobrevibacter olleyae</i> strain KM1H5-1P	96
18	3	1	NR_118565	<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i> strain JH1	97
19	D17	1	NR_115169	<i>Methanobrevibacter smithii</i> strain PS	98

将99条序列与Genbank中收录的序列进行Blast分析,结果表明,99个序列中,有96个序列(17个OTUs)占总序列的97.0%,与已知细菌16S rRNA序列相似性97%;其中,3个OTUs(占总序列的57.6%)与*Methanobrevibacter gottschalkii*的16S rRNA相似;10个OTUs(占总序列的32.3%)与*Methanobrevibacter millerae*的16S rRNA相似;2个OTUs(占总序列的4.0%)与*Methanosphaera*

*stadmanae*的16S rRNA相似;1个OTUs(占总序列的1.0%)与*Methanobrevibacter ruminantium*的16S rRNA相似;1个OTUs(占总序列的1.0%)与*Methanobrevibacter boviskoreani*的16S rRNA相似;1个OTUs(占总序列的1.0%)与*Methanobrevibacter smithii*的16S rRNA相似。另外3个序列(2个OTUs)与已培养菌的16S rRNA序列的相似性为90%~97%,其中1个OTUs(占总序列的2.0%)与

Methanosphaera stadtmanae 的 16S rRNA 相似; 1 个 OTUs(约占总序列的 1.0%)与 *Methanobrevibacter olleyae* 的 16S rRNA 相似。

2.2 16S rRNA 基因系统进化分析

以 *Thermosphaera aggregans*(X99556)和 *Pyrolobus fumartus* (X99555)作为外群(Outgroup), 将 19 个 OTUs 代表序列与其他最相似已知序列构建系统发育树。结果(图 1)表明 ,D51、D66 与 *Methanosphaera*

stadtmanae 聚集为一簇 ,属于 *Methanosphaera* ;D11、D64、D24、D4、19、D62、32、D6、6、30 与 *Methanobrevibacter smithii*、*Methanobrevibacter gottschalkii*、*Methanobrevibacter millerae* 聚集为一簇(SGMT 簇),属于 *Methanobrevibacter* ;D49 与 *Methanobrevibacter ruminantium*、*Methanobrevibacter olleyae* 聚集为一簇(RO 簇),但与 *Methanobrevibacter* 中其他序列相隔较远; SGMT 簇序列和

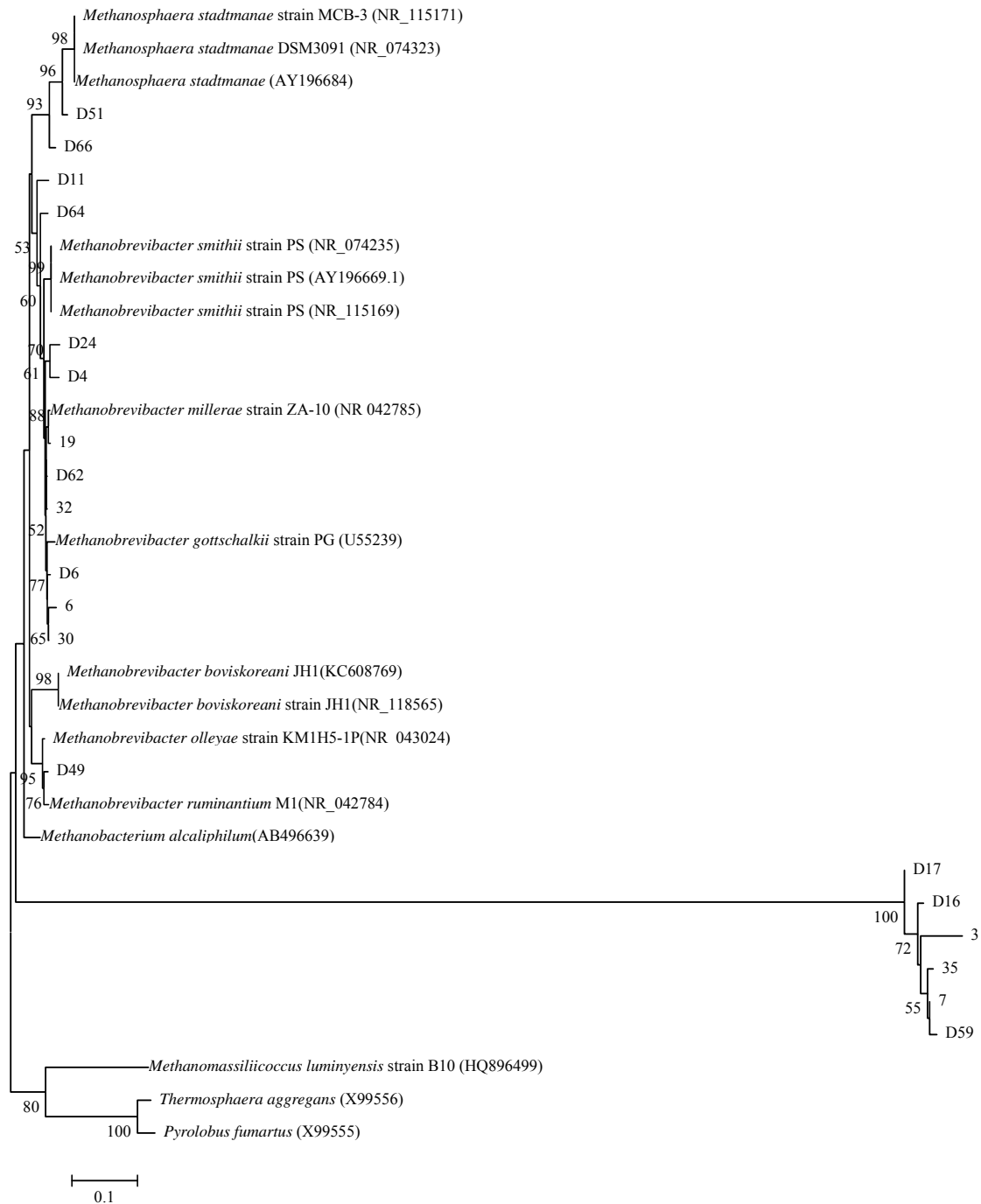


图 1 德昌水牛瘤胃产甲烷古菌 16S rRNA 基因序列系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of methanogens 16S rRNA gene sequences from the rumen of Dechang water buffaloes

RO 簇序列所占总序列的比例分别为 75.8%、1.0% ; D17、D16、3、35、7、D59 单独聚集为一簇,与任何已知相近序列都相隔较远,它们可能代表 *Methanobrevibacter* 中新的种。

3 讨论

在瘤胃厌氧条件下,多种厌氧微生物通过共同作用完成有机物的降解。被动物消化的饲料成分,包括植物性结构碳水化合物、蛋白质和其他有机聚合物,通过初次厌氧发酵后都被降解成简单的物质。这些简单的化合物通过具有水解复杂化合物功能的微生物(初次发酵微生物)和其他不具有水解复杂化合物功能的微生物(次级发酵微生物)的共同作用,被进一步转变成脂肪酸、二氧化碳和氢气等。在瘤胃内利用二氧化碳作为碳源,氢作为主要的电子供体的氢利用途径是主要的产甲烷途径^[16]。甲烷的生成可避免氢分压升高,以免抑制电子传递反应中的微生物酶的正常功能,尤其是 NADH 脱氢酶,它若被抑制可导致 NADH 的积累,最终降低瘤胃发酵效率。深入了解水牛瘤胃产甲烷菌的结构组成及其多样性,有助于调控水牛瘤胃甲烷生成,减少甲烷排放量。产甲烷菌属于古菌,基于已有的数据分析,许多被检测到的瘤胃古菌都属于产甲烷微生物,其中主要是 *Methanobrevibacter*, 占瘤胃古菌近 2/3(61.6%)。剩余的 1/3 的古细菌的系统发育型大致均等,属于 *Methanomicrobium* 的占 14.9%,被标记为不可培养的瘤胃 C 簇或 RCC 的占 15.8%^[17]。目前,已有许多关于反刍动物,如绵羊^[18-19]、黄牛^[7,20]以及水牛^[21-23]的瘤胃微生物菌群结构组成的报道,其中水牛以印度水牛为主。关于中国地方品种水牛瘤胃微生物菌群结构组成,尤其是在产甲烷菌多样性方面的研究仍十分薄弱。据笔者所知,本研究是国内外第一个报道中国地方品种德昌水牛瘤胃产甲烷菌多样性的。

瘤胃微生物菌群结构组成受地理位置、周边环境、饲料营养水平以及饲喂频率、添加剂、动物种类以及动物遗传背景等的影响。一般认为,瘤胃中主要的甲烷菌为瘤胃甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter ruminantium*)和巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkerii*)。本研究通过 16S rRNA 基因克隆文库分析,表明德昌水牛瘤胃内产甲烷菌以 *Methanobrevi-*

bacter 为主,这与国内外(委内瑞拉、澳大利亚、中国)许多在其他反刍动物(绵羊、袋鼠、牦牛)上的研究结果相一致^[14,18,24-26]。但是,Chaudhary 等^[21]的研究表明,印度摩拉水牛瘤胃产甲烷菌以 *Methanomicrobium* 为主;Singh 等^[27]的研究表明,苏替水牛(*Surti*)瘤胃内产甲烷菌以 *Methanobacteriales* 为主;Hook 等^[28]的研究表明,在澳大利亚绵羊瘤胃内则以未知古菌为主;Shin 等^[29]以及 Tajima 等^[30]的研究发现,奶牛瘤胃古菌以 *Methanomicrobium* 为主(分别为 85.6%和 60.9%),但 *Methanobrevibacter* 数量很少。也有研究^[31]表明,奶牛体内存在大量的 *Methanosphaera*(26.8%)和 *Methanimicrococcus*(14.6%),但是 *Methanobrevibacter* 占优势(58.5%)。说明不同动物种类之间的瘤胃产甲烷菌结构组成也存在差异。这些异同与研究方法、动物种类、日粮、动物管理等之间的相互关系还需要进一步研究。

反刍动物瘤胃内仍存在许多未知的还未培养出来的产甲烷菌^[32]。本研究的系统进化树分析结果也表明,德昌水牛瘤胃内存在许多未知的 *Methanobrevibacter* 产甲烷菌。Paul 等^[33]的研究表明, *Methanobrevibacter* 能够利用二氧化碳和氢或者甲酸生成甲烷;Rea 等^[34]从黄牛瘤胃中分离到的 *Methanobrevibacter millerae* 能够利用甲酸生长;Samuel 等^[35]发现 *Methanobrevibacter smithii* PS 可利用二氧化碳和氢或者甲酸生成甲烷;Denman 等^[7]的研究表明,反刍动物体内的 *Methanobrevibacter smithii* 能够影响日粮中的多糖成分的利用效率。以上研究表明, *Methanobrevibacter* 产甲烷菌对于反刍动物瘤胃甲烷生成以及其他生理功能具有重要作用。关于 *Methanobrevibacter* 产甲烷菌在德昌水牛瘤胃生理功能的作用还有待进一步研究。

St-pierre 等^[36]提议将 *Methanobrevibacter* 中的产甲烷菌序列分为两大类:与 *Methanobrevibacter smithii*(S)、*Methanobrevibacter gottschalkii*(G)、*Methanobrevibacter millerae*(M)和 *Methanobrevibacter thaurei*(T)聚集在一块的统称为 SGMT 簇;与 *M. ruminantium*(R)及 *Methanobrevibacter olleyae*(O)聚集在一起的称为 RO 簇。不同种类动物或不同条件下的动物胃肠道的 SGMT 和 RO 簇序列分布规律可能存在一定差异。在同等日粮条件下,荷斯坦奶牛瘤胃中的 SGMT 簇序列的比例要高于娟姗奶牛^[20]。

在本研究中 SGMT 簇序列和 RO 簇序列所占总序列的比例分别为 75.8%、1.0%，即在德昌水牛瘤胃中 SGMT 簇序列占大多数。不同动物种类及饲养条件造成的 SGMT 簇和 RO 簇序列分布的差异，是否可以用于估测瘤胃甲烷生成，进而用于调节瘤胃甲烷生成，还有待深入研究。

参考文献：

- [1] 《四川家畜家禽品种志》编辑委员会. 四川家畜家禽品种志[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1987: 36–38.
- [2] Samuel B S, Gordon J I. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(26): 10011–10016.
- [3] Johnson K A, Johnson D E. Methane emissions from cattle[J]. Journal of Animal Science, 1995, 73(8): 2483–2492.
- [4] Jarvis G N, Strompl C, Burgess D M, et al. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle[J]. Curr Microbiol, 2000, 40(5): 327–332.
- [5] Miller T L W M, Kusel E. Isolation and characterization of methanogens from animal feces[J]. Syst Appl Microbiol, 1986, 8(3): 234–238.
- [6] Wright A D G, Williams A J, Winder B, et al. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western Australia[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(3): 1263–1270.
- [7] Denman S E, Tomkins N W, Mcsweeney C S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 62(3): 313–322.
- [8] Pei C X, Mao S Y, Cheng Y F, et al. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle[J]. Animal, 2010, 4(1): 20–29.
- [9] DiBaise J K, Zhang H, Crowell, M D, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity[J]. MAYO Clinic Proceedings, 2008, 83(4): 460–469.
- [10] Luo Y H, Su Y, Wright A D, et al. Lean breed Landrace pigs harbor fecal methanogens at higher diversity and density than obese breed Erhualian pigs[J]. Archaea, 2012: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/605289>.
- [11] Shi P J, Meng K, Zhou Z G, et al. The host species affects the microbial community in the goat rumen[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(1): 132–135.
- [12] Denman S E, Mcsweeney C S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 58(3): 572–582.
- [13] Wright E S, Yilmaz L S, Noguera D R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(3): 717–725.
- [14] Cole J R, Wang Q, Cardenas E, et al. The ribosomal database project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(Sup.1): D141–145.
- [15] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [16] Hungate R E. Hydrogen as an intermediate in rumen fermentation[J]. Archives of Microbiology, 1967, 59(1/3): 158–164.
- [17] Janssen P H, Kris M. Structure of the archaeal community of the rumen[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(12): 3619–3625.
- [18] Wright A D, Ma X, Obispo N E. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela[J]. Microb Ecol, 2008, 56(2): 390–394.
- [19] Wright A D, Toovey A F, Pimm C L. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea[J]. Anaerobe, 2006, 12(3): 134–139.
- [20] King E E, Smith R P, St-pierre B, et al. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(16): 5682–5687.
- [21] Chaudhary P P, Sirohi S K. Dominance of *Methanobrevibacter* phylotype in methanogen population present in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*)[J]. Lett Appl Microbiol, 2009, 49(2): 274–277.
- [22] Tan H Y, Sieo C C, Lee C M, et al. Diversity of bovine rumen methanogens in vitro in the presence of condensed tannins, as determined by sequence analysis of 16S rRNA gene library[J]. J Microbiol, 2011, 49(3): 492–498.
- [23] Tatsuoka N, Mohammed N, Mitsumori M, et al. Phylogenetic analysis of methyl coenzyme-M reductase detected from the bovine rumen[J]. Lett Appl Microbiol, 2004, 39(3): 257–260.
- [24] Hook S E, Wright A D, McBride B W. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies[J]. Archaea, 2010: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/945785>.
- [25] Evans P N, Hinds L A, Sly L I, et al. Community composition and density of methanogens in the foregut of the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*)[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(8): 2598–2602.

- [26] An D , Dong X , Dong Z . Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses[J]. *Anaerobe* , 2005 , 11(4) : 207–215 .
- [27] Singh K M , Pandya P R , Parnerkar S , et al . Methanogenic diversity studies within the rumen of Surti buffaloes based on methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes point to methanobacteriales[J] . *Polish Journal of Microbiology* , 2010 , 59(3) : 175–178 .
- [28] Hook S E , Northwood K S , Wright A D G , et al . Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow[J]. *Appl Environ Microbiol* , 2009 , 374–380 .
- [29] Shin E C , Choi B R , Lim W J , et al . Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence[J] . *Anaerobe* , 2004 , 10(6) : 313–319 .
- [30] Tajima K , Nagamine T , Matsui H , et al . Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens[J] . *FEMS Microbiol Lett* , 2001 , 200(1) : 67–72 .
- [31] Whitford M F , Teather R M , Forster R J . Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen[J] . *BMC Microbiol* , 2001 : <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/5> .
- [32] Tymensen L D , Mcallister T A . Community structure analysis of methanogens associated with rumen protozoa reveals bias in universal archaeal primers[J] . *Appl Environ Microbiol* , 2012 , 78(11) : 4051–4056 .
- [33] Paul K , Nonoh J O , Mikulskil L , et al . “Methanoplasmatales,” thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments , are the seventh order of methanogens[J] . *Appl Environ Microbiol* , 2012 , 78(23) : 8245–8253 .
- [34] Rea S , Bowman J P , Popovski S , et al . *Methanobrevibacter millerae* sp . nov . and *Methanobrevibacter olleyae* sp . nov . , methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth[J] . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2007 , 57(Pt 3) : 450–456 .
- [35] Samuel B S , Hansen E E , Manchester J K , et al . Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut[J] . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2007 , 104(25) : 10643–10648 .
- [36] St-pierre B , Wright A D . Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca (*Vicugna pacos*)[J] . *BMC Microbiol* , 2012 , 12(1) : doi : 10.1186/1471-2180-12-1 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维