

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	V
缩略词	XI
前 言	XIII
第一部分 文献综述	1
1. 厌氧真菌	1
1.1 厌氧真菌的分类学特性	1
1.2 厌氧真菌的多样性分布	2
1.3 厌氧真菌的纤维降解特性	3
1.4 厌氧真菌的酶学特性	6
2. 厌氧真菌的应用价值	7
2.1 厌氧真菌在反刍动物营养的应用	7
2.2 厌氧真菌在饲料行业的应用	9
3. 本论文研究的目的与意义	14
第二部分 试验研究	17
第一章 基于 ITS1 序列分析厌氧真菌多样性及影响因素	17
1. 材料与方法	17
1.1 原始数据收集与整理	18
1.2 数据清理、质控、OTU 聚类与系统发育树构建	18
1.3 物种注释和厌氧真菌多样性分析	18
1.4 数据分析	19
2. 结果	19
2.1 原始数据收集与数据清理	19
2.3 厌氧真菌多样性与生态分布特征	22
2.4 不同地区对厌氧真菌多样性的影响	25
2.5 不同动物物种对厌氧真菌多样性的影响	26

2.6 不同采样来源对厌氧真菌多样性的影响	29
2.7 不同饲喂模式对厌氧真菌多样性的影响	31
2.8 不同日粮对厌氧真菌多样性的影响	32
2.9 不同季节对厌氧真菌多样性的影响	33
3. 讨论	35
4. 小结	36
第二章 <i>Oontomyces</i> 厌氧真菌的分离纯化与鉴定	37
1. 材料与方法	37
1.1 培养基配置	37
1.2 接种物来源和分离过程	38
1.3 厌氧真菌鉴定	38
1.4 共存产甲烷菌鉴定	39
1.5 数据分析	39
2. 结果	39
2.1 厌氧真菌形态学鉴定结果	40
2.2 厌氧真菌的分子学鉴定以及系统发育树构建	40
2.3 产气成分检测	41
2.4 产甲烷菌的分子学鉴定以及系统发育树构建	41
3. 讨论	43
4. 小结	44
第三章 厌氧真菌 <i>Oontomyces</i> 纤维降解特性与应用潜力评估	45
1. 材料与方法	45
1.1 菌种来源	45
1.2 培养基配置	46
1.3 高效干物质降解厌氧真菌的筛选	46
1.4 底物的准备及其营养成分	46
1.5 试验设计	47
1.6 指标的测定方法	47
1.6.1 氢气和甲烷的测定	47
1.6.2 培养物发酵液的 pH 值及主要代谢产物浓度的测定	47
1.6.3 DMD, NDF, ADF, 纤维素, 半纤维素及木质素的测定	48

1.6.4 羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活的测定	48
1.7 数据分析	49
2. 结果	49
2.1 骆驼源厌氧真菌菌株纤维降解能力的比较研究	49
2.2 厌氧真菌纯培养对不同底物降解作用的研究	49
2.3 厌氧真菌与产甲烷菌共培养对不同底物降解作用的研究	55
3. 讨论	59
4. 小结	60
全文结论	63
存在问题及工作展望	65
参考文献	67
致 谢	79
攻读学位期间取得的学术成果	79

厌氧真菌多样性分析及骆驼 *Oontomyces* 分离鉴定与纤维降解特性评估

摘要

厌氧真菌是一种只存在于草食动物消化道内的微生物，具有很强的纤维降解能力。在瘤胃粗纤维降解过程中，厌氧真菌的假根首先穿透并破碎植物纤维，帮助其它微生物和植物纤维充分接触，实现草食动物对植物纤维的高效利用。因此，厌氧真菌在草食动物营养素消化，特别是其粗纤维消化降解中起着至关重要的作用。虽然已有一些研究报道了草食动物厌氧真菌群落的结构及其与环境（包括气候、饲料、种群等）的关系，也有一些研究对草食动物厌氧真菌进行了分离培养和相关特性研究，但目前为止，由于培养条件苛刻、基因组 DNA 中 AT 含量太高等原因导致厌氧真菌的研究较为困难，相关报道还非常欠缺。本研究首先下载 NCBI 数据库中厌氧真菌 ITS1 序列，通过分析不同环境、不同肠段、不同地区等条件下厌氧真菌 ITS1 序列多态性，系统研究影响厌氧真菌多样性的因素，探讨其生态意义，为深入了解厌氧真菌在草食动物瘤胃中的重要性和资源开发奠定基础。在此基础上，本研究采集了生活于干旱环境的准噶尔双峰驼瘤胃内容物与粪便，进行厌氧真菌富集培养与菌株的分离培养与鉴定，随后评估了这些厌氧真菌菌株的应用潜力。本研究为深入了解厌氧真菌的生态功能，特别是其在瘤胃粗纤维降解中的作用奠定了基础，同时为厌氧真菌在秸秆等非粮饲料高效利用中木质纤维素的降解方面提供可行途径和基础数据。

1. 基于 ITS1 序列分析厌氧真菌多样性及影响因素

本试验旨在通过收集厌氧真菌 ITS1 序列，分析厌氧真菌多样性及其影响因素。研究收集了 2020 年 12 月 31 日前 NCBI 数据库中 291,687,492 条厌氧真菌 ITS1 序列，经过质控、拼接后共获得了 88,173,845 条可用于后续分析的序列，大小约 19 G，随后以 Anaerobic Fungi Network (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>) 中 ITS1 数据库为参考，利用 QIIME2 平台进行 97% 的有参聚类、多样性分析和物种注释，分析厌氧真菌的多样性及其影响因素。结果显示，厌氧真菌 ITS1 序列聚类到 20 个属，97 个种，其中包括 13 个已经分离鉴定的属和 7 个未分离鉴定的属。通过与已经分离

鉴定的厌氧真菌进行对比，近4年分离鉴定的7个厌氧真菌未被聚类。不同地域、不同物种、不同肠段、不同日粮、不同饲养方式等因素对厌氧真菌多样性与菌群结构有显著影响。在地域方面，北美洲厌氧真菌 α 多样性最高 ($P < 0.05$)，群落结构更为复杂，其中 *Aestipascuomyces*, *Cyllamyces*, RH1, SK3 的相对丰度显著高于其他地区 ($P < 0.05$, LDA > 2.0)；南美洲厌氧真菌群落结构则较为单一且均匀度较好，其中 *Piromyces*, *Pecoramyces*, *Caecomyces*, *Feramyces*, RH2 的相对丰度显著高于其他地区 ($P < 0.001$, LDA > 2.0)；欧洲 *Neocallimastix* 相对丰度最高 ($P < 0.05$, LDA > 2.0)；亚洲 *Orpinomyces*, *Anaeromyces* 和 AL8 相对丰度最高 ($P < 0.001$, LDA > 2.0)。厌氧真菌 α 多样性在不同物种间差异显著 ($P < 0.05$)，其菌群结构组成也差异显著 ($P < 0.05$, LDA > 2.0)，荷斯坦奶牛 *Neocallistix* 相对丰度最高，其次为 *Piromyces*, *Agriosomyces*；安格斯牛 *Pecoramyces* 相对丰度最高，其次为 *Caecomyces*；牦牛 *Orpinomyces* 相对丰度最高，其次为 *Anaeromyces*, AL8, RH3。不同肠段分析结果表明，粪便中厌氧真菌 α 多样性最低，其中 *Khyollomyces* 相对丰度最高，其次为 *Joblinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces*, AL3, AL8, RH3；瘤胃内容物中 *Cyllamyces* 相对丰度最高，其次为 RH1, RH2；瘤胃液中 *Neocallistix* 相对丰度最高，其次为 *Agriosomyces*。不同日粮对厌氧真菌多样性的影响分析发现，食用饲草的草食动物体内厌氧真菌 α 多样性最高 ($P < 0.05$)。野生动物体内厌氧真菌 α 多样性更低 ($P < 0.05$)，组成更简单；驯养动物体 *Neocallistix*, *Feramyces*, *Orpinomyces*, RH5 相对丰度较高，而野生动物体内 *Piromyces*, *Khyollomyces*, *Joblinomyces*, AL3, AL7 相对丰度较高。夏季和冬季厌氧真菌菌群结构存在显著性差异 ($P < 0.05$, LDA > 2.0)，夏季时 *Pecoramyces*, *Caecomyces*, RH1, RH3, SK3 相对丰度较高，冬季时 *Cyllamyces*, *Aestipascuomyces* 的相对丰度较高。以上结果显示，厌氧真菌多样性受到多种因素的影响，具体为北美洲高于其他大洲，瘤胃高于粪便，食用饲草动物高于食用饲料动物，驯养动物高于野生动物，同时不同物种体内厌氧真菌组成差异显著。

2. 厌氧真菌 *Oontomyces* 的分离纯化与鉴定

上述研究中未聚类到的已分离鉴定厌氧真菌 *Oontomyces* 自2015年首次从印度骆驼样品中分离后，一直未在其他动物中发现，且模式菌株 *Oontomyces* sp. SSD-C1B1 已经死亡，目前该厌氧真菌没有存活的菌株。骆驼以其高效的纤维降解能力著称，开展 *Oontomyces* 的分离鉴定工作，不仅有利于厌氧真菌资源的收集与保护，更有助于开发高效纤维降解厌氧真菌。本试验以准噶尔双峰驼粪便和瘤胃内容物为分离来

源, 通过 Hungate 厌氧滚管技术分离纯化厌氧真菌菌株, 并对其进行形态观察和 ITS 测序鉴定。本试验从骆驼瘤胃中分离获得 22 个厌氧真菌菌株, 从骆驼粪便中获得 11 个厌氧真菌菌株。形态学观察发现, 瘤胃源厌氧真菌菌株单中心, 单鞭毛, 具有丝状假根; 粪便源厌氧真菌菌株单中心, 单鞭毛, 具有丝状假根。ITS 测序鉴定结果显示, 瘤胃源厌氧真菌菌株均为 *Oontomyces* sp., 粪便源厌氧真菌菌株均为 *Piromyces* sp., 进化树结果显示, 瘤胃源厌氧真菌 *Oontomyces* sp. CR1-CR22 与 *Oontomyces anksri* strain SSD-CIB1 属于同一分支, 粪便源厌氧真菌 *Piromyces* sp. CF1-CF11 与 *Piromyces* sp. Jen1 属于同一分支。甲烷测定结果显示, 分别有 1 株瘤胃源厌氧真菌菌株和 1 株粪便源厌氧真菌菌株有共存产甲烷菌。产甲烷菌 16S rRNA 基因测序结果显示, 2 株厌氧真菌菌株中存在的产甲烷菌均为 *Methanobrevibacter* sp., 进化树结果显示, 瘤胃源产甲烷菌 *Methanobrevibacter* sp. LGM- CR1 以及粪便源产甲烷菌 *Methanobrevibacter* sp. LGM- CF1 和 *Methanobrevibacter ruminantium* strain CY4 相似度为属于同一分支。以上结果表明, 本研究从准噶尔双峰驼瘤胃中成功分离获得 *Oontomyces* sp. 菌株, 且其中 1 株有产甲烷菌 *Methanobrevibacter* sp. 共存, 准噶尔双峰驼粪便中厌氧真菌菌株与瘤胃中显著不同。

3. 厌氧真菌 *Oontomyces* 的纤维降解特性与应用潜力评估

本试验旨在探究上述分离培养的骆驼源厌氧真菌纤维降解特性并评估其应用潜力。试验首先以稻秸为底物进行筛选, 从上一章分离鉴定的厌氧真菌纯培养中各筛选出来 1 株纤维降解能力最高的厌氧真菌, 分别是来自瘤胃的 *Oontomyces* sp. CR2 和来自粪便的 *Piromyces* sp. CF9。在此基础上, 以实验室前期保存的高纤维降解能力的厌氧真菌菌株 *Pecoramyces* sp. F1 为参照, 研究两株厌氧真菌对不同营养成分木质纤维素底物芦苇、构树叶、苜蓿杆、草木樨的降解特性, 结果显示, *Oontomyces* sp. CR2 在降解不同营养成分木质纤维素底物时, 拥有最高的底物降解率, 产气量和产氢气量, 以及最高的乙酸, 甲酸, 乳酸, 乙醇产量 ($P < 0.05$)。对厌氧真菌与产甲烷菌共培养的纤维降解特性研究表明, *Pecoramyces* sp. F1 和产甲烷菌 *Methanobrevibacter thaueri* 共培养在降解不同营养成分木质纤维素底物时, 拥有最高的底物降解率, 产气量和产甲烷量, 以及最高的乙酸, 乳酸产量 ($P < 0.05$); 与厌氧真菌纯培养相比, 厌氧真菌和产甲烷菌共培养的底物降解率更高, 但甲酸产量更少。以上结果表明, 骆驼瘤胃来源的厌氧真菌纯菌株 *Oontomyces* sp. CR2 氢体代谢更旺盛, 而共存产甲烷菌的厌氧真菌中, *Pecoramyces* sp. F1 降解能力更强。

综上，不同地域、不同物种、不同肠段、不同日粮、不同饲养方式等因素对厌氧真菌多样性及其菌群结构组成影响显著；本研究成功从准噶尔双峰驼瘤胃中分离到 *Oontomyces* sp. 菌株，其纯菌株纤维降解能力和氢体代谢能力高于实验室现有保存的菌株 *Pecoramyces* sp. F1，而其与产甲烷菌共培养的纤维降解能力则不如实验室现有共培养。本研究结果为厌氧真菌在秸秆等非粮饲料高效利用中木质纤维素的降解提供可行途径和基础数据。

关键词：厌氧真菌；ITS1；准噶尔双峰驼；木质纤维素降解；产甲烷菌

DIVERSITY ANALYSIS OF ANAEROBIC FUNGI AND ISOLATION, IDENTIFICATION AND THE FIBER DEGRADING ABILITY OF *Oontomyces* FROM CAMEAL

ABSTRACT

Anaerobic fungi are microorganisms that exist only in the digestive tract of herbivores and have strong fiber-degrading abilities. In the process of rumen crude fiber degradation, the rhizoid of anaerobic fungi first penetrates and break plant fibers, helping other microorganisms to fully contact with plant fibers, and realizing the efficient utilization of plant fibers by herbivores. Therefore, anaerobic fungi play a crucial role in herbivore nutrient digestion, especially their crude fiber digestion and degradation. Although some studies have reported the structure of herbivorous anaerobic fungi community and its relationship with the environment (including climate, feed, population, etc.) So far, the research on anaerobic fungi is difficult due to harsh culture conditions and high AT content in genomic DNA, and related reports are still very lacking. In this study, we first downloaded the ITS1 sequences of anaerobic fungi from the NCBI database. By analyzing the polymorphisms of ITS1 sequences of anaerobic fungi in different environments, different intestinal segments, and different regions, we systematically studied the factors affecting the diversity of anaerobic fungi, and explored their ecology significance, laying on the foundation for an in-depth understanding of the importance and resource development of anaerobic fungi in the rumen of herbivores. On this basis, this study collected the rumen contents and feces of Bactrian camels living in arid environment. The enrichment, the isolation and identification of anaerobic fungi were carried out, and then the application potential of these anaerobic fungal strains was evaluated. This study lays a foundation for in-depth understanding of the ecological functions of anaerobic fungi, especially their role in rumen crude fiber degradation, and provides a feasible way and basic data for anaerobic fungi to degrade lignocellulose in the efficient utilization of non-grain feeds such as straw.

1. Diversity and distribution analysis of anaerobic fungi by ITS1 sequences

The purpose of this experiment was to analyze the diversity and ecological distribution of anaerobic fungi by collecting ITS1 sequences of anaerobic fungi. The study collected 291,687,492 anaerobic fungal ITS1 sequences in the NCBI database before December 31, 2020. After quality control and splicing, a total of 88,173,845 sequences with a size of about 19 G were obtained for subsequent analysis. Species annotation analysis was performed using the ITS1 database in the Anaerobic Fungi Network (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>), using the QIIME2 platform to conduct 97% of the parametric clustering, diversity analysis and species annotation to analyze the diversity of anaerobic fungi and their influencing factors. The results showed that the anaerobic fungi ITS1 sequences were assigned to 20 genera and 97 species, including 13 isolated genera and 7 un-isolated genera. By comparing with the anaerobic fungi that have been isolated and identified, the 7 anaerobic fungi isolated and identified in the past 4 years have not been clustered. Different regions, different species, different intestinal breaks, different diets, different feeding methods and other factors have significant effects on the diversity and bacterial community structure of anaerobic fungi. In terms of geography, North America had the highest alpha diversity ($P < 0.05$), and the community structure was more complex, in which the relative abundances of *Aestipascuomyces*, *Cyllamyces*, RH1, SK3 were significantly higher than those in other regions ($P < 0.05$, LDA > 2.0); the anaerobic fungal community structure in South America was relatively single and uniform, and the relative abundances of *Piromyces*, *Pecoramyces*, *Caecomyces*, *Feramyces*, and RH2 were significantly higher than those in other regions ($P < 0.001$, LDA > 2.0); European *Neocallimastix* had the highest relative abundance ($P < 0.05$, LDA > 2.0); Asian *Orpinomyces*, *Anaeromyces* and AL8 had the highest relative abundance ($P < 0.001$, LDA > 2.0). The alpha diversity of anaerobic fungi was significantly different among different species ($P < 0.05$), and the anaerobic fungi community structure composition was also significantly different ($P < 0.05$, LDA > 2.0). The relative abundance of *Neocallimastix* in Holstein cows was the highest, followed by *Piromyces* and *Agriosomyces*; the relative abundance of *Pecoramyces* in Angus cattle was the highest, followed by *Caecomyces*; the relative abundance of *Orpinomyces* in yak was the highest, followed by *Anaeromyces*, AL8, RH3. The analysis results of different intestinal segments showed that the alpha diversity of anaerobic fungi in feces was the lowest, among which *Khyollomyces*

had the highest relative abundance, followed by *Joblinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces*, AL3, AL8, RH3; *Cyllamyces* had the highest relative abundance in rumen contents, followed by RH1, RH2; *Neocalliastrix* had the highest relative abundance in rumen fluid, followed by *Agriosomyces*. The analysis of the effect of different diets on the diversity of anaerobic fungi found that the alpha diversity of anaerobic fungi was the highest in herbivores diet ($P < 0.05$). The alpha diversity of anaerobic fungi in wild animals was lower ($P < 0.05$), and the composition was simpler; the relative abundance of *Neocalliastrix*, *Feramyces*, *Orpinomyces*, RH5 in domestic animals was higher, while relative abundance of *Piromyces*, *Khyollomyces*, *Joblinomyces*, AL3, AL7 in wild animals is high. There were significant differences in the structure of anaerobic fungal flora between summer and winter ($P < 0.05$, LDA > 2.0), the relative abundances of *Pecoramyces*, *Caecomyces*, RH1, RH3, SK3 were higher in summer, and the relative abundances of *Cyllamyces* and *Aestipasuomyces* were higher in winter. The above results show that the diversity of anaerobic fungi is affected by a variety of factors, specifically, North America is higher than other continents, rumen is higher than feces, eating forage animals are higher than eating feed animals, domestic animals are higher than wild animals, and the composition of anaerobic fungi within species varies significantly.

2. Isolation, purification and identification of anaerobic fungus *Oontomyces*

The isolated and identified anaerobic fungus *Oontomyces* that was not clustered in the above study has not been found in other animals since it was first isolated from Indian camel samples in 2015, and the type strain *Oontomyces* sp. SSD-C1B1 has died. There are no viable strains of anaerobic fungi. Camels are known for their high-efficiency fiber-degrading ability. The isolation and identification of *Oontomyces* is not only conducive to the collection and protection of anaerobic fungal resources, but also to the development of high-efficiency fiber-degrading anaerobic fungi. In this experiment, anaerobic fungal strains were isolated and purified by Hungate rolling tube technology using feces and rumen contents of Junggar Bactrian camels and their morphology was observed and identified by ITS sequencing. In this experiment, 22 anaerobic fungal strains were isolated from camel rumen, and 11 anaerobic fungal strains were obtained from camel feces. Morphological observation found that the rumen-derived anaerobic fungal strains were monocentric, polyflagellate, filamentous; The results of ITS sequencing showed that the rumen-isolated anaerobic fungal strains were *Oontomyces* sp., and the fecal-isolated anaerobic fungal strains were *Piromyces*

sp.. The phylogenetic tree showed that the similarity between the rumen-isolated anaerobic fungi *Oontomyces* sp. CR1-CR22 and *Oontomyces anksri* strains SSD-CIB1 belonged to the same clade, and the similarity between fecal-isolated anaerobic fungi *Piromyces* sp. CF1-CF11 and *Piromyces* sp. Jen1 belonged to the same clade. The results of methane determination showed that there were one rumen-isolated anaerobic fungal strain and one fecal-isolated anaerobic fungal strain with co-culture methanogens. The results of 16S rRNA gene sequencing of methanogens showed that the methanogens in the two anaerobic fungal strains were *Methanobrevibacter* sp., and the phylogenetic tree showed that the rumen-isolated methanogens *Methanobrevibacter* sp. LGM-CR1, the fecal-isolated methanogens *Methanobrevibacter* sp. LGM-CF1 and *Methanobrevibacter ruminantium* strain CY4 belonged to the same clade. The above results show that *Oontomyces* sp. strains were successfully isolated from the rumen of Bactrian camels in this study, and one of the strains coexisted with *Methanobrevibacter* sp., and the strains of anaerobic fungi in the feces of Bactrian camels were significantly different from those in the rumen.

3. Fiber degradation characteristics and application potential of anaerobic fungus *Oontomyces*

The purpose of this experiment was to explore the fiber degradation characteristics of the isolated and cultured camel-isolated anaerobic fungi and to evaluate their application potential. The experiment was first screened with rice straw as the substrate. From the pure culture of the anaerobic fungi isolated and identified in the previous chapter, one anaerobic fungus with the highest fiber degrading ability was screened, which were *Oontomyces* sp. CR2 from rumen and *Piromyces* sp. CF9 from feces. On this basis, the anaerobic fungus strain *Pecoramyces* sp. F1 with high fiber degradation ability preserved in the laboratory was used as a reference to study the effects of two anaerobic fungi on lignocellulose substrates with different nutrients, such as reed, *Broussonetia papyrifera* leaves, alfalfa stalk, *Melilotus officinalis*. The results showed that *Oontomyces* sp. CR2 had the highest substrate degradation rate, gas production and hydrogen production, and the highest acetate, formate, lactate and ethanol yield ($P < 0.05$) when degrading lignocellulose substrates with different nutrients. The study on fiber degradation characteristics of co-culture of anaerobic fungi and methanogens showed that the co-culture of *Pecoramyces* sp. F1 and methanogen

Methanobrevibacter thaueri had the highest substrate degradation rate, highest gas, methane production, and highest acetate, lactate production ($P < 0.05$) when degrading lignocellulose substrates with different nutrients; co-cultures of anaerobic fungi and methanogens had higher substrate degradation rates but less formate production than pure anaerobic fungi cultures. The above results show that the pure strain of anaerobic fungi *Oontomyces* sp. CR2 isolated from camel rumen has more vigorous hydrogensome metabolism, while among the anaerobic fungi with methanogens, *Pecoramyces* sp. F1 has stronger degradation ability.

In conclusion, factors such as different regions, different species, different intestinal segments, different diets, and different feeding methods have significant effects on the diversity of anaerobic fungi and their community structure. In this study, *Oontomyces* sp. strain were successfully isolated from the rumen of Junggar Bactrian camels, its fiber degradation ability and hydrogen metabolism ability are higher than those of the existing laboratory strain *Pecoramyces* sp. F1, while its fiber degradation ability of co-cultured methanogens is not as good as the existing laboratory co-culture. The results of this study provide feasible way and basic data for the degradation of lignocellulose in the efficient utilization of non-grain feeds such as straw by anaerobic fungi.

KEY WORDS: Anaerobic fungi; ITS1; Junggar Bactrian camel; Lignocellulose degradation; Methanogen

缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
ADF	Acid Detergent Fiber	酸性洗涤纤维
ADFD	Acid Detergent Fiber Digestibility	酸性洗涤纤维消化率
CAZymes	Carbohydrate-Active Enzyme	碳水化合物活性酶
CBMs	Carbohydrate Binding Modules	碳水化合物结合模块
CD	Cellulose Digestibility	纤维素消化率
CE	Carbohydrate Esterase	碳水化合物酯酶
CMCase	Carboxymethyl Cellulase	羧甲基纤维素酶
DM	Dry Matter	干物质
DMD	Dry Matter Digestion	干物质消失率
DNS	3, 5-Dinitrosalicylic Acid	3, 5-二硝基水杨酸
GC	Gas Chromatography	气相色谱
GH	Glycoside Hydrolase	糖苷水解酶
GT	Glycosyltransferases	糖基转移酶
HHV	High Heating Value	高发热值
HD	Hemicellulose Digestibility	半纤维素消化率
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1	内部转录间隔 1
NDF	Neutral Detergent Fiber	中性洗涤纤维
LD	Lignin Digestibility	木质素消化率
NDFD	Neutral Detergent Fiber Digestibility	中性洗涤纤维消化率
NDS	Neutral Detergent Solute	中性洗涤溶解物
NDSD	Neutral Detergent Solute Digestibility	中性洗涤溶解物消化率
OTU	Operational Taxonomic Unit	操作分类单元
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PL	Polysaccharide Lyases	多糖裂解酶
PTT	Pressure Transducer Technique	压力传感器技术

前言

厌氧真菌，是一种存在于草食动物消化道内的微生物，具有很强的纤维降解能力。在厌氧消化过程中，厌氧真菌的假根首先穿透并破碎植物纤维，从而帮助其它微生物和植物纤维充分接触，在微生物的协同作用下实现草食动物对植物纤维的高效利用。虽然已有一些研究报道了草食动物厌氧真菌群落的结构及其与环境（包括气候、饲料、种群等）的关系，但目前关于厌氧真菌的研究相对有限，对于厌氧真菌的多样性及分布特征尚未完全了解。同时由于厌氧真菌培养条件苛刻、基因组 DNA 中 AT 含量太高等原因，导致厌氧真菌的研究较为困难。尽管在网络数据库中大量厌氧真菌的 ITS1 序列，但尚未对其进行全面的分析，以评估这一重要微生物类群的多样性。

通过实现厌氧真菌的多样性研究，不仅可以确定影响厌氧真菌多样性的重要因素，还可以根据厌氧真菌的生态分布特性（如：地域特征、物种特征、季节特征、草食动物消化道分布特征等），针对性地开展特殊厌氧真菌的分离与鉴定工作，从而实现对厌氧真菌资源的保护与挖掘。通过特殊厌氧真菌的分离鉴定工作，并进一步通过研究不同厌氧真菌对木质纤维素底物的降解差异，深入了解不同厌氧真菌的功能特性，有助于弥补当前关于厌氧真菌分离鉴定领域的空白，同时为研究厌氧真菌在草食动物瘤胃中的生态功能奠定基础。

本研究首先通过在数据库中下载厌氧真菌的 ITS1 原始测序数据，通过分析不同地域、不同肠段、不同地区等条件下厌氧真菌 ITS1 序列多态性，系统研究厌氧真菌的多样性分布，探讨其生态意义，为深入了解厌氧真菌在草食动物瘤胃中的生态功能奠定基础。在此基础上，本研究采集了生活于干旱环境的准噶尔双峰驼瘤胃内容物与粪便，通过 Hungate 滚管纯化的方法，进行厌氧真菌富集培养与菌株的分离培养与鉴定，随后进一步评估了这些厌氧真菌菌株的应用潜力。本研究为深入了解厌氧真菌的生态功能，特别是其在瘤胃粗纤维降解中的作用奠定了基础，同时为厌氧真菌菌株的分离纯化和鉴定，以及在秸秆等非粮饲料高效利用中木质纤维素的降解方面提供可行途径和基础数据。

第一部分 文献综述

1. 厌氧真菌

反刍动物的瘤胃包含一个复杂的微生物群，构成了一个复杂的生态系统，主要由细菌、古菌、原虫和厌氧真菌组成^[1]。经过长时间的适应性进化，微生物与宿主动物之间，以及微生物与微生物之间形成了一种相互依赖，相互制约的动态平衡。由于反刍动物瘤胃中大量纤维降解微生物的存在，反刍动物在摄入粗纤维饲料后，能够充分分解并进一步实现对饲料中纤维物质的利用。在植物纤维细胞壁降解的过程中，瘤胃内的细菌、原虫和真菌发挥协同作用，实现饲料的转化，将饲料转化为宿主动物能够直接利用的挥发酸、蛋白质和其他营养物质。

在这些消化道微生物中，厌氧真菌主要负责纤维降解，具有最活跃的植物细胞壁降解酶^[2-4]，在厌氧消化过程中，厌氧真菌的假根首先穿透并破碎植物纤维，从而帮助其它微生物和植物纤维充分接触，促进瘤胃微生物对植物纤维的进一步降解^[2]。同时，不同于瘤胃细菌只能定植于植物纤维表面，并降解纤维素和半纤维素，厌氧真菌可以定植于粗饲料的木质化纤维，并降低粗饲料中的木质素含量^[5]，同时提高宿主对粗饲料的利用率。

1.1 厌氧真菌的分类学特性

厌氧真菌的鉴定分为形态学和分子学上的鉴定。目前所有已知的厌氧真菌都被归为一个科，*Neocallimasticaceae*，以及一个门 *Neocallimastigomycota*。迄今为止，根据两种鉴定方法，已有 20 个厌氧真菌属被鉴定出^[6-8]。然而，由于厌氧真菌的不同属和种在形态上差异较小，往往使厌氧真菌的分类与鉴定变得困难。同时，厌氧真菌严格厌氧，导致许多厌氧真菌无法使用目前可用的培养方法进行分离培养，加大了厌氧真菌的鉴定困难^[9]。

在最近的研究中，并对内部通过对厌氧真菌的内部转录间隔 1（*Internal Transcribed Spacer 1*，*ITS1*）区域进行聚合酶链式反应（*Polymerase Chain Reaction*，*PCR*）扩增测序和系统发育分析，来检测厌氧真菌的多样性^[10]。*ITS1* 序列被广泛认为是厌氧真菌的系统发育标记，因为它可以在属和种水平上鉴定厌氧真菌的系统发

育信息^[11]，而厌氧真菌的 18S rRNA 基因或 ITS2 区域由于在系统发育上的信息完整性不如 ITS1 区域，同时它们在不同厌氧真菌类群之间的高度序列相似性导致不常用于系统发育的鉴定^[12, 13]。然而虽然厌氧真菌的 ITS1 区域被广泛用作系统发育标记，但其具有多态性，表现出相当大的结构多态性和长度的变异性^[14, 15]。这种多态性使得自动对齐、序列差异估计、序列数据的分类结果以及 OTU（Operational Taxonomic Unit）挑选稳定性差，同时高度依赖于对齐策略和指定的参数，这为厌氧真菌的系统发育分析带来了一些挑战^[3, 16]。这样的限制往往需要繁杂的手动对齐以及利用厌氧真菌的二级结构等对齐策略^[17]。Kittelmann 等^[18]对 797 条厌氧真菌 ITS1 序列进行二级结构比对和系统发育分析，鉴定出 36 个物种等效（Sp-eq）系统发育聚类。Shyam 等^[19]基于厌氧真菌 262,770 条质控后的 ITS1 序列，提出了一种新的分类框架，将厌氧真菌 ITS1 序列划分为属等效和物种等效的分类群。这种新的参考序列数据集，改进了大量厌氧真菌 ITS1 序列的比对、聚类 and 系统发育分析。

目前，大量关于厌氧真菌 ITS1 区域的原始测序数据已经被上传至公共数据库，包括 GenBank（www.ncbi.nlm.nih.gov），ITSoneDB（itsonedb.ba.itb.cnr.it:8080/ITS1/）。这些 ITS1 原始序列大多数来自肠道和粪便样本的 PCR 扩增产物，只有少量来自厌氧真菌分离株。同时，一些 ITS1 原始序列虽然已经上传至公共数据库，但有关该数据的文章尚未发表，导致这些原始序列相关信息缺失。此外很多原始数据在上传时存在定义混乱，样品信息缺失等问题，缺乏系统的归纳与整理^[18]。大多数个体研究只在实验室条件下，或在单一地理区域中产生和分析了有限数量的 ITS1 序列，不足以代表全球厌氧真菌的多样性，导致目前关于厌氧真菌多样性的研究仍然缺失。因此，目前关于厌氧真菌的全球性分析尚未全面，不足以评估这一重要微生物类群的全球多样性，亟待一个关于厌氧真菌的全面的系统发育分析，为研究厌氧真菌的全球多样性研究提供机会。

1.2 厌氧真菌的多样性分布

自 1975 年，Orpin^[20]在反刍动物的瘤胃中发现厌氧真菌后，直至今日，它们已经在至少 50 种不同的食草动物物种中被发现^[21]，包括反刍动物^[22]、非反刍动物^[23]，大型食草啮齿动物^[24]和食草爬行动物^[10]。此外，随着研究的深入，厌氧真菌的栖息地也不断随着消化道、粪便^[25]等向到土壤^[26]和海洋^[27]延伸。尽管厌氧真菌缺乏在有氧环境中生存的能力，但研究表明可以在草食动物和反刍动物粪便中分离出相同的厌氧真菌，同时这些厌氧真菌可在室温下存活数月，这表明厌氧真菌可能存在某种独

特的厌氧结构，从而解释其在粪便乃至土壤和海洋中存活的原因^[28]。虽然在这些体外环境中通过分子生物学分析已经检测到厌氧真菌的存在，但迄今为止还没有从体外环境中分离出厌氧真菌的报道。这意味着可能在整个自然界中有许多未被发现的厌氧真菌，而且厌氧真菌的多样性远远大于目前通过分离培养手段得到的。

同时，研究表明，存在多重影响厌氧真菌多样性的因素，如宿主肠道类型、采样部位和饮食等^[3]。厌氧真菌的丰度会受到饲料纤维浓度的影响，当宿主被喂食高纤维饲料时，厌氧真菌的数量增加^[29, 30]，同时也表现为厌氧真菌在以茎柄硬茎粗饲料为食的哺乳动物中含量较高，但在以谷物或软叶饲料为食的哺乳动物中含量较低^[31]。Hanafy 等^[32]研究发现，厌氧真菌的属-宿主偏好可能很强，即某些属只在一种动物中存在。同时研究表明，野生草食动物和驯化草食动物的厌氧真菌多样性也不相同，其原因可能在于野生食草动物经历了更多样化的饮食和不频繁的进食间隔，而驯化食草动物的饮食结构较为单一和较少的饮食只能选择特定的厌氧真菌种群^[33]。这种饮食选择特定的厌氧真菌种群是指，具有不同假根形态的厌氧真菌的底物差异性富集^[34]。例如，*Neocallimastix* sp. 具有较为发达的假根系统，使其能够穿透复杂的木质纤维素底物，而 *Caecomyces* sp. 由于没有假根从而更偏向于可溶性底物^[35]，这也为我们在今后分离低丰度厌氧真菌种群提供了策略。

1.3 厌氧真菌的纤维降解特性

粗纤维饲料以其复杂的木质纤维素结构限制了反刍动物对其的利用，在过去，人们普遍认为反刍动物瘤胃中承担纤维素降解任务的为细菌和原虫，自 1975 年 Orpin 首次确认了瘤胃中厌氧真菌的存在^[20]，自此厌氧真菌的降解纤维的能力引起了人们的关注。厌氧真菌独特的菌丝体结构发挥着物理降解的作用，在其穿透植物细胞壁的同时，产生一系列较高活力的具有植物细胞壁降解能力的纤维素降解酶，包括一些纤维素酶，半纤维素酶和酯酶。在显微镜下观察到，在厌氧真菌对植物纤维的降解过程中，厌氧真菌优先粘附于植物的角质层以及木质化组织^[36]。随后，厌氧真菌释放出来的游动孢子附着于纤维表面，经过包囊萌发形成厌氧真菌独特的假根系统。厌氧真菌的假根穿透植物细胞壁的木质纤维素结构，同时部分降解纤维中的抗性组织，使紧密的植物组织松散。在实现对植物纤维的穿透和破碎之后，厌氧真菌利用假根系统分泌大量的纤维水解酶，这些水解酶进入植物细胞内腔实现对植物纤维中纤维素，半纤维素、果胶的深度降解，厌氧真菌独特的假根系统让它能够利用到瘤胃中其它微生物不能利用到的可发酵碳水化合物，实现自身和宿主动物对营养物质

的进一步利用。之前的研究表明，瘤胃内厌氧真菌和细菌对于植物纤维的降解方式存在较大差异，在植物纤维进入反刍动物瘤胃后，厌氧真菌首先接触植物纤维，利用假根深入到植物纤维内部，降解植物纤维的厚壁组织及木质纤维素结构，使植物纤维组织变得疏松从而易于被其它瘤胃微生物降解，为细菌利用纤维物质创造条件。瘤胃真菌中的大多数属具有丰富的假根系统，部分厌氧真菌的属如：*Caecomyces* 属和 *Cyllamyces* 属虽然属于球状菌体，没有假根系统，但可以通过粘附在植物组织上通过膨胀方式来破坏植物组织，从而实现细胞壁的降解。

瘤胃厌氧真菌的存在为实现木质纤维素的物理和化学降解，以及为瘤胃内其它微生物对粗纤维的进一步发酵奠定了基础。虽然瘤胃中厌氧真菌含量相对较少，但是瘤胃厌氧真菌单菌株降解植物的木质化组织的能力被认为高于瘤胃细菌^[37]。细菌在瘤胃中数量最多，是承担分解纤维功能的优势群体，但由于其形态结构的限制，细菌不能像厌氧真菌一样实现对植物细胞壁的快速有效破坏，只能通过降解植物的外周部分，对植物细胞壁产生轻度的降解，很难突破植物细胞壁外层的高密度木质素层。瘤胃细菌对植物的降解是以表面侵蚀的方式作用于植物片段，只有在植物大片段被降解成小片段同时造成大量空隙后，细菌才能由外而内地占据这些空隙，同时进行大量的增殖使其数量增多，随即进一步侵蚀木质纤维素。由于瘤胃细菌仅能通过自身分泌的胞外纤维水解酶从外到内地实现对植物细胞的降解，它需要和厌氧真菌发挥协同作用，经真菌假根进入到植物纤维组织内，才能更有效发挥降解作用。

由于厌氧真菌高效的纤维降解能力，它可以利用多种底物实现自身的增殖，包括复杂的结构多糖、可溶性糖和储藏性多糖^[38]，通过分泌的大量水解酶来实现植物细胞壁的降解并将其转化为可溶性糖。这些糖在进入厌氧真菌的细胞质之后，被胞内酶代谢成氢气、二氧化碳、甲酸、乙酸、乙醇和琥珀酸^[39]。研究表明，厌氧真菌使用不同的碳源生成的代谢物保持相同（图 0-1），主要是甲酸、乙酸、乙醇、乳酸、二氧化碳和氢气，而利用不同碳源生成代谢产物的比例不同^[40]。因为厌氧真菌没有线粒体，因此它们使用氢体来产生 ATP。此外，氢化小体还能产生氢气、二氧化碳、乙酸和甲酸^[41]。近年对厌氧真菌代谢研究的不断深入，越来越多的新代谢产物和与代谢相关的关键酶被陆续报道。随着微生物代谢组学和微生物代谢工程逐渐发展成为国际生命科学技术研究最重要的热点，有望进一步揭示瘤胃厌氧真菌的代谢规律，通过对其进行改善以期提高目标产物产量。

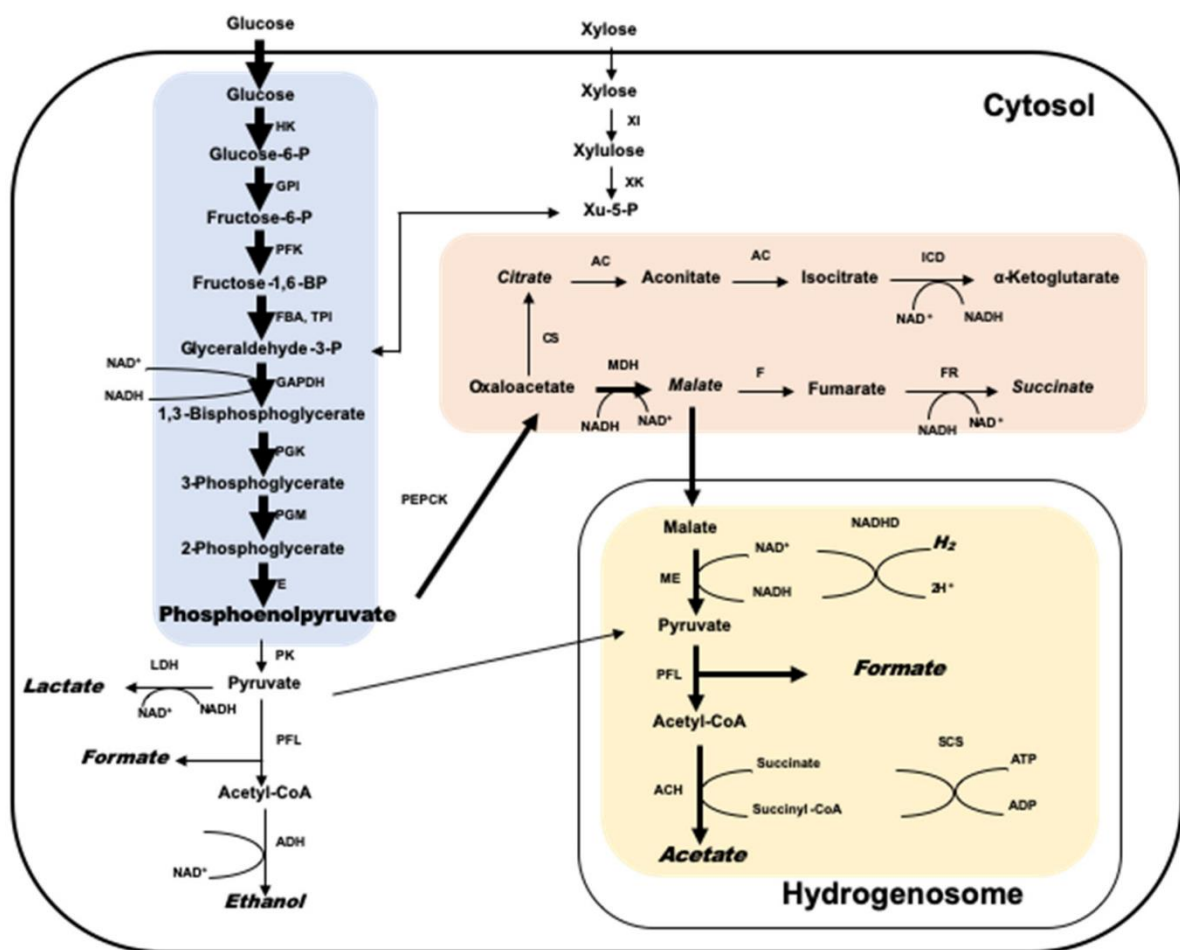


图 0-1 厌氧真菌的葡萄糖和木糖代谢。主路径用粗体箭头表示^[6]

Figure 0-1 Glucose and xylose metabolism by anaerobic fungi. The main path is indicated by bold arrows. The proposed metabolites are indicated initialics

注：AC，顺乌头酸酶；ACH，乙酰辅酶 A 水解酶；ADH，乙醇脱氢酶；CS，柠檬酸合酶；E，烯醇化酶；FBA，果糖二磷酸醛缩酶；F，延胡索酶；FR，富马酸还原酶；GAPDH，3-磷酸甘油醛脱氢酶；GPI，葡萄糖-6-磷酸异构酶；HK，己糖激酶；ICD，异柠檬酸脱氢酶；LDH，乳酸脱氢酶；MDH，苹果酸脱氢酶；ME，苹果酸酶；NADHD，NADH 脱氢酶；SCS，琥珀酰辅酶 A 合成酶；TPI，磷酸丙糖异构酶；XK，木酮糖激酶；XI，木糖异构酶；PFK，磷酸果糖激酶；PFL，丙酮酸甲裂解酶；PGK，3-磷酸甘油酸激酶；PGM，磷酸葡萄糖变位酶；PK，丙酮酸激酶；PEPCK，磷酸烯醇丙酮酸羧激酶

Note: AC, aconitase; ACH, acetyl-CoA hydrolase; ADH, alcohol dehydrogenase; CS, citrate synthase; E, enolase; FBA, fructose biphosphate aldolase; F, fumarase; FR, fumarate reductase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase; GPI, glucose-6-phosphateisomerase; HK, hexokinase; ICD, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; ME, malic enzyme; NADHD, NADH dehydrogenase; SCS, succinyl-CoA synthetase; TPI, triose phosphate isomerase; XK, xylulokinase; XI, xylose isomerase; PFK, phosphor fructokinase; PFL, pyruvate formate lyase; PGK, 3-phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxy kinase

1.4 厌氧真菌的酶学特性

研究表明，厌氧真菌中的绝大多数种属具有产生高活性降解植物细胞壁的纤维素酶、半纤维素酶以及一些果胶酶和酯酶，这些酶在植物性纤维素及半纤维素的降解中起着重要作用^[41]。纤维素和半纤维素是植物木质纤维素结构的主要成分，而果胶类似于植物细胞壁中的酚酸，是植物的一种重要组成成分。D-半乳糖醛酸和 L-鼠李糖作为主链，D-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖和 D-半乳糖组成的低聚糖为支链，构成了果胶这种杂多糖，其在植物细胞壁的木质素和半纤维素之间起着交联作用。厌氧真菌通过其分泌的果胶酶实现果胶的降解，通过打开果胶与木质素或半纤维素之间的醚键或酯键，有助于其假根进一步深入植物组织，充分降解利用植物组织中可利用的碳水化合物^[42]。除此之外，厌氧真菌还产生淀粉酶和蛋白酶等多种酶类，由于植物性结构蛋白可以植物细胞壁的完整性，因此厌氧真菌的蛋白酶也有助于植物细胞壁的降解。

近年来，随着转录组分析的进一步发展，研究表明厌氧真菌可以表达大量的转录本来编码一系列的碳水化合物活性酶（Carbohydrate-Active Enzyme, CAZymes）。为了进一步阐明厌氧真菌对木质纤维素物质的消化机制，Li 等^[6]人对 *Pecoramyces* sp. F1 中表达的 CAZymes 组成进行详细分析和比较（图 0-2a）。*Pecoramyces* sp. F1 表达了大量碳水化合物结合模块（Carbohydrate Binding Modules, CBMs），以及编码 CAZyme 模块的基因（糖苷水解酶、碳水化合物酯酶、糖基转移酶和多糖裂解酶）。在 *Pecoramyces* sp. F1 中，编码 CAZymes 的序列中有 40% 为已知的 CBMs，包括常见的 CBM18、CBM1 和 CBM57（图 0-2b）。厌氧真菌 *Pecoramyces* sp. F1 中最多样化的 CAZymes 是糖苷水解酶（Glycoside Hydrolase, GH），将厌氧真菌中 GH 家族丰度最高到最低排序为：GH6、GH5、GH3、GH4、GH18、GH38、GH43、GH28、GH11 和 GH48（图 0-2c）。同时在 *Pecoramyces* sp. F1 中，三个最丰富的碳水化合物酯酶（Carbohydrate Esterase, CE）为 CE10、CE1 和 CE4（图 0-2d）。*Pecoramyces* sp. F1 还拥有四个公认的多糖裂解酶（Polysaccharide Lyases, PL）家族（PL1、PL3、PL4 和 PL9）的成员，这些家族被认为可能具有对果胶具有特异性的活性（图 0-2e）。与 GH 家族相比，已鉴定出的糖基转移酶（Glycosyltransferases, GT）的数量相对较少，仅占 CAZyme 的 17% 左右。在 *Pecoramyces* sp. F1 中，GT 家族最丰富的为 GT2、GT4、GT0、GT1、GT48 和 GT8（图 0-2f），它们参与了细胞壁的生物合成，甲壳素的合成和糖基化等多种代谢过程。也正因为这些 CAZymes 的特性使厌氧真菌能够分解未经处理的纤维素材料，并实现自身和宿主动物的生长。

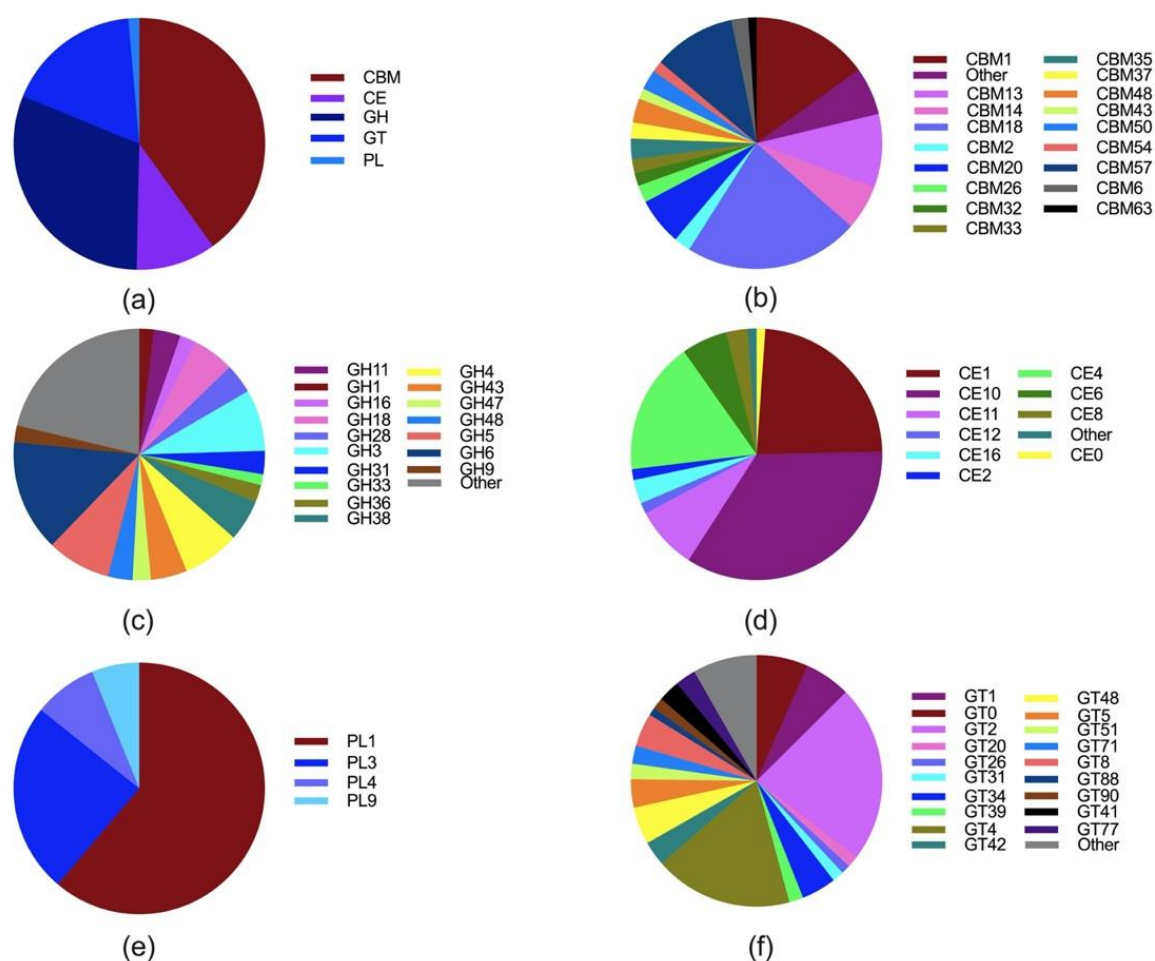


图 0-2 厌氧真菌 *Pecoramyces* sp. F1 的碳水化合物活性酶。（a：碳水化合物活性酶；b：碳水化合物结合模块（CBMs）；c：糖苷水解酶；d：碳水化合物酯酶；e：多糖裂解酶；f：糖基转移酶）^[6]

Figure 0-2: The CAZymes in anaerobic fungal strain *Pecoramyces* sp. F1. (a: CAZymes; b: Carbohydrate binding modules; c: glycoside hydrolases; d: Carbohydrate esterases; e: Polysaccharide lyases; f: Glycosyltransferases)

2. 厌氧真菌的应用价值

厌氧真菌以其高效的纤维降解能力得到微生物学家的高度认可，随着在其分类学、生命周期和代谢特征方面研究的不断深入，正在逐渐实现厌氧真菌在动物营养、饲料行业乃至工业上的应用。

2.1 厌氧真菌在反刍动物营养的应用

在微生物群相关研究方面，反刍动物营养领域正在努力研究如何通过饲料调节来塑造肠道微生物群来优化瘤胃发酵，向宿主提供营养，保障肠道健康，并最终实现预防疾病和改善动物生产性能的目标。因此，反刍动物营养学家将注意力集中于瘤胃，作为一个包含高度复杂的微生物群落的肠道部分，瘤胃的作用主要在于实现结构性碳水化合物的能量利用，并为宿主动物提供关键的营养物质，如蛋白质和维生素^[1]。在过去的几十年里，后肠微生物群也成为反刍动物营养学家越来越感兴趣的课题，特别是在高谷物饮食以及相关的微生物生态失调方面^[43]。

高谷物诱导的肠道疾病对动物健康具有深远影响，是集约化反刍动物生产系统的一个重要课题^[44]。在过去，已经有大量关于其对瘤胃和后肠微生物群影响的研究^[43, 45]，然而这些研究却忽略了厌氧真菌在其中发挥的作用。基于实时荧光定量 PCR 的现有数据表明，真菌总丰度似乎随着饲料中淀粉含量的增加而减少，而淀粉含量的增长也往往伴随着瘤胃纤维降解率的减少^[46-48]。然而，并不是所有的厌氧真菌群落都受到负面影响，某些菌群在富含精料的进食下反而增殖，如 *Neocallimastix*、*Piromyces* 和 *Feramyces*^[49]。厌氧真菌可能对高产奶牛特别重要，这些奶牛通常在哺乳期饲喂高谷物日粮，从而导致瘤胃纤维降解率下降^[48]。因此，在未来的高谷物饲料喂养研究中，适当补充厌氧真菌或许能成为保持肠道微生物群稳定性的新途径。

除了高谷物饲养外，减少乳制品和肉类生产的环境污染是反刍动物营养的另一个重要课题。事实上，可持续农业具有较高的社会价值，旨在努力减少与牲畜相关的排放，在畜牧业中主要通过是不同的饮食策略来实现甲烷的减排。由此，基于实现甲烷减排的目标，诸如化学抑制剂、硝酸盐或脂类等方法已经被应用于动物生产中，来探究它们对瘤胃甲烷生成、发酵以及古菌和原虫的影响^[50]。尽管这些方法已经有效减少 20%- 40% 的甲烷排放^[51]，但利用厌氧真菌的代谢特性可能会进一步的实现甲烷减排这一目标。产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最终产物的古菌，它能利用厌氧真菌的代谢产物氢气来产生甲烷，缓解了氢气对厌氧真菌氢体的抑制，促进了氢体的代谢，从而进一步提高了厌氧真菌的粗纤维降解能力^[52, 53]。在厌氧真菌和产甲烷菌的共培养中，厌氧真菌碳水化合物活性酶的表达和细胞壁降解活性增加，当产甲烷菌与瘤胃厌氧真菌共培养降解秸秆时，拥有与瘤胃细菌共培养相比时更高的甲烷产量^[54]。在之前的研究中，饲料中添加葡萄籽粉有效降低了高达 23% 的甲烷产量，纵使产甲烷菌承担生产甲烷的任务，但在试验前期的多样性研究中发现，甲烷产量的降低与厌氧真菌总丰度的降低相关，而不是直接与产甲烷菌相关^[55]。因此，特别是在期望通过饲料调节的方式来实现甲烷减排的农业生产环节中，研究厌氧真菌在瘤胃甲烷生成中的作用意义重大。

2.2 厌氧真菌在饲料行业的应用

微生物在动物饲料科学中扮演着核心角色，或者是饲料的主要组成部分，如通过发酵谷物酿酒；或者利用它们的代谢活动为反刍动物保存饲料。青贮饲料是世界上所有生产系统中反刍动物的主要饲料源，青贮的目的是通过快速乳酸发酵保存新鲜饲料，同时最大限度地保存膳食能量和高消化营养物质^[56]。为了实现这一目的，各种微生物分离的酶或多种组合被应用作青贮添加剂^[57]。

然而，到目前为止，使用厌氧真菌对青贮过程的有益影响一直被忽视。厌氧真菌作为添加剂所导致的青贮饲料质量差，其原因主要在于有氧环境中酵母和霉菌的存在以及霉菌毒素中毒，从而导致动物采食量下降，生产性能下降，并进一步损害动物健康^[58, 59]。然而，青贮作为厌氧真菌的一个应用领域，具有巨大的潜力，因为其在代谢过程中生成大量碳水化合物活性酶，可以进一步排列为纤维素小体，同时在增殖过程中通过物理方式穿透纤维结构。因此，在青贮时添加厌氧真菌会促进纤维和木质纤维素生物质的降解，从而提高瘤胃对纤维的降解能力。通过利用厌氧真菌青贮饲料的开发，可以提升像稻秸这种未得到合理开发的纤维生物质的利用价值，从而成为反刍动物牲畜生产系统中应用更广泛的饲粮成分。在之前的体外^[60]和体内^[61]研究中，厌氧真菌青贮饲料显著提升了瘤胃干物质和纤维降解率。值得注意的是，与对照青贮饲料相比，经厌氧真菌处理的全作物玉米青贮饲料的青贮质量也有所提高，表现为乳酸浓度升高，pH 和乙酸浓度降低^[61]，这一现象也出现在厌氧真菌青贮处理的水稻秸秆青贮中^[60]。

虽然这些数据提供了厌氧真菌作为青贮添加剂的具有潜力的证据，但需要注意的是，对厌氧真菌处理的青贮饲料这些研是在小规模实验室条件下进行的。在实际生产中，大量的厌氧真菌培养物需要充分接触到大量的饲料原料，而且需要在几天内就运送到养殖场饲喂。由于目前还不可能生产大量具有高活性的厌氧真菌培养物，同时厌氧真菌培养物的长期储存也会导致其活性的降低，需要考虑一种合适的方式来实现厌氧真菌的储存以及活性保持^[62]。尽管在生产厌氧真菌培养物和使用厌氧真菌作为青贮接种剂方面有明显的局限性，但 Lee 等^[60]的研究可能为这一局限性提出了一个可能的解决方案。事实上，厌氧真菌在青贮后数量下降非常迅速，且菌体形成单位的浓度与对照组在 60 天后相似。因此，青贮液实际上无法为厌氧真菌的生存和增殖提供必要的条件，这同时反过来阻止了厌氧真菌假根对植物纤维的物理渗透。然而，在厌氧真菌处理的青贮中观察到纤维的变化，在 60 天后仍然明显，如中性洗

涤纤维的进一步下降，这表明，化学成分的差异和瘤胃降解能力的提升并非决定于厌氧真菌，而是决定于其分泌的碳水化合物活性酶和纤维小体。

研究表明，厌氧真菌可以在连续流动培养系统中培养，并且与分批培养相比，连续流动培养中的厌氧真菌表现出高达 20 倍的纤维素酶活力^[63]。同时，对厌氧真菌进行冷冻干燥的操作，可以起到了方便储存和运输同时不显著损害厌氧真菌酶活性的作用^[64]，冷冻干燥如果进一步与其他技术结合，如超滤技术，以浓缩厌氧真菌所分泌的活性酶^[65]，从而增强其作为青贮添加剂的活性。虽然目前看来，大规模培养厌氧真菌仍存在问题，但这种连续流动生产和加工厌氧真菌真菌单干细胞的方式，可以更好地提高厌氧真菌活性酶对反刍动物生产中的规模化应用，但将这种方式，真正投入到生产实践中，还有很多问题值得去探讨。

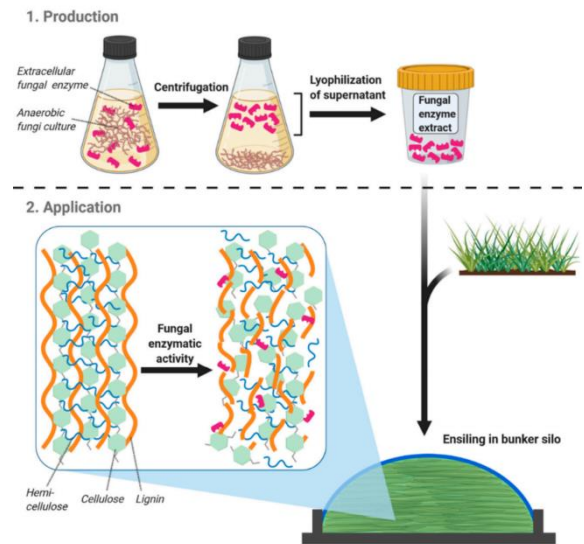


图 0-3 一种厌氧真菌基青贮添加剂的生产和应用的基本方案及其在青贮过程中的潜在作用模式
Figure 0-3 The production and application of an anaerobic fungi-based silage additive, as well as its potential mode of action during ensiling

2.3 厌氧真菌在工业的应用

能源危机日趋激烈，需要采取新的方法来减少化石燃料的使用，木质纤维素生物质产量丰富，价格低廉，可以用于生物燃料的生产。目前从木质纤维素生物质中提取原料化学品和能量的方法的生产力较低，这是因为木质纤维素生物质（包括纤维素、半纤维素和木质素）的化学成分和结构需要高能量或腐蚀性的化学物质来分解它，同时会产生较高成本和污染^[66, 67]。厌氧真菌在木质纤维素底物的厌氧消化中起着至关重要的作用，它们被广泛应用于提高木质纤维素的厌氧消化率，为木质纤维素生物质的预处理提供了一种绿色的解决方案，因为它们具有降解木质纤维素生物质的能力^[68]，并能够将其中的聚合物植物细胞壁成分转化为氢气^[69]和乙醇^[70]。同

时，厌氧真菌还可以产生挥发性脂肪酸（例如，乙酸和甲酸^[69]），这些脂肪酸是适合下游生物燃料生产的合适底物。厌氧真菌强大的降解能力主要得益于其丰富的木质纤维素降解酶库，其包括纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、半纤维素酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和酯酶^[71, 72]。迄今为止，大多数生物水解预处理都集中在利用需氧真菌及其酶来降解木质纤维素成分上^[73, 74]。Solomon 等表明^[72]，厌氧真菌的酶库优于需氧真菌，使其成为生物预处理过程的良好候选材料。然而从目前的文献来看，厌氧真菌衍生的酶混合物预处理产生的木质纤维素水解物，无法满足生物燃料的大规模生产需要，仍需进一步的努力。

厌氧真菌在生物乙醇综合生产中的潜在用途值得探索，因为它们具有丰富的碳水化合物活性酶和纤维素酶资源，以及同时拥有利用 5C 和 6C 碳水化合物和乙醇的代谢途径^[75]。研究表明，一系列含木质纤维素的底物（如小麦秸秆^[76]、甘蔗渣^[76]、大麦秸秆^[70]、甘蔗^[77]、高粱^[77]和玉米秸秆^[77]）可以被厌氧真菌转化为生物乙醇。厌氧真菌生产生物乙醇的例子见表 0-1。虽然厌氧真菌为木质纤维素工业综合生产生物乙醇提供了机会，但必须解决一些问题，才能使整个生物乙醇生产流程得到完善。之前的研究表明，乙醇的累积抑制厌氧真菌的生长^[78]。据报道，乙醇对厌氧真菌在纤维素上生长的动力学产物抑制常数为 222 mM（或 10.2 mg/L）^[78]，而相比之下，酿酒酵母的抑制常数只有它的一半。目前厌氧真菌生产生物乙醇所面临的挑战主要包括低且不稳定的乙醇产量和更好的替代发酵最终产物（如甲酸、乙酸和乳酸）。目前已经有很多方法来克服这些障碍，包括与乙醇生产或耐受性相关的基因的上调、异源表达、诱导突变^[79]。例如，Stevenson 等^[80]从牛粪中分离出一株 *Trichoderma*，并将其发酵纤维素的生物乙醇产量从大约 0.4 g ethanol/L 提高到 2 g ethanol/L。作者采用了诱导突变、促进副性融合和增加氧气利用性的方式实现了这种增加，但增加的实际原因尚不确定。事实上，关于厌氧真菌转化生物乙醇的开发仍然是一个相对较少研究的课题。

迄今为止，厌氧真菌在工业沼气生产过程中的潜在用途也同样备受关注，它可以将木质纤维素生物质转化为生物甲烷的前体物质氢气。厌氧真菌和产甲烷菌的共培养可以将木质纤维素生物质转化为生物甲烷，然而，使用厌氧真菌来生产生物氢作为生物甲烷的替代产品还没有得到广泛应用。生物氢在燃料效率方面可能优于生物甲烷，表现为更高的发热值（High Heating Value, HHV），氢气为 141.9 kJ/g，而甲烷为 55.5 kJ/g^[84]。目前全球的氢气生产和消费每年接近七千万吨，具有巨大的消费市场，然而氢气的生产几乎全部来自于化石燃料的分离，同时在此过程中造成大量的二氧化碳排放^[85]。因此，全球可持续的氢气经济的障碍之一是需要一种低成本的绿色生产方法，如降解木质纤维素生物质产生生物氢。厌氧真菌在被称为氢体的细

胞器中产生氢气，在由纤维素和半纤维素衍生的单体糖（主要是葡萄糖和木糖）的混合酸发酵过程中，氢体利用质子作为电子受体产生氢气，同时释放 ATP。在反刍动物消化道中，由于产甲烷菌的转化，氢气被产甲烷菌利用生产甲烷，从而使得厌氧真菌生产氢气的积累受到了限制^[86]，所以甲烷生成可以促进厌氧真菌的氢化酶活性和氢气以及 ATP 的生成^[87]。因此，我们假设，氢气的积累限制了厌氧真菌的氢气产量，并且在没有氢气消耗物种的情况下，它们的工业生长将需要整合合适的方案来进行原位氢气的去除，才能避免出现产气抑制现象。有许多技术已经在实验室规模内应用于细菌的发酵系统，以减少氢气的产物抑制，显著增加氢气的产量。这些技术包括特定的混合机制^[88]，气体喷射^[89]，膜气体分离^[90]，和电化学去除^[91]。这些氢气去除技术如何在厌氧真菌上进行适应性转化，对厌氧真菌（在没有产甲烷菌的情况下）生长的发展和应用而言是一个极具意义的研究领域，从而确保厌氧真菌实现生产氢气的最大潜力。

表 0-1 厌氧真菌的乙醇生产

Table 0-1. Ethanol production by anaerobic fungi			
分离真菌	底物	乙醇产量[$\mu\text{mol gg L}$]	参考文献
Fungal Isolate	Substrate	Ethanol Yield [$\mu\text{mol gg L}$] *	Reference
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Cellobiose	50	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Glucose	80	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Fructose	80	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Mannose	80	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Lactose	14.77	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate F1	Xylose	1920	[81]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Xylose	113	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Xylan	84	[76]
<i>N. frontalis</i>	Cellulose	2310	[82]
<i>N. frontalis</i>	Cellulose	3750	[83]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Cellulose	157	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Wheat straw	695	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Wheat bran	891	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Starch	157	[76]
<i>Pecoramyces ruminantium</i>	Switch grass **	540	[77]
<i>P. ruminantium</i>	Energy cane **	510	[77]
<i>P. ruminantium</i>	Sorghum **	560	[77]
<i>P. ruminantium</i>	Mixed prairie **	490	[77]
<i>P. ruminantium</i>	Corn stover **	1030	[77]

* 所引用的值为零位小数位。 **底物用 3% NaOH 预处理。所有底物均为发酵前高压灭菌，分批培养。
* Values quoted are with zero decimal places. ** Substrates were pretreated with 3% NaOH. All substrates were

autoclaved prior to fermentation and fermented in batch culture.

表 0-2 厌氧真菌的氢气生产

Table 0-2. Hydrogen production by anaerobic fungi			
分离真菌 Fungal Isolate	底物 Substrate	氢气产量[$\mu\text{mol gg L}$] * H ₂ Yield [$\mu\text{mol gg L}$]	参考文献 Reference
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Cellobiose	54	[76]
<i>Neocallimastix</i> sp., isolate R1	Glucose	3464	[25]
<i>Piromyces</i> sp., isolate F1	Glucose	≈ 377	[92]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Glucose	70	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Fructose	161	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Lactose	106	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Mannose	88	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Xylose	106	[76]
<i>Neocallimastix</i> sp., isolate R1	Xylose	8020	[25]
<i>N. frontalis</i>	Cellulose	2177	[82]
<i>Sphaeromonas communis</i>	Cellulose	2880	[93]
<i>Neocallimastix</i> sp., isolate N1	Cellulose	2520	[94]
<i>Neocallimastix</i> sp., isolate N2	Cellulose	2620	[94]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Cellulose	2220	[94]
<i>Piromyces</i> sp., isolate R1	Cellulose	2460	[94]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Cellulose	159	[76]
<i>N. frontalis</i>	Xylan	≈ 2381	[95]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Wheat Straw	2261	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Wheat Bran	1370	[76]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Bagasse	1957	[76]
<i>N. frontalis</i>	Poplar wood chips	1984	[96]
<i>Piromyces</i> sp., isolate E2	Xylan	134	[76]

* 所引用的值为零位小数位。所有底物均为发酵前高压灭菌，分批培养。

* Values quoted are with zero decimal places. All substrates were autoclaved prior to fermentation and fermented in batch culture.

3. 本论文研究的目的与意义

厌氧真菌具有高效的纤维降解能力，促进了草食动物对粗饲料的利用，在草食动物营养素消化，特别是其粗纤维消化降解中起着至关重要的作用。但目前为止，由于培养条件苛刻、基因组 DNA 中 AT 含量太高等原因导致厌氧真菌的研究较为困难，使得关于草食动物厌氧真菌群落的结构及其与环境（包括气候、饲料、种群等）关系的相关报道还非常欠缺。本研究首先下载 NCBI 数据库中厌氧真菌 ITS1 序列，通过分析不同环境、不同肠段、不同地区等条件下厌氧真菌 ITS1 序列多态性，系统研究影响厌氧真菌多样性的因素，探讨其生态意义，为深入了解厌氧真菌在草食动

物瘤胃中的重要性和资源开发奠定基础。在此基础上，本研究采集了生活于干旱环境的准噶尔双峰驼瘤胃内容物与粪便，进行厌氧真菌富集培养与菌株的分离培养与鉴定，随后评估了这些厌氧真菌菌株的应用潜力。本研究为深入了解厌氧真菌的生态功能，特别是其在瘤胃粗纤维降解中的作用奠定了基础，同时为厌氧真菌在秸秆等非粮饲料高效利用中木质纤维素的降解方面提供可行途径和基础数据。

第二部分 试验部分

第一章 基于 ITS1 序列分析厌氧真菌多样性及影响因素

厌氧真菌在消化草食动物肠道的纤维饲料中起着关键作用，研究表明，厌氧真菌的多样性受到多种因素的影响，包括饲料种类、动物品种、采样位置等^[97]。ITS1 序列被广泛认为是厌氧真菌的系统发育标记，可以在属和种水平上鉴定真菌的系统发育信息^[19]。但由于培养条件苛刻、基因组 DNA 中 AT 含量太高等原因导致厌氧真菌的研究较为困难，相关报道还非常欠缺。在 NCBI 数据库中，存在大量的未经整理分离的 ITS1 区域原始数据，缺少归一化整合分析。大部分的 ITS1 序列来自肠道和粪便样本的 PCR 扩增产物，可以通过系统发育的方法来鉴定新的厌氧真菌物种，只有少量的 ITS1 序列来自真菌分离株。三个新的属等效物仅通过 ITS1 序列的系统发育分析，就直接鉴定了厌氧真菌的类群，包括 *Buwchfawromyces*^[98]、*Oontomyces*^[99] 和 *Pecoramyces*^[100]。然而，对厌氧真菌的 ITS1 序列尚未进行全面的分析，以评估这一重要微生物类群的全球多样性。

此外，一些 ITS1 序列已存入公共数据库，但从未在文献中被描述或报道。通过对现有的厌氧真菌 ITS1 序列进行全面的系统发育分析，将为研究厌氧真菌的全球多样性及其分类特征提供机会。鉴于公共数据库中大量厌氧真菌 ITS1 序列，Kittelmann 等^[18]认为可以通过进一步分析所有可用的 ITS1 序列的方式，进一步更新厌氧真菌当前的分类框架。类似的方法早前已成功用于评估瘤胃细菌和古细菌的全球多样性^[101]、家禽肠道细菌^[102]和土壤中的细菌^[103]。

基于以上背景，本研究首先下载 NCBI 数据库中厌氧真菌 ITS1 序列，通过分析不同环境、不同肠段、不同地区等条件下厌氧真菌 ITS1 序列多态性，进一步系统研究影响厌氧真菌多样性的因素，探讨其生态意义，为深入了解厌氧真菌在草食动物瘤胃中的重要性和资源开发奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 原始数据收集与整理

截止到 2020 年 12 月 31 日，在 NCBI 数据库 SRA 项目下按照以下关键词进行原始数据的搜索：（（Neocallimastigales AND（ITS1 OR internal transcribed spacer 1））OR（anaerobic fungi AND（ITS1 OR internal transcribed spacer 1））OR（（rumen OR feces OR manure）AND（ITS1 OR internal transcribed spacer 1）））。

获得原始数据的 METADATA 后，将原始数据的 SRA 识别号用 TXT 文本导出后，使用 NCBI 数据库中的 SRA Toolkit 工具^[104]进行原始数据的下载。同时，收集各 SRA 项目的扩增工具、扩增方式、引物信息、样本来源宿主动物的科、亚种、饲料种类、饲喂模式、采样位置、季节、城市、国家及大洲等信息，整理成 METADATA 供后续分析使用。本项目共收集 3352 个样品，32G 数据。

1.2 数据清理、质控、OTU 聚类与系统发育树构建

在完成原始数据的下载后，使用 FastQC 工具^[105]进行原始数据的质量检测，使用 FASTX-Toolkit 工具^[106]中的 fastq_quality_filter 对原始数据进行质量控制，去除质量分数低于 20 的序列，随后在 QIIME^[107]中通过脚本 fastqCombinePairedEnd0719.py 对质控后的数据进行双端合并，整理为统一的 fastq 格式文件。利用 seqtk^[108]将 fastq 格式文件转化为 fasta 格式文件，并将低于 100bp 的序列去除，获得用于后续分析的 clean data。

首先使用 vsearch^[109]对 clean data 进行去冗余、使用脚本 parallel_identify_chimeric_seqs.py, filter_fasta.py 进行 ITS1 序列嵌合体的鉴定和去除，然后以 Anaerobic Fungi Network (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>) 中下载的厌氧真菌 ITS1 数据库为参考，利用 QIIME2^[110]进行 OTU 有参聚类，聚类相似性分别设置为 95%、97%、98% 及 99%。利用 make_phylogeny.py 脚本对各 OTU 代表性序列进行系统发育分析并构建系统发育树，将相关信息以 fasttree-tree.qza 格式输出后，在 iTOL 网站^[111]进行系统发育树的美化，以及相关参数的修改。将文献已经报道的 20 个已经分离鉴定的厌氧真菌属与本试验中厌氧真菌系统发育树进行比较分析。

1.3 物种注释和厌氧真菌多样性分析

利用 Anaerobic Fungi Network (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>) 中下载的厌氧真菌 ITS1 参考数据库对各 OTU 的代表性序列进行物种注释。在 QIIME2^[110]中, 使用 diversity core-metrics-phylogenetic 命令分析厌氧真菌的 α 多样性和 β 多样性, 使用 output-dir core-metrics-results 命令导出计算结果。将 Shannon 指数结果经过 Excel (微软, 雷德蒙德, 美国) 简单处理后, 将数据导入 Origin (9.1, OriginLab, 纽约, 美国) 中绘制箱形图进行可视化操作, 并进行差异性的标注。

根据 β 多样性分析结果, 分别研究地域、动物品种、肠段、饲草类型等因素对厌氧真菌多样性的影响, 计算厌氧真菌样本在不同分组中的相对丰度, 使用生科云平台 ([https:// www.bioincloud.tech](https://www.bioincloud.tech)) 进行厌氧真菌不同分组的 LEfSe 分析, 并选择 LDA 值大于 2 的结果进行展示, 将结果导入 Graphpad (9.1.1, GraphPad Software, 纽约, 美国) 中按照不同的分组进行结果可视化。

1.4 数据分析

所有的实验数据在 Excel 2019 (微软, 雷德蒙德, 美国) 进行初步整理, 随后使用 SPSS (IBM SPSS Statistics, 26.0; IBM 公司, 纽约, 美国) 采用 Kruskal-Wallis H(K) 非参数检验分析, 置信区间设定为 95%, 数据为平均值 $\pm$ 标准误的表示形式。

2. 结果

2.1 原始数据收集与数据清理

在 NCBI 关键词搜索后完成厌氧真菌 ITS1 原始数据的下载, 原始数据共 3352 样品, 共 291,687,492 条原始序列, 32 G 数据, 其中动物 (科, 亚种), 大洲, 国家, 城市的样本数为 3352, 各类型数据分别为: 采样位置 3217 样本, 食物 972 样本, 饲喂模式 620 样本, 季节 320 样本。将原始数据经过质控和拼接后, 共获得了 2301 个样本, 共 88,173,845 条原始序列, 文件大小约 19 G。其中大洲, 国家, 城市的样本数为 2301, 各类型数据分别为: 采样位置 2210 样本, 食物 212 样本, 饲喂模式 164 样本, 季节 179 样本。结果显示, 经过质量过滤, 去除了大量测序质量较差的厌氧真菌 ITS1 序列 (表 1-1)。表明在之前关于厌氧真菌多样性的研究中, 在 DNA 提取以

及 PCR 扩增阶段存在一定问题，可能原因为厌氧真菌的 DNA 在提取后快速失活、缺少正确的 ITS1 区域扩增引物以及 PCR 扩增程序有误。

表 1-1 样品信息

Table 1-1 Sample information						
项目 Items	原始数据 Raw data			清理后数据 Clean data		
	样本数 Number	序列条数 Sequence	文件大小 File Size	样本数 Number	序列条数 Sequence	文件大小 File size
总样本 /Total sample	3352	291,687,492	32 G	2301	88,173,845	19 G
科/Family	3352	291,687,492	32 G	2301	88,173,845	19 G
动物(亚种) /Animal(subspecies)	3352	291,687,492	32 G	2301	88,173,845	19 G
食物/Feed	972	64,582,411	14.6 G	212	23,462,362	5.4 G
饲喂模式/Feed type	620	63,372,973	15 G	164	46,273,289	5 G
采样位置 /Sample source	3127	241,236,293	28 G	2210	81,236,293	16 G
季节/Season	320	23,673,632	5.9 G	179	14,836,289	3.8 G
大洲/Continent	3352	291,687,492	32 G	2301	88,173,845	19 G
国家/Country	3352	291,687,492	32 G	2301	88,173,845	19 G
城市/City	3352	291,687,492	32 G	2301	88,173,845	19 G

注：去除质量分数低于 20 和长度小于 100 bp 的序列

Note: Remove sequences with quality scores less than 20 and lengths less than 100 bp

2.2 OTU 聚类与系统发育树构建

以 Anaerobic Fungi Network (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>) 中下载的厌氧真菌 ITS1 参考数据库为参考序列，对上述 Clean data 进行有参聚类，按照 4 种不同比例进行有参聚类的分析，分析结果如表 1-2 所示，当选择 97% 的有参聚类时，OTU 数量相对较多，且总序列数占比较高，因此选择 97% 的有参聚类进行下一步分析。

以厌氧真菌 ITS1 参考数据库 (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>) 为参考，将各 OTU 代表序列进行系统发育分析，结果如图 1-1 所示。厌氧真菌 ITS1 序列聚类到 20 个属，97 个种。其中相同颜色的代表同一个厌氧真菌的属，同一个属的厌氧真菌不同种聚集在了一起，表现出了更近的系统发育距离。

在 13 个已经鉴定出的属中, 较多 OTUs 的代表性序列聚类到 *Neocallimastix* (18)、*Piromyces* (15)、*Feamyces* (10)、*Anaeromyces* (8)、*Capcomyces* (7), 而 *Agriosomyces* (1)、*Buwchfawromyces* (1)、*Joblinomyces* (1) 只有少量的 OTUs 代表性序列聚类。在一些新的属 (genus-eq) 的分类群中, 只有少数 OTUs 代表性序列聚类到 SK3 (2), RH2 (2), AL8 (2) 及 AL3 (3)。

表 1-2 不同百分比有参聚类的分析结果

	样本数	OTU 数	总序列数	比对序列百分比
	Sample number	OTU number	Total sequence	Alignment percent
99%有参聚类 /99% Parameter cluster	3352	104	15750875	17.86%
98%有参聚类 /98% Parameter cluster	3352	127	31204975	35.39%
97%有参聚类 /97% Parameter cluster	3352	136	36767924	41.70%
95%有参聚类 /95% Parameter cluster	3352	146	42378647	48.06%

注：有参聚类，参考数据库为厌氧真菌 ITS1 参考数据库 (<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>) Note:

There are reference alignment, and the reference database is the anaerobic fungi ITS1 reference database

(<https://anaerobicfunginetwork.wordpress.com>)

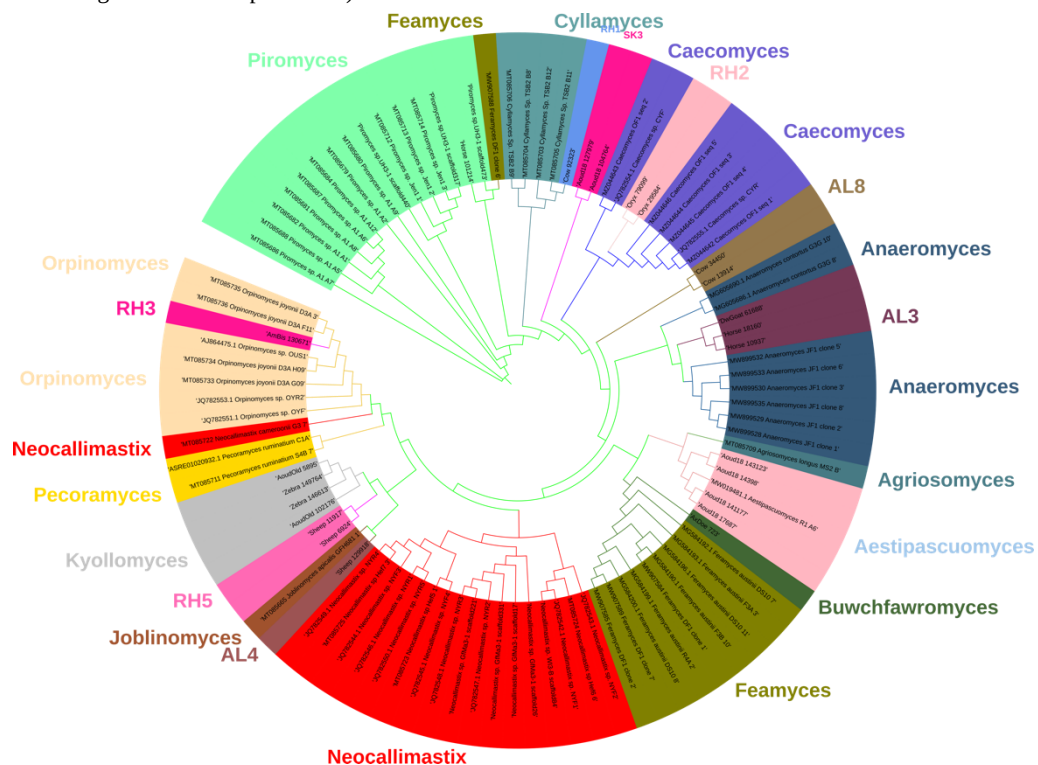


图 1-1 厌氧真菌系统发育树的构建

Figure 1-1 Phylogenetic analysis of anaerobic fungal ITS1 sequences

与已经分离培养的 20 个厌氧真菌属相比，本研究获得了 13 个已经分离培养的厌氧真菌属，有 7 个厌氧真菌属未被聚类，这 7 个厌氧真菌属如表 1-3 所示。这 7 个厌氧真菌除 *Oontomyces* 外，都为近 4 年内被分离鉴定的厌氧真菌，代表了在厌氧真菌新物种发现领域的最新进展，但由于厌氧真菌数据库的不完善，导致在有参聚类的方式下没有聚类到，这也表明目前厌氧真菌的分离鉴定工作仍存在不足。其中，*Oontomyces* 目前仅发现一株模式菌株 *Oontomyces* sp. SSD-C1B1，且已经死亡，因此关于厌氧真菌资源的开发与保护仍有许多工作要做。

表 1-3 未聚类厌氧真菌属的形态特征及分离源

Table 1-3 The characteristics of un-clustered anaerobic fungal genera				
属 Genus	形态学 Morphology	分离来源 Isolation source	首次分离时间 Isolation time	参考文献 Reference
<i>Oontomyces</i>	单中心，单鞭毛，丝状假根	印度骆驼瘤胃	2015	[99]
<i>Liebetanzomyces</i>	单中心，单鞭毛，丝状假根	山羊瘤胃	2018	[112]
<i>Aklioshbomyces</i>	单中心，单鞭毛，丝状假根	白尾鹿粪便	2019	[33]
<i>Capellomyces</i>	单中心，单鞭毛，丝状假根	布尔山羊粪便	2019	[33]
<i>Ghazallomyces</i>	单中心，多鞭毛，丝状假根	轴鹿粪便	2019	[33]
<i>Tahromyces</i>	单中心，单鞭毛，丝状假根	尼尔吉里塔尔羊粪便	2019	[33]
<i>Paucimyces</i>	多中心，单鞭毛，丝状假根	野生黑鹿羚羊粪便	2021	[8]

2.3 厌氧真菌多样性与生态分布特征

如表 1-4 所示，为清理过后的厌氧真菌样本 alpha 多样性分析结果（Shannon 指数，Evenness 指数，观测特征值，Faith pd）。在系统发育树构建中，我们共聚类到了 97 个 OUT，而样本的平均观测到的特征值只有 13.83 ±0.10，表明样本的多样性较低。

表 1-4 厌氧真菌样本的 alpha 多样性结果

Table 1-4 Alpha diversity of anaerobic fungal samples	
	清理数据 Clean data
Shannon 指数/Shannon index	1.22 ±0.01
Evenness 指数/ Evenness index	0.59 ±0.00
观测到的特征值/Observed features	13.83 ±0.10
Faith pd	2.22 ±0.00

如图 1-2 所示，为厌氧真菌多样性组成。其中占比最高的前五个厌氧真菌属为 *Neocallimastix*（80.16% ± 0.65%）、*Orpinomyces*（10.43% ± 0.47%）、*Pecoramyces*（2.37% ± 0.20%）、*Piromyces*（1.93% ± 0.17%）、AL8（1.34% ± 0.10%）。我们进一步统计了在样品中占比最高的前五个厌氧真菌种（表 1-5），结果显示，在 2301 个样本中出现占比最多的厌氧真菌种依次为 *Neocallimastix* sp. NYR3（2215，96.2%），*Neocallimastix* sp. NYR4（2191，95.2%），*Neocallimastix* sp. GfMa3-1（2174，94.5%），*Neocallimastix* sp. NYR1（2164，94%），*Neocallimastix* sp. Hef66（2153，93.6%）。

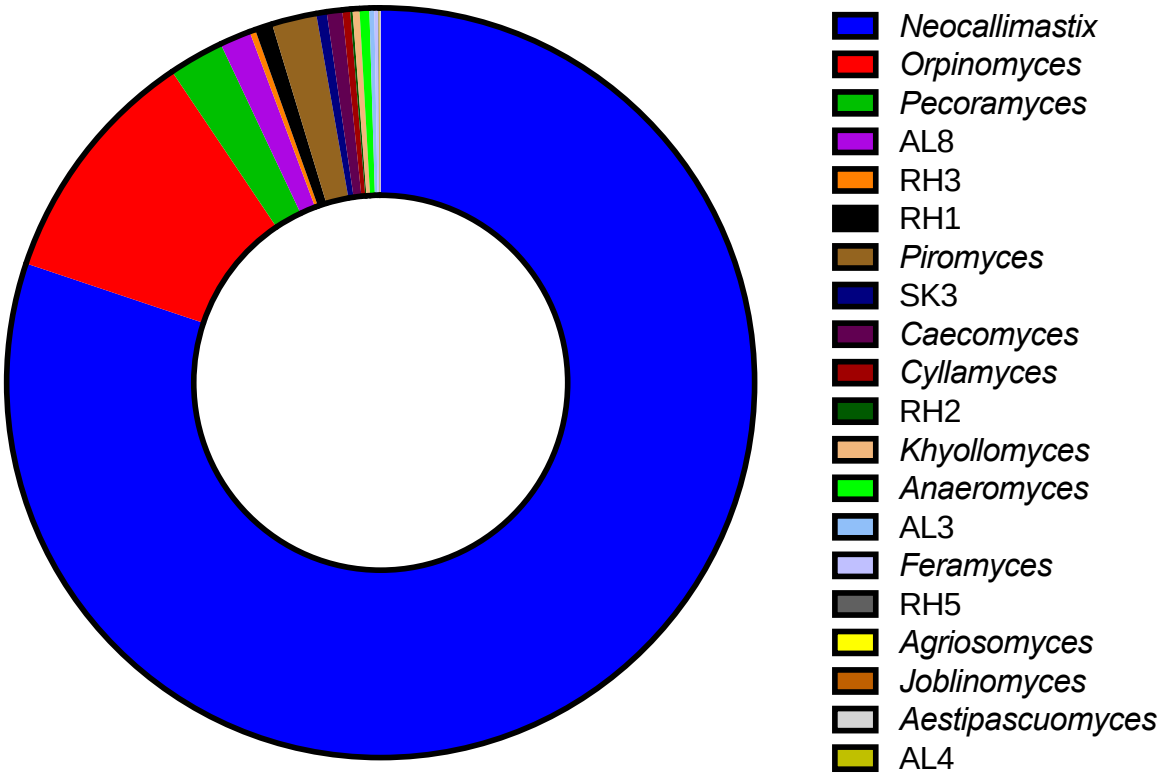


图 1-2 厌氧真菌的多样性组成
Figure 1-2 Diversity composition of anaerobic fungi

表 1-5 样本中高频次厌氧真菌种

Table 1-5 High-frequency anaerobic fungi species in the samples		
厌氧真菌种	样本数量	样本占有率
Anaerobic fungi species	Sample size	Sample occupancy
<i>Neocallimastix</i> sp. NYR3	2215	96.2%
<i>Neocallimastix</i> sp. NYR4	2191	95.2%
<i>Neocallimastix</i> sp. GfMa3-1	2174	94.5%
<i>Neocallimastix</i> sp. NYR1	2164	94%
<i>Neocallimastix</i> sp. Hef66	2153	93.6%

PcoA 结果显示（图 1-3，1-4），厌氧真菌的多样性受到地域因素（ $P = 0.001$ ），动物物种因素（ $P = 0.001$ ），采样位置因素（ $P = 0.001$ ），季节因素（ $P = 0.001$ ），日粮因素（ $P = 0.001$ ）以及驯养模式因素（ $P = 0.001$ ）的显著影响。

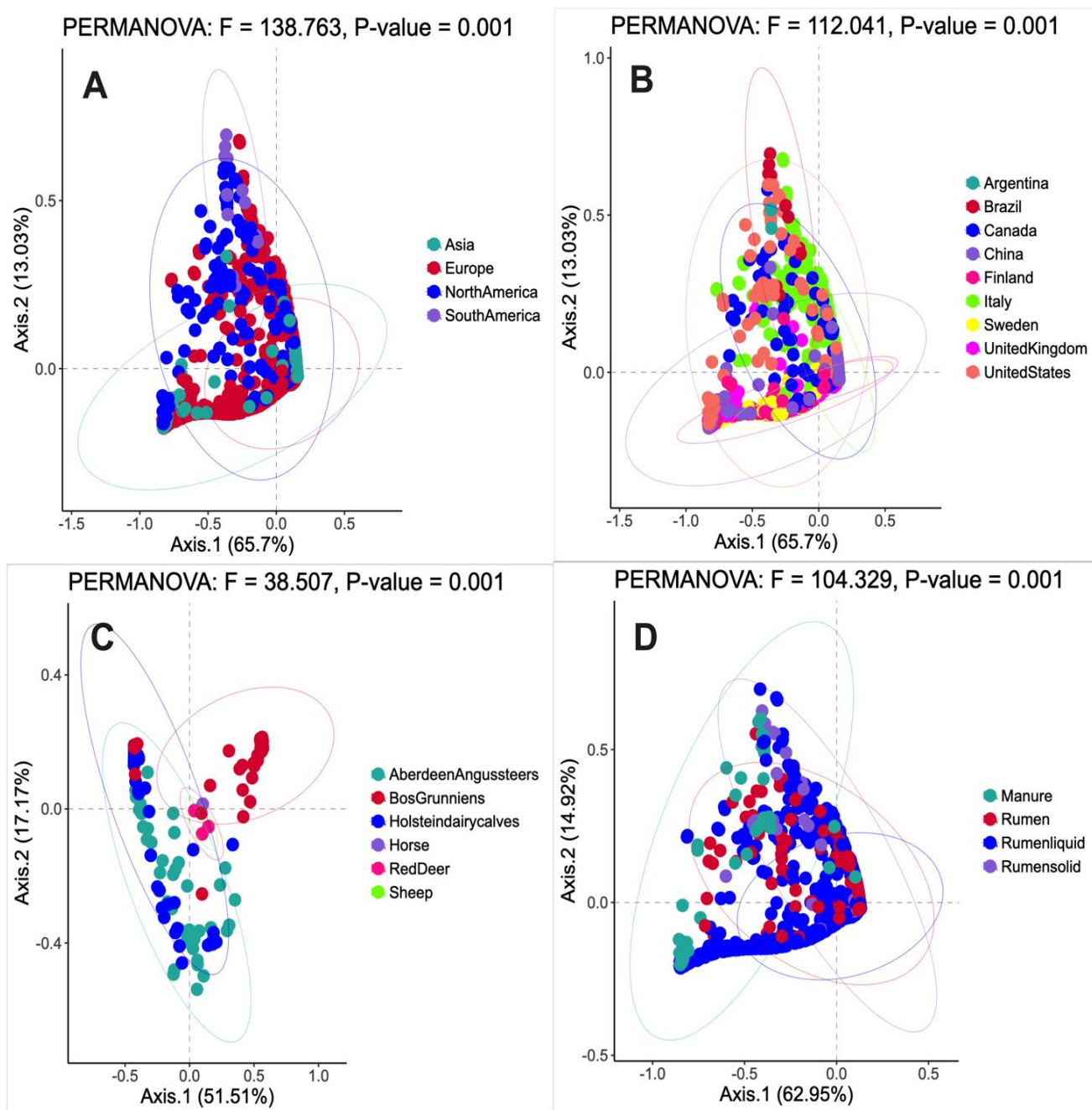


图 1-3 厌氧真菌的 PCoA 分析（A：大洲；B：国家；C：物种；D：采样位置）

Figure 1-3 PCoA analysis of anaerobic fungi (A: continents; B: country; C: species; D: sample location)

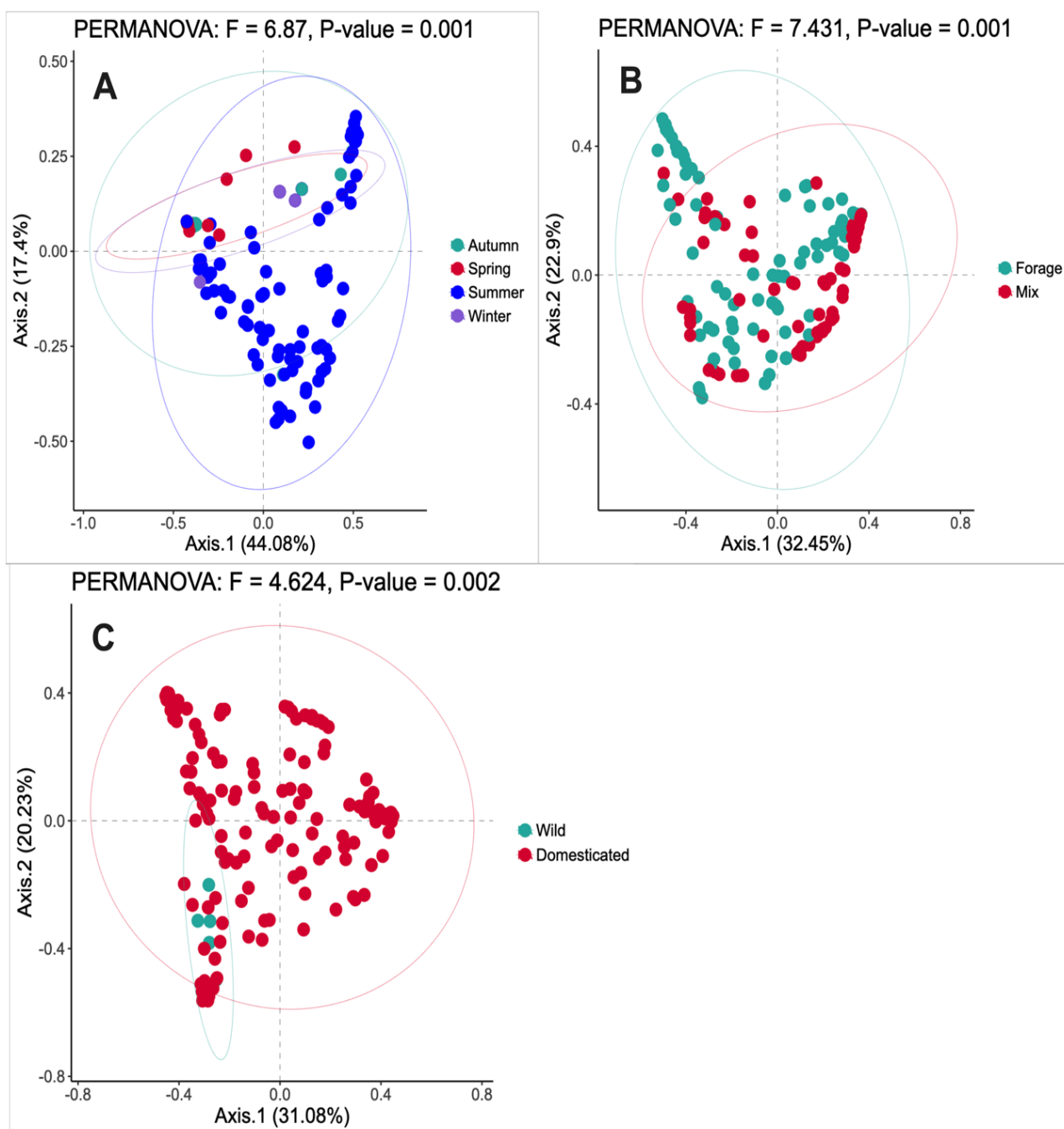


图 1-4 厌氧真菌的 PCoA 分析 (A: 季节; B: 日粮; C: 驯养模式)

Figure 1-4 PCoA analysis of anaerobic fungi (A: continents; B: country; C: species)

2.4 不同地区对厌氧真菌多样性的影响

表 1-6 为不同地区厌氧真菌的 α 多样性结果，结果表明不同地区显著影响厌氧真菌的 Shannon 指数 ($P < 0.05$)，Evenness 指数 ($P < 0.05$)，观测到的特征值

($P < 0.05$) 以及 Faith pd ($P < 0.05$)，其中北美洲的多样性最高，南美洲的多样性最低。

表 1-6 不同地区厌氧真菌的 alpha 多样性结果

Table 1-6 Alpha diversity of anaerobic fungi by regions					
	亚洲 Asia	欧洲 Europe	北美洲 North America	南美洲 South America	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
Shannon 指数 /Shannon index	1.87 ±0.07 ^b	2.19 ±0.01 ^b	2.68 ±0.06 ^a	1.52 ±0.23 ^c	< 0.05
Evenness 指数/ Evenness index	0.64 ±0.01 ^a	0.59 ±0.00 ^a	0.66 ±0.01 ^a	0.42 ±0.05 ^b	< 0.05
观测到的特征值 /Observed features	10.49 ±0.59 ^c	13.39 ±0.07 ^b	17.26 ±1.18 ^a	14.50 ±2.25 ^b	< 0.05
Faith pd	0.60 ±0.03 ^d	0.71 ±0.00 ^c	1.16 ±0.01 ^a	0.96 ±0.08 ^b	< 0.05

图 1-5 为厌氧真菌在大洲（A、C）及主要国家（B、D）的分布情况。在大洲和国家方面，尽管世界各地的气候条件和当地饲养动物品种不同，但世界各地厌氧真菌种类大致相同。但从相对丰度层面上看，不同地区的厌氧真菌占比不同，厌氧真菌组成结构存在较大差异，其中北美洲的厌氧真菌群落结构更为复杂，群落多样性更高，分布在北美洲的 *Aestipascuomyces*、*Cyllamyces*、RH1、SK3 的相对丰度显著高于其他地区，北美洲 *Neocallimastix* 相对丰度最高，而南美洲的厌氧真菌群落结构较为单一，同时不同厌氧真菌属的相对丰度之间差异较少，分布在南美洲的 *Piromyces*、*Pecoramyces*、*Caecomyces*、*Feramyces*、RH2 的相对丰度显著高于其他地区（ $P < 0.001$ ， $LDA > 2.0$ ）。亚洲和欧洲地区可能因为地理位置的接近，导致两个大洲厌氧真菌的群落组成大致相似，且相对丰度最高的前两个属都为 *Neocallimastix*（亚洲：47.3%；欧洲：86.1%）和 *Orpinomyces*（亚洲：37.9%；欧洲：8.6%）。其中，分布在欧洲的 *Neocallimastix* 相对丰度最高，而分布在亚洲的 *Oroinomyces*、*Anaeromyces* 和 AL8 相对丰度最高（ $P < 0.001$ ， $LDA > 2.0$ ）。厌氧真菌在不同国家的分布特征与所在大洲接近，在此不一一论述。

2.5 不同动物物种对厌氧真菌多样性的影响

表 1-7 为不同动物物种厌氧真菌的 alpha 多样性结果，结果表明不同动物物种显著影响厌氧真菌的 Shannon 指数（ $P < 0.05$ ），Evenness 指数（ $P < 0.05$ ），观测到的特征值（ $P < 0.05$ ）以及 Faith pd（ $P < 0.05$ ），其中绵羊的多样性最高，牦牛的多样性最低。

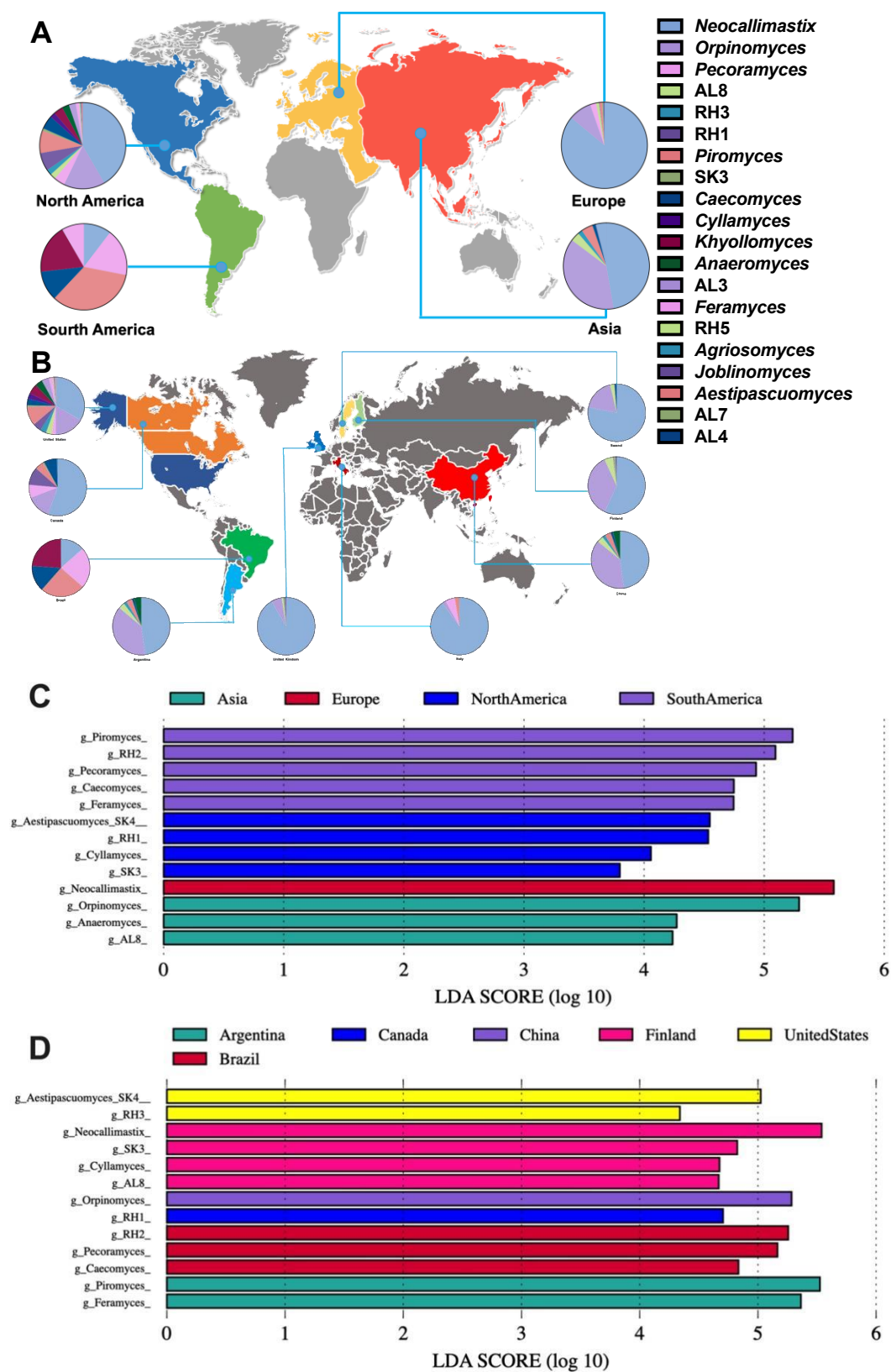


图 1-5 厌氧真菌在大洲（A、C）及主要国家（B、D）的分布

Figure 1-5 Distribution of anaerobic fungi on continents (A、C) and major countries (B、D)

表 1-7 不同动物物种厌氧真菌的 alpha 多样性结果

Table 1-7 Alpha diversity results of anaerobic fungi by animal species				
	Shannon 指数 /Shannon index	Evenness 指数 / Evenness index	观测到的特征值 /Observed features	Faith pd
安格斯牛/Aberdeen Angus Steers	3.07 ±0.05 ^b	0.67 ±0.01 ^b	23.72 ±0.33 ^b	1.18 ±0.01 ^b
马/Horse	2.17 ±0.00 ^c	0.68 ±0.00 ^b	9.00 ±0.00 ^d	0.96 ±0.00 ^c
荷斯坦奶牛/Holstein Dairy Calves	2.36 ±0.10 ^c	0.59 ±0.01 ^c	15.10 ±0.72 ^c	0.78 ±0.03 ^d
绵羊/Sheep	3.87 ±0.02 ^a	0.75 ±0.00 ^a	35.33 ±0.35 ^a	1.55 ±0.01 ^a
牦牛/Bos Grunniens	1.84 ±0.11 ^d	0.56 ±0.03 ^c	9.90 ±0.44 ^d	0.91 ±0.02 ^c
P 值/P value	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

在动物种类方面（图 1-6 、图 1-7），动物种类显著改变其体内厌氧真菌的分布情况，*Cyllamyces*、*Feramyces*、*Aestipasuomyces*、SK3 在绵羊中相对丰度最高，*Khyollomyces*、*Joblinomyces*、AL3、AL7 在马中相对丰度最高，同时表现出某种厌氧真菌-宿主选择关系，厌氧真菌 *Khyollomyces* 只存在于马这一品种。同时，荷斯坦奶牛，安格斯牛，牦牛虽然都属于牛属（*Bos*），在系统发育关系上有着更近的距离，但体内分布的厌氧真菌却存在显著差异（ $P < 0.05$ ， $LDA > 2.0$ ），在荷斯坦奶牛中，*Neocallistix*、*Piromyces*、*Agriosomyces* 相对丰度最高，在安格斯牛中，*Pecoramyces*、*Caecomyces* 相对丰度最高，而在牦牛中，*Orpinomyces*、*Anaeromyces* 相对丰度最高。

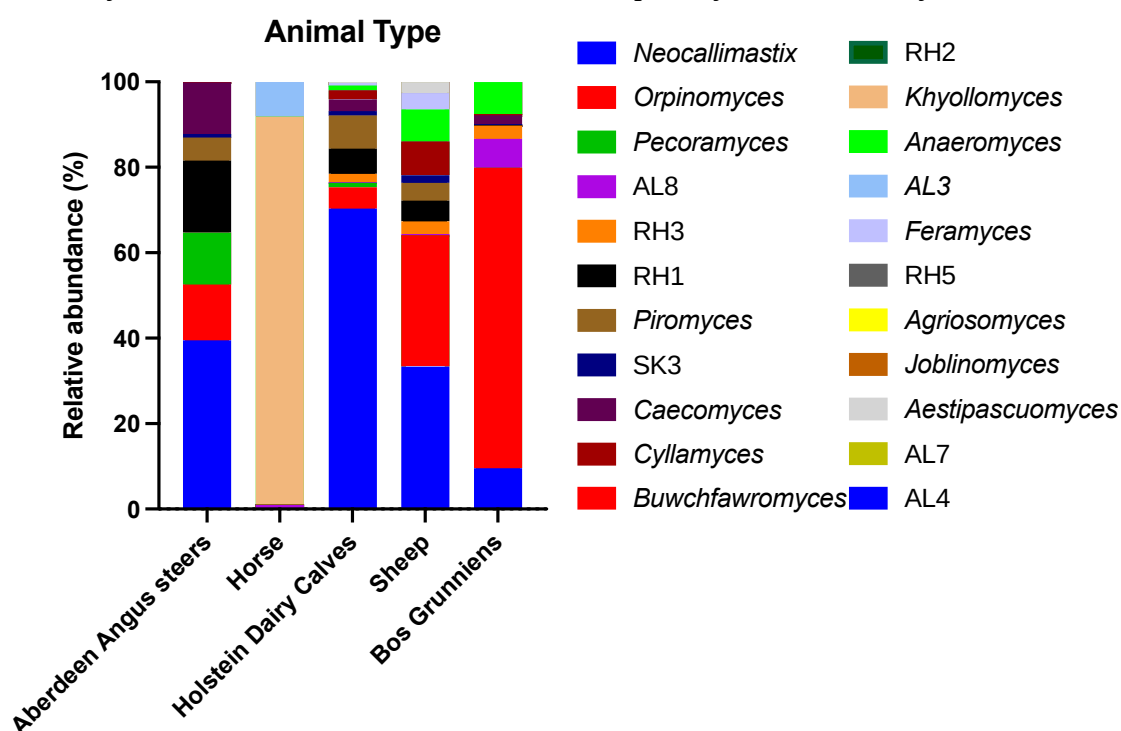


图 1-6 不同动物物种厌氧真菌的相对丰度

Figure1-6 Relative abundances of anaerobic fungi by animal species

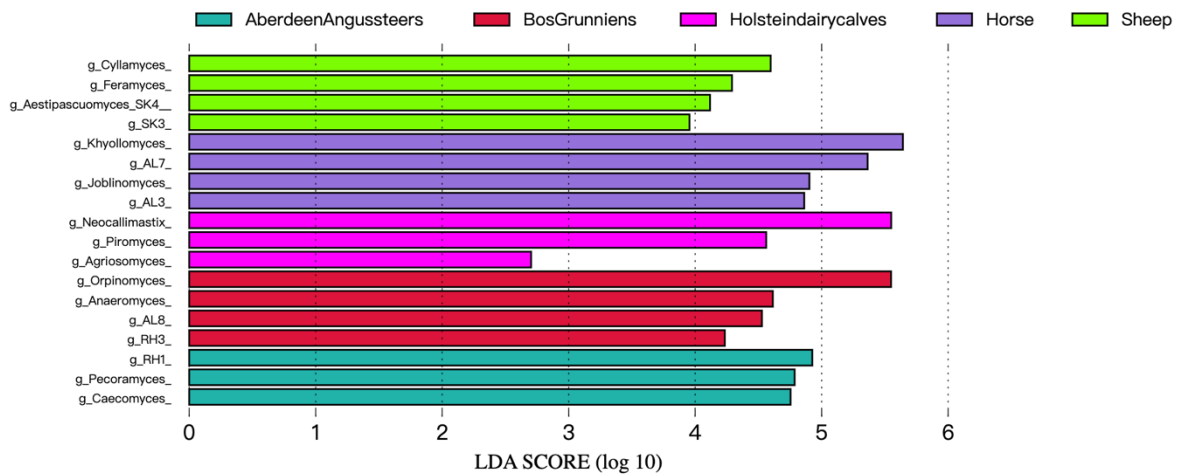


图 1-7 不同动物物种厌氧真菌的 LEfSe 分析

Figure 1-7 LEfSe analysis of anaerobic fungi by animal species

2.6 不同采样来源对厌氧真菌多样性的影响

表 1-8 为不同采样来源厌氧真菌的 alpha 多样性结果，结果表明不同采样来源显著影响厌氧真菌的 Shannon 指数 ($P < 0.05$)，观测到的特征值 ($P < 0.05$) 以及 Faith pd ($P < 0.05$)，其中瘤胃内容物的多样性最高，瘤胃液的多样性最低。

在采样来源方面，相对丰度结果显示（图 1-8），粪便中的厌氧真菌组成和瘤胃内容物（包括固体和液体）存在较大差异，LEfSe 分析进一步显示（图 1-9），粪便中分布中 *Khyollomyces*、*Joblinomyces*、*Anaeromyces*、*Caecomyces*、AL3、AL8、RH3 相对丰度最高，而瘤胃内容物中 *Cyllamyces*、RH1、RH2 相对丰度最高，瘤胃液中 *Neocallimastix* 和 *Agriosomyces* 相对丰度最高 ($P < 0.001$, $LDA > 2.0$)。

表 1-8 不同采样来源厌氧真菌的 alpha 多样性结果

Table 1-8 Alpha diversity of anaerobic fungi by sample sources				
	粪便 Manure	瘤胃内容物 Rumen solid	瘤胃液 Rumen liquid	P 值 P value
Shannon 指数/Shannon index	2.39 ± 0.11 ^b	2.53 ± 0.15 ^a	2.19 ± 0.01 ^c	< 0.05
Evenness 指数/ Evenness index	0.61 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.05	0.143
观测到的特征值/Observed features	16.17 ± 1.10 ^b	17.78 ± 1.53 ^a	13.36 ± 0.07 ^c	< 0.05
Faith pd	0.98 ± 0.04 ^a	0.95 ± 0.05 ^a	0.86 ± 0.06 ^b	< 0.05

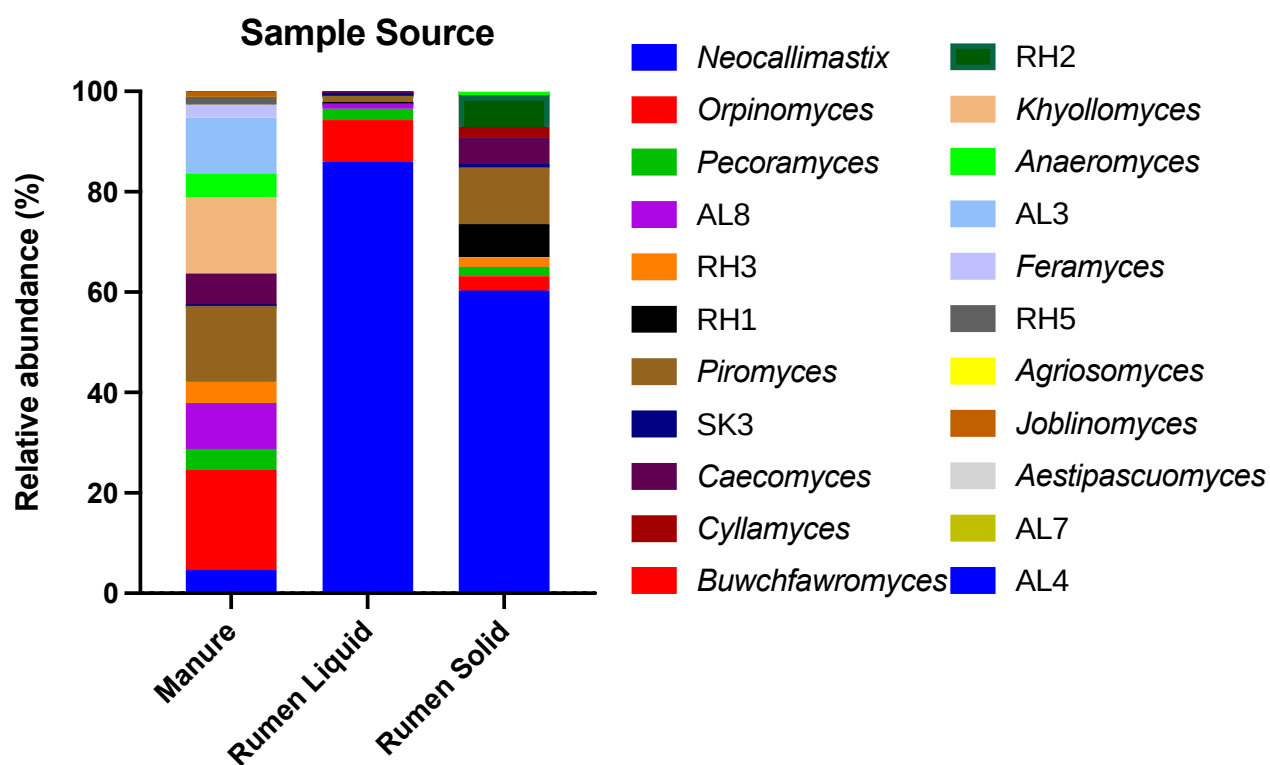


图 1-8 不同采样来源厌氧真菌的相对丰度

Figure1-8 Relative abundances of anaerobic fungi by sample sources

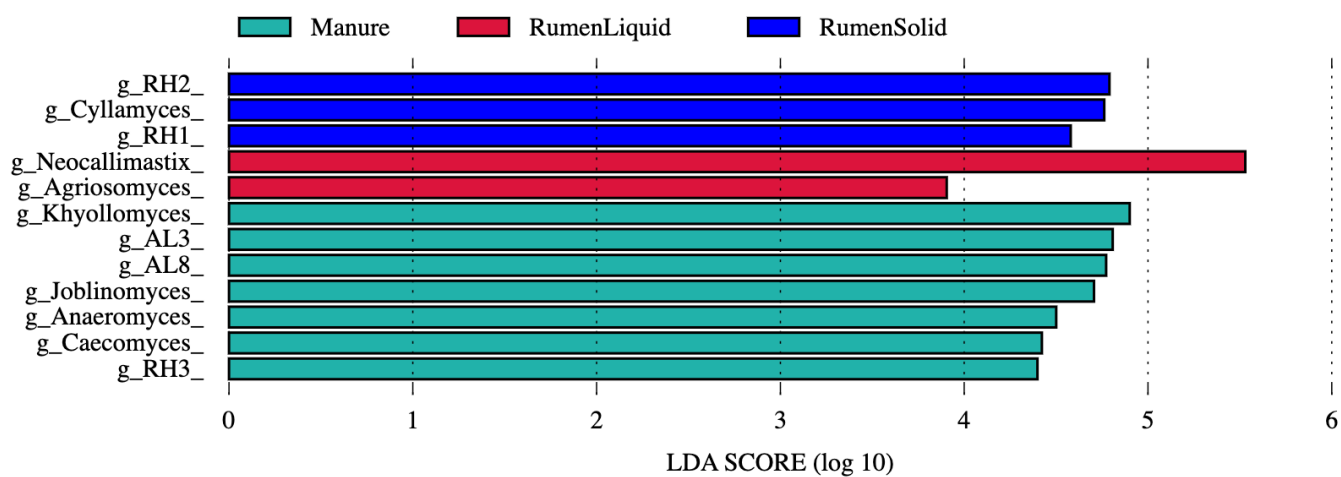


图 1-9 不同采样来源厌氧真菌的 LEfSe 分析

Figure 1-9 LEfSe analysis of anaerobic fungi by sample sources

2.7 不同饲喂模式对厌氧真菌多样性的影响

表 1-9 为不同饲喂模式厌氧真菌的 alpha 多样性结果，结果表明不同饲喂模式显著影响厌氧真菌的 Shannon 指数（ $P < 0.05$ ），Evenness 指数（ $P < 0.05$ ），其中驯养动物的多样性最高，野生动物的多样性最低。

表 1-9 不同饲喂模式厌氧真菌的 alpha 多样性结果

Table 1-9 Alpha diversity of anaerobic fungi by feed types			
	野生 Wild	驯养 Domesticated	P 值 P value
Shannon 指数/Shannon index	1.16 ± 0.30 ^b	2.42 ± 0.06 ^a	< 0.05
Evenness 指数/ Evenness index	0.37 ± 0.06 ^b	0.61 ± 0.02 ^a	< 0.05
观测到的特征值/Observed features	14.33 ± 2.42	16.17 ± 1.16	0.787
Faith pd	1.05 ± 0.19	0.98 ± 0.04	0.934

在饲喂模式方面，野生动物和驯养动物体内厌氧真菌组成差异较大，野生动物体内的厌氧真菌组成较为简单（图 1-10），这与 α 多样性分析结果一致。LEfSe 分析结果进一步显示（图 1-11），在驯养动物体内，*Neocallistix*，*Feramyces*，*Orpinomyces*，RH5 相对丰度最高，而在野生动物体内，*Piromyces*，*Khyollomyces*，*Joblinomyces*，AL3，AL7 相对丰度最高。

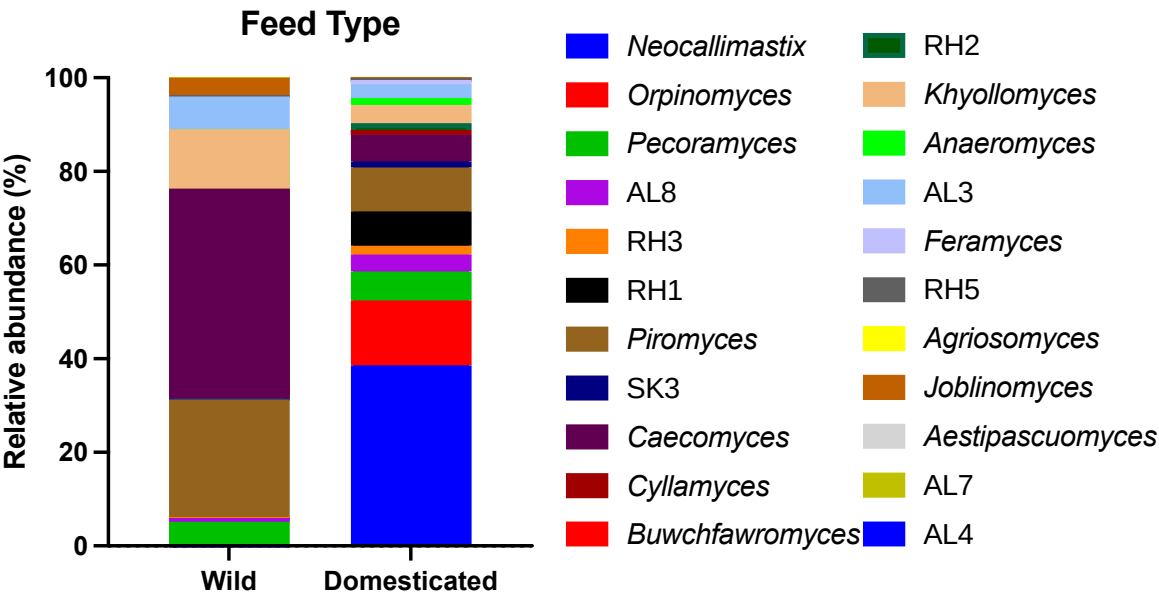


图 1-10 不同饲喂模式厌氧真菌的相对丰度

Figure1-10 Relative abundances of anaerobic fungi by feed types

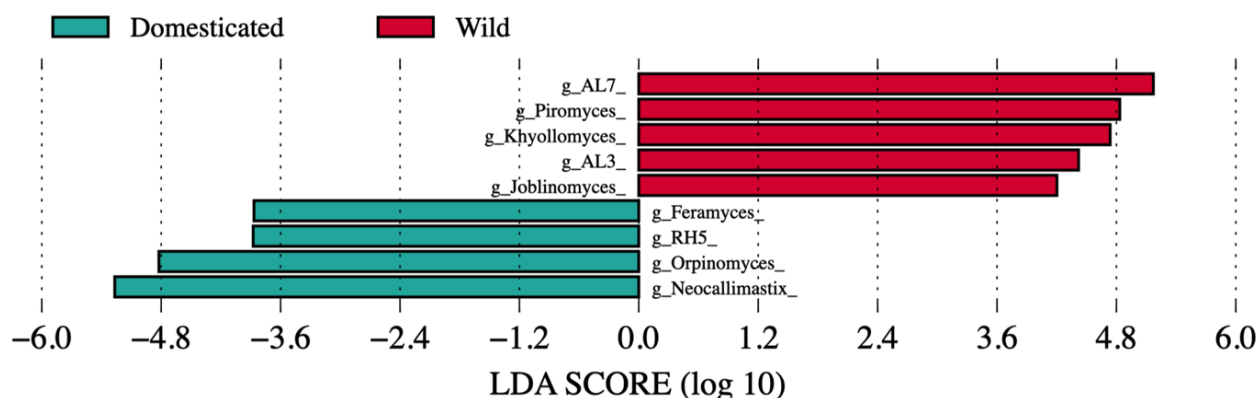


图 1-11 不同饲养模式厌氧真菌的 LEfSe 分析

Figure 1-11 LEfSe analysis of anaerobic fungi by feed types

2.8 不同日粮对厌氧真菌多样性的影响

表 1-10 为不同日粮厌氧真菌的 alpha 多样性结果，结果表明不同日粮显著影响厌氧真菌的 Shannon 指数 ($P < 0.05$)，观测到的特征值 ($P < 0.05$)，其中日粮为饲草的草食动物多样性最高，日粮为饲料的草食动物多样性最低。

图 1-12 为饲喂不同日粮的草食动物动物体内厌氧真菌组成，其中日粮为饲草和饲料的草食动物体内相对丰度最高的前两个厌氧真菌属均为 *Neocallimastix* 和 *Orpinomyces*。同时，随着草食动物日粮的改变，LEfSe 分析结果进一步表明（图 1-13），相同种类的厌氧真菌在日粮为饲草的草食动物体内占比更高 ($P < 0.05$, $LDA > 2.0$)，表明食用饲草有助于提高草食动物体内厌氧真菌的相对丰度，对于草食动物体内的厌氧真菌多样性具有重要意义。

表 1-10 不同日粮厌氧真菌的 alpha 多样性结果

Table 1-10 Alpha diversity of anaerobic fungi by diets

	饲草 Forge	饲料 Mix feed	P 值 P value
Shannon 指数/Shannon index	2.90 ± 0.08	2.33 ± 0.06	< 0.05
Evenness 指数/ Evenness index	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.467
观测到的特征值/Observed features	19.71 ± 1.62	17.73 ± 1.34	< 0.05
Faith pd	1.09 ± 0.05	1.07 ± 0.05	0.635

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/938031075130007023>