

## 仔猪结肠中产甲烷菌群多样性及其与环境因子的相关性

毛胜勇, 苏勇, 杨翠凤, 朱伟云

南京农业大学动物科技学院, 南京 210095

**摘要:** 【目的】为评价仔猪结肠中产甲烷菌群多样性及其与环境因子(日粮类型、断奶应激及日龄)的相关性。【方法】分别采集了7、14、21、24和35日龄仔猪结肠内容物,进行基因组总DNA的提取,运用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术分析各结肠样总DNA的产甲烷菌的PCR产物,同时研究了与甲烷生成相关的结肠内挥发性脂肪酸(Volatile fatty acid, VFA)的变化情况。【结果】结果表明,仔猪结肠内容物中乙酸、丙酸和总挥发性脂肪酸(Total volatile fatty acid, TVFA)浓度随日龄增加而显著升高( $P < 0.05$ ),但丁酸浓度未有显著性变化( $P > 0.05$ );基于Dice模式的UPGMA聚类分析的DGGE指纹图谱结果显示7-24日龄结肠样的产甲烷菌群落结构相似性较高,聚集到一个分支上;而35日龄的结肠样聚集到另一分支上;冗余分析(Redundancy analysis, RDA)结果表明,日龄和日粮类型与产甲烷菌群落结构的关联度较高;序列分析表明,仔猪结肠食糜中甲烷菌群主要以甲烷短杆菌为主,同时存在另一类未知甲烷菌。【结论】本研究表明,甲烷短杆菌是仔猪结肠中的优势产甲烷菌,日龄和日粮类型与仔猪结肠中产甲烷菌群落结构的相关性最强。

**关键词:** 仔猪, 结肠, 产甲烷菌, 变性梯度凝胶电泳, 冗余分析

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2011)10-1390-08

近年来,随着世界气候的持续变暖,极端天气的不断增多,人们对温室气体的生成及其调控愈加关注。长期以来,人们一直认为瘤胃产甲烷是动物养殖业中温室气体的主要来源,而一直忽视了单胃动物后肠甲烷生成,实际上,在我国,猪的养殖数量巨大,而猪每天甲烷产量在1.5 L左右<sup>[1]</sup>。因此,该部分温室气体的生成总量不容忽视。另一方面,产甲烷菌对维持猪后肠微生物的正常发酵有着重要作用。据报道,猪后肠中微生物菌群可发酵前肠未被消化或吸收的多糖与单糖,生成短链脂肪酸(主要是乙酸、丙酸和丁酸)和氢等初级发酵产物,产甲烷菌能够利用氢和二氧化碳生成甲烷,从而使肠道维

持较低的氢气压<sup>[2]</sup>,因此,VFA的种类与数量可明显影响产甲烷菌的种类与数量,也即影响产甲烷菌的群落结构。然而,国内目前尚无有关猪后肠产甲烷菌的种类与多样性的相关报道;国外在这方面的研究也很少,并且这些研究皆基于传统的分离培养技术,由于产甲烷菌高度厌氧,且一些微生物在体外难于培养,因此,当前人们对猪后肠中产甲烷菌的认识还相当有限<sup>[3]</sup>。近年来,随着分子生物学的发展,基因探针技术、16S rRNA基因序列分析等逐步被引入到微生物学的研究中,并已取得了巨大的成功,在这些分子生物学研究手段中,变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel

基金项目:国家自然科学基金(30810103909);农业部公益项目(200903003)

作者简介:毛胜勇(1973-),男,四川仪陇人,副教授,主要从事动物消化道微生物研究。Tel: +86-25-84395523; Fax: +86-25-84395314;

E-mail: maoshengyong@163.com

收稿日期:2011-03-25;修回日期:2011-05-15

Electrophoresis ,DGGE) 因可直接利用 DNA 及 RNA 对微生物遗传特性进行表征,不但避免了传统上耗时的菌种分离,而且能再现微生物群落遗传多样性和动态性,更可与 16S rRNA 基因序列分析结合,鉴定出无法利用传统方法分离出来的菌种,因而其已逐渐为学者们所接受,并成为动物消化道微生态研究中的有力手段。我们前期对成年猪的粪样中产甲烷菌的多样性进行了研究,发现成年猪粪样中优势产甲烷菌为甲烷短杆菌<sup>[4]</sup>;在此基础上,本文利用 PCR/DGGE 等分子生物学技术,系统地研究了 7-35 日龄(断奶后两周)仔猪结肠中产甲烷菌群的多样性及其变化规律,并研究了影响其种群结构的环境因素,拟进一步丰富人们对猪后肠产甲烷菌多样性的理论认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验动物及采样:** 实验于江苏宜兴生态养猪场进行,实验选择三窝产期相近、第二胎、窝仔数在 8-11 头杜×长×大初生仔猪(#1 #2 和#3),各窝仔猪及相应的母猪均单栏饲喂,仔猪在 0-20 日龄摄食母乳,21 日龄断奶,断奶后去母留仔,自由采食、饮水,试验猪不进行免疫,断奶前不饲喂开食料,断奶后日粮不含抗生素,日粮成分及主要营养价值见表 1。分别于 7、14、21、24 和 35 日龄,每窝随机屠宰仔猪一头,以无菌方法于冰面上收集结肠内容物,部分立即离心获取上清,备用于 VFA 的测定,部分于 -20℃ 保存,备用于 DNA 的抽提。

表 1 断奶仔猪的日粮组成及主要营养价值  
Table 1 Composition and the main nutrients values of the diet used for weaned piglets

Ingredient	g/Kg	Nutrients parameters	Content
Corn	569	Digestive energy (MJ/Kg)	13.58
Soybean meal	200	Crude protein (%)	19.21
Wheat bran	80	L-Lysine (%)	1.36
CaHPO <sub>4</sub>	12	Methionine (%)	0.59
Fat meal	36	Calcium (%)	0.82
Limestone	5	Phosphorous (%)	0.72
Fish meal	50		
Salt	3		
L-Lysine	5		
Premix	30		

### 1.1.2 主要试剂和仪器: 丙烯酰胺、尿素、过硫酸铵

(Ameresco 产品), Tris、EDTA、APS (Simpa, USA), 其他试剂国产。气相色谱仪(日本岛津公司), BeadBeater (Biospec, USA), 电泳系统 Power Pac1000、Dcode DGGE System、GelDoc XR System (Bio-Rad Laboratories, USA)。

### 1.2 VFA 的测定

参照秦为琳<sup>[5]</sup>方法,采用气相色谱法测定 VFA 浓度。

### 1.3 样品总 DNA 的提取与 PCR 反应

参照 Zoetendal 等<sup>[6]</sup>报道的珠磨法提取结肠内容物总 DNA。样品 0.2 g 与 1 mL TN150 (Tris-NaCl buffer) 和 150 μL 水饱和酚混合,在珠磨仪 (Mini-Bead Beater, Biospec, USA) 上 5000 r/min 珠磨 3 min 破碎样品。经三羟甲基氨基甲烷 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris) 饱和酚和氯仿/异戊醇反复抽提,用乙醇沉淀 DNA,加入适量 TE 缓冲液 (Tris-EDTA buffer) 溶解 DNA 沉淀。

产甲烷古菌的 DGGE 扩增引物对的序列为: GC-344F: CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCCGCGGGYGCAGCAGGCCGCGA; 519R: GWATTACCGCGCKGCTG<sup>[7]</sup>。反应体系为: 10 × 缓冲液, 5 μL; Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L), 3 μL; dNTP (10 mM), 0.6 μL; TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL), 0.6 μL; 1 μL 模板 (1-20 ng/μL), 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL; 加无菌水至 50 μL。PCR 反应条件如下: 94℃, 4 min 预变性; 94℃, 45 s; 65℃, 30 s (每个循环降 0.5℃); 72℃, 30 s, 循环 8 次; 94℃, 45 s; 62℃, 45 s (每个循环降 1℃); 72℃, 30 s, 循环 7 次; 94℃, 45 s; 56℃, 45 s; 72℃, 30 s, 循环 30 次; 72℃, 5 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 DGGE 与优势条带切胶回收、测序

参照 Muyzer 等<sup>[8]</sup>方法,对 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含丙酰胺、二丙酰胺、尿素、甲酰胺和甘油),尿素浓度梯度为 40% - 55%。电泳采用 Dcode DGGE 系统,首先在 200 V 电压下预电泳 10 min,随后在 85 V 的固定电压下电泳 12 h。电泳结束后,进行硝酸银染色,凝胶显色定影后用 GS-800 灰度扫描仪 (Bio-Rad) 扫描。DGGE 胶上主要的和特异的条带用洁净的刀片和枪头切下移入 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 无菌水,室温过夜后,进行 PCR 扩增,扩增产物经纯化后测序,

所得序列于 GenBank 上比对寻找最相似菌。

### 1.5 序列分析及进化树建立

用 Blast 软件在 GenBank 数据库中 (网址: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 获取同源性较高的相关菌株和已知产甲烷菌的 16S rRNA 基因序列, 用 ClustalX 程序进行比对排序, 采用分子进化遗传分析软件 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 4.1, MEGA 4.1) 建立进化树。

### 1.6 数据分析

**1.6.1 挥发性脂肪酸分析处理:** 采用 SPSS (13.0) 软件的单因子方差分析模块对 VFA 数据进行方差分析, 显著性水平置于 0.05。

**1.6.2 DGGE 电泳图谱分析:** 使用 Gelcompar (6.0) 软件对 DGGE 电泳图谱进行分析, 在条带基础上, 进行 UPGMA 聚类分析不同样品间细菌群落结构的相似性。

**1.6.3 猪结肠微生物多样性与环境因子 (断奶应激 (针对 24 日龄)、日龄和日粮类型 (7-21 日龄为哺乳, 且不喂开食料, 21 日龄后采食饲料)) 的相关性分析:** 运用生物统计学软件 Canoco for windows (Version 4.5) 对 DGGE 图谱各条带对应的峰高的数据进行冗余分析 (RDA), 研究各个结肠中微生物多样性与环境因子的相关性。分析过程中, 对 DGGE 图谱各条带对应的峰高值进行了标准化处理。

## 2 结果和分析

### 2.1 仔猪肠道 VFA 的变化情况

由表 2 可见, 在 7-35 日龄中, 各日龄间的仔猪结肠中乙酸、丙酸与 TVFA 浓度存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 丁酸浓度在 21、24 和 35 日龄三时间点上未见有显著性变化 ( $P > 0.05$ )。

表 2 仔猪在 7-35 日龄内结肠内容物中 VFA 浓度变化

Table 2 The changes of the VFA concentration in the colonic contents of piglets from 7 day to 35 days

	7 day	14 day	21 day	24 day	35 day	S. E. M	P value
Acetate (mmol/mL)	13.31	14.51	22.56	26.03	32.92	2.333	0.011
Propionate (mmol/mL)	5.98	7.44	9.45	12.83	17.10	1.164	<0.001
Butyrate (mmol/mL)	2.22	3.33	5.15	4.17	5.15	0.408	0.077
TVFA (mmol/mL)	21.51	25.28	37.16	43.02	55.17	3.751	0.004

### 2.2 DGGE 图谱及其分析

不同日龄仔猪结肠产甲烷菌 DGGE 图谱如图 1-A 所示, 与 7、14 日龄时相比, 在断奶当日 (21 日龄时), DGGE 上的优势条带并没有发生变化, 在断奶后 3 天 (24 日龄) 也未有明显变化, 但是在 35 日龄时, DGGE 图谱上的条带数明显增加, 并且出现一些新的优势条带。通过 UPGMA 算法对各个日龄进行聚类分析, 生成系统进化树, 如图 1-B 所示, 15 个结肠样分成了 6 个族群, 其中 7-24 日龄结肠样品位于一个大的族群中, 相互间的相似系数在 74.9%; 而 35 日龄样品在另一族群中, 与 7-24 日龄样品的相似性仅为 58%。

### 2.3 结肠中产甲烷菌菌群结构与环境因子的相关性分析

运用冗余分析 (RDA) 将 DGGE 图谱的数字化结果和环境因子指标结合在一起分析, 结果概括于表 3。本文以断奶应激、日龄和日粮类型这 3 项指标来表征各个结肠样微生物菌群变化的环境因子情况, Monte Carlo per-mutation test 显示 3 个特征参数

与 AX1 轴 ( $P: 0.002$ ) 及全部排序轴 ( $P: 0.004$ ) 均有显著的相关性。表 3 显示第 1 排序轴解释了样本中 70.4% 的变异, 第 2 和第 3 排序轴分别解释了样本中 4.4% 和 1.5% 的变异。第 1 和第 2 排序轴的种-环境相关系数分别为 0.998 和 0.838, 这说明结肠中微生物群落结构与环境因子间存在较强的关联。从排序图上 (图 2) 明显反映出 14 种不同的甲烷菌对三种环境因子的不同特点。对于环境因子来讲, 第一、第二排序轴间的相关系数都为 0, 说明排序结果是可信的。第一排序轴与日龄值呈正相关 (0.6693), 与日粮类型 (哺乳或采食固体饲料) 呈正相关 (0.584), 与断奶应激呈负相关 (-0.2794), 结果说明日龄与摄食食物种类对甲烷菌影响较大, 而断奶应激对其影响较小。

### 2.4 序列比对结果

将条带切胶测序以后, 用 Blast 软件在 GenBank 数据库中 (网址: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 获取同源性较高的相关菌株得到的结果见表 4 所示, 结果表明, 条带 1 和 2 的最相似已知菌都是

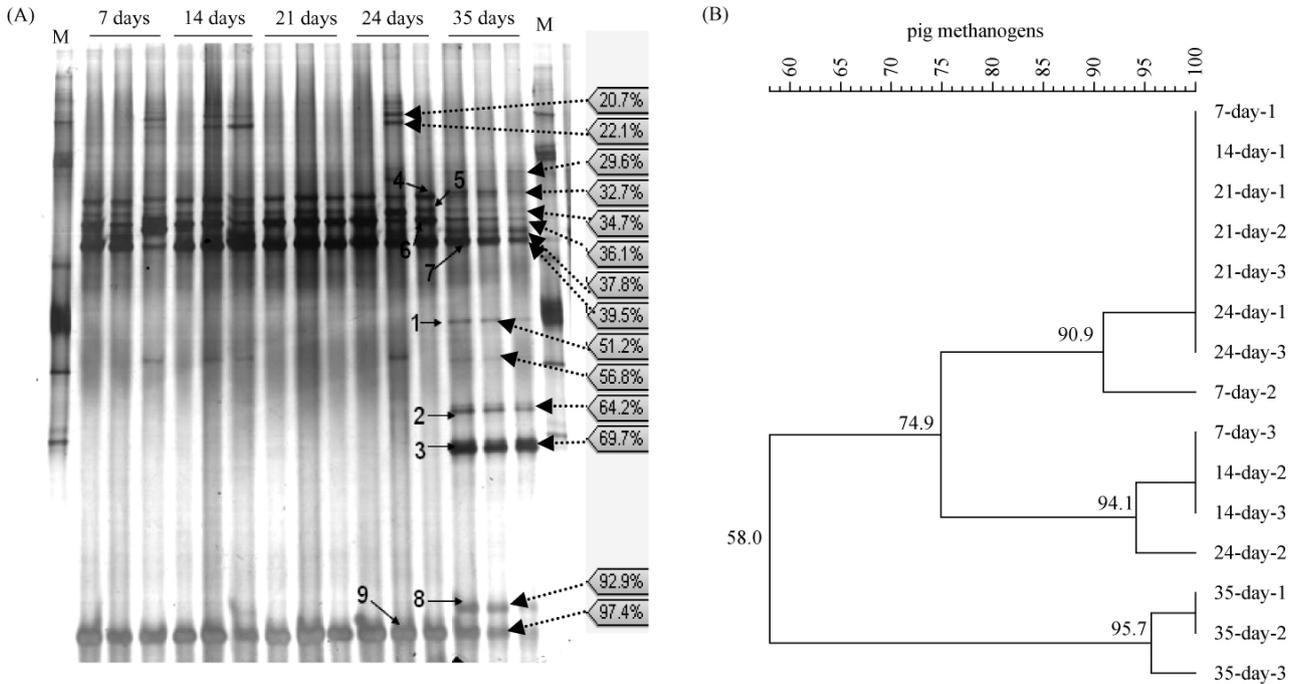


图 1 仔猪结肠产甲烷菌 DGGE 图谱 (A) 及其相似性分析 (B) (1-9 代表切胶测序条带 20.7、22.1 和 29.6 等数据代表各条带在 DGGE 胶上的相对位置)

Fig. 1 Denaturing gradient gel electrophoresis profiles and its similarity analysis of methanogens in colonic contents. \* 1-9 represented the different bands, and the data of 20.7, 22.1 or 29.6 represent the relative position of band in DGGE profiles.

表 3 冗余分析结果

Table 3 Summary of the results of RDA

Items	AX1	AX2	AX3
Eigenvalues	0.704	0.044	0.015
Species-environment correlations	0.998	0.838	0.364
Cumulative percentage variance of species data	70.4	74.8	76.3
Cumulative percentage variance of species-environment relation	92.2	98	100

*Aciduliprofundum boonei* 相似性分别为 71% 和 88% ; 条带 3 最相似已知菌是 *Methanobrevibacter* sp. AbM4 相似性为 93% ; 条带 4, 6, 9 的最相似已知菌皆为 *Methanobrevibacter* sp. WBY1, 相似性分别是 98%、95% 和 100% ; 条带 5 的最相似已知菌是 *Methanococcoides methylutens*, 相似性为 73% ; 条带 7 的最相似已知菌是 *Methanobrevibacter millerae*, 相似性为 97% ; 条带 8 的最相似已知菌为 *Methanosphaera stadtmanae*, 相似性为 78% 。

2.5 猪结肠产甲烷古菌系统进化分析

产甲烷菌都属于广域古菌界 (Euryarchaeota), 因此选择嗜泉古菌界 (Crenarchaeota) 的 *Sulfolobus acidocaldarius* (登录号 U05018) 和 *Thermoproteus*

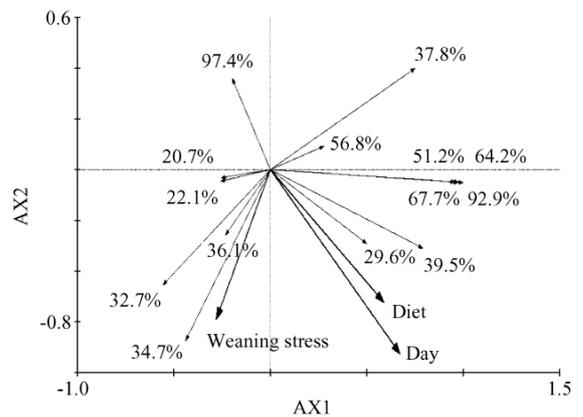


图 2 甲烷菌群结构与环境因子间的关系 (20.7、22.1 和 29.6 等数据代表各条带在 DGGE 胶上的相对位置)

Fig. 2 The relationship between the methanogenous community and the environmental factor (the data of 20.7, 22.1 or 29.6 represent the relative position of band in DGGE profiles).

*tenax* (登录号 M35966) 作为外类群 (Outgroup), 用邻接法构建系统发育树 (图 1-1), 拓扑分析为 1000 次重复取样的结果。由图 3 可见, 这些克隆位于两大分枝上。序列 3, 4, 6, 7, 8, 9 在一个分枝上, 属于甲烷杆菌纲 (Methanobacteria), 其余序列 1, 2, 5 归

表 4 产甲烷菌克隆及其最相似菌

Table 4 Methanogen clones, with percentage of similarity to known sequences in GenBank and sequence length, were retrieved from colonic contents of piglets

	Closest known relatives	Similarity / %	Accession No.
1	<i>Aciduliprofundum boonei</i>	71	HQ392858
2	<i>Aciduliprofundum boonei</i>	88	HQ392859
3	<i>Methanobrevibacter</i> sp. <i>AbM4</i>	93	HQ392860
4	<i>Methanobrevibacter</i> sp. <i>WBY1</i>	98	HQ392861
5	<i>Methanococcoides methylutens</i>	73	HQ392862
6	<i>Methanobrevibacter</i> sp. <i>WBY1</i>	95	HQ392863
7	<i>Methanobrevibacter millerae</i>	97	HQ392864
8	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	78	HQ392865
9	<i>Methanobrevibacter</i> sp. <i>WBY1</i>	100	HQ392866

为一个分枝上,属于未知的产甲烷古菌,与甲烷细菌纲的甲烷八叠球菌属进化距离较近 (*Methanosarcina*)。

### 3 讨论

产甲烷菌是猪后肠中一类固有菌群,但对其菌群结构与影响因素仍不清楚。Christensen 等<sup>[9]</sup>报道,甲烷菌是猪肠道中一类非常普通的微生物,而仅一半的人体内有产甲烷菌。Butine 和 Leedle 发现,猪结肠中的甲烷菌数量是盲肠中的 30 倍,结肠是猪消化道内甲烷生成的主要场所<sup>[10-12]</sup>。因此,结肠可能是猪消化道内产甲烷的代表性器官;但人们目前对产甲烷菌的多样性的认识主要源于猪粪便中甲烷菌。Sorlini 等<sup>[2]</sup>利用最大可能计数法 (Most probable number method, MPN),研究了儿种不同动物粪便中的产甲烷菌数量,发现猪粪便中的产甲烷菌数量显著高于人、牛和兔子;Miller 和 Wolin<sup>[13]</sup>从猪的粪便中分离到一株甲烷短杆菌;我们利用克隆测序手段,发现成年猪粪便中产甲烷菌主要是甲烷短杆菌<sup>[4]</sup>。但目前人们并不清楚猪结肠中产甲烷菌群结构的多样性及其影响因素。

DGGE 指纹技术是一种目前已被广泛用于各种生态系统中的菌群研究的分子手段,该技术最大的优点就是能够很直观地观察到各种菌群的变化,并且结合序列分析等技术能够对某些特殊的条带进行鉴定。本试验采用一对产甲烷古菌的特异性引物 344F/519R 对样品中的产甲烷古菌的 16S rRNA 基

因序列进行 PCR 扩增,并且利用 DGGE 对扩增产物进行了分析,结果显示,仔猪在断奶前后,产甲烷菌群未发生显著变化。断奶后两周,产甲烷菌种类明显增多,但是断奶之前的优势条带并未消失。结果说明,产甲烷菌群是仔猪后肠中一类非常稳定的微生物菌群。对优势条带测序分析发现,在所得的 9 条带中,有 6 条属于甲烷杆菌纲,其他 3 条属于一类未知的产甲烷古菌,但与甲烷八叠球菌属距离较近。结果说明,仔猪在哺乳期间,后肠的产甲烷菌以甲烷杆菌为主,断奶之后未知甲烷菌种类增多。

研究表明,应激、日龄及日粮结构等是影响动物肠道微生物区系结构的主要因素<sup>[14-15]</sup>,在本研究的 7-21 日龄期间,乳猪依靠哺乳,食物未有变化,因此,在稳定的日粮环境中,产甲烷菌由于结肠中环境和获得的底物稳定,其群落结构也表现稳定。在断奶后,结构性碳水化合物成为后肠微生物发酵的主要底物,因此,断奶前后结肠内微生物发酵底物发生了改变,但从 DGGE 图谱数据来看,产甲烷菌群结构变化滞后于日粮结构的改变,究其原因,可能与甲烷菌的生长特性相关,相关报道<sup>[16]</sup>显示,产甲烷菌的生长相当缓慢,即代时较长,尤其是能利用乙酸为底物的种类需要的代时更长,随着仔猪日粮结构的改变,结肠食糜中乙酸、丙酸及 TVFA 数量显著增加,利用乙酸的产甲烷菌的种类获得乙酸的机会有所增加,但要在原有的产甲烷菌群落中占有一定比例需要相当时日;同时,从 DGGE 图谱与环境因子的相关分析结果来看,日龄与产甲烷菌群结构组成的相关性最高,日粮类型次之,而断奶应激对甲烷菌群结构的影响非常小;结果也进一步证实,结肠中产甲烷菌群的结构非常稳定,日粮等环境因子对其结构的影响必须在一段时间后方能充分体现。

综上,仔猪从哺乳至断奶后两周期间,结肠食糜中乙酸、丙酸及 TVFA 数量显著增加,结肠中产甲烷菌以甲烷杆菌为主,在 7-24 日龄内结肠内甲烷菌群结构保持稳定,在日龄、断奶应激与日粮类型三者间,日龄与日粮类型是影响猪结肠产甲烷菌群结构的主要因素。

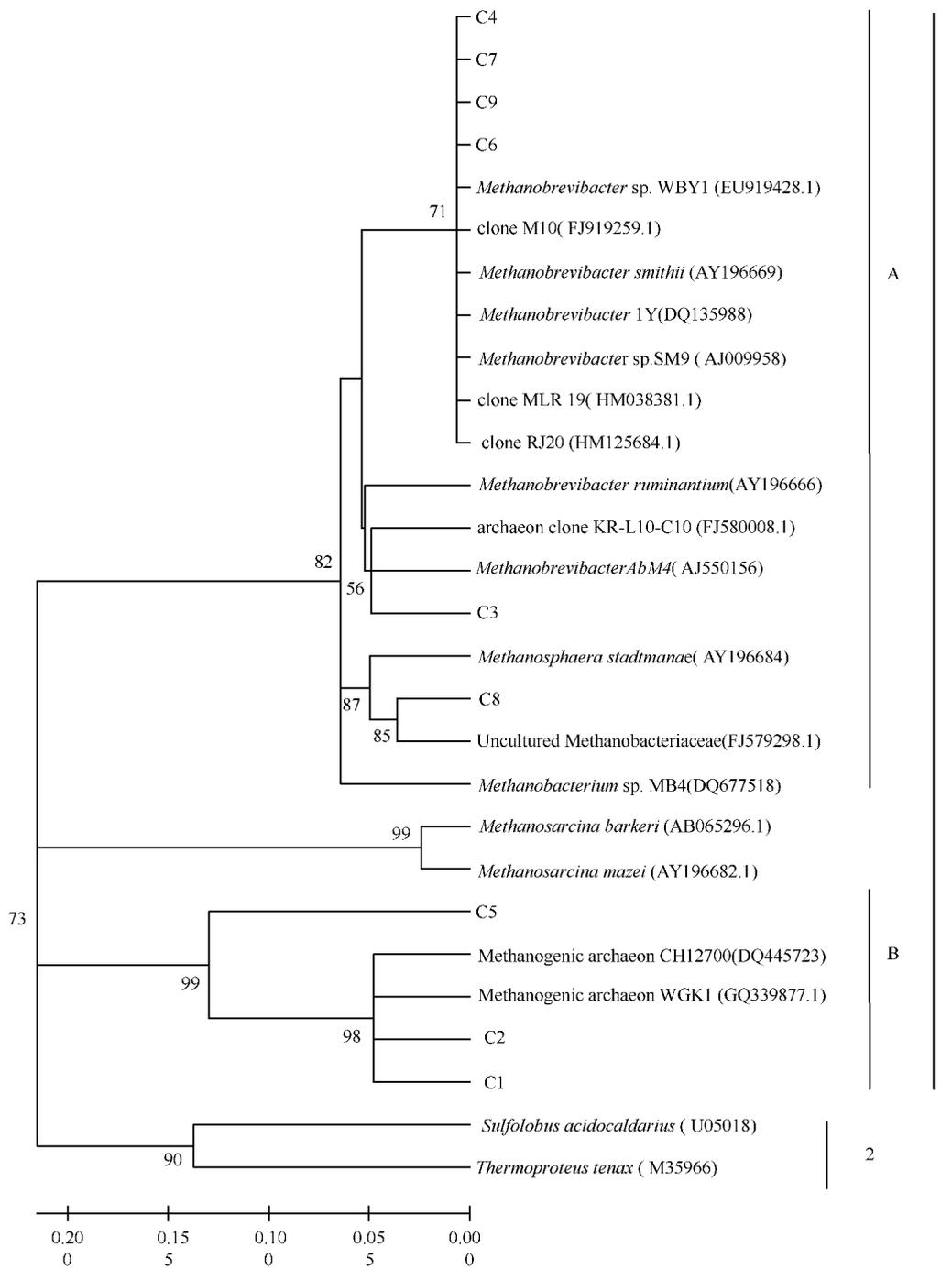


图3 猪结肠产甲烷菌 16SrRNA 基因序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of methanogen 16SrRNA gene clones from colonic contents of piglets. 1-Euryarchaeota; 2-Crenarchaeota; A-Methanobacteria; B-novel group of uncultivated archaea.

## 参考文献

- [ 1 ] Monteny GJ , Groenestein CM , Hilhorst MA. Interactions and coupling between emissions of methane and nitrous oxide from animal husbandry. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* , 2001 , 60: 123-132.
- [ 2 ] Mason VC. Microbial digestion in the hind-gut of the pig. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (Suppl) , 1983 , 25: 27-38.
- [ 3 ] Sorlini C , Brusa T , Ranalli G , Ferrai A. Quantitative determination of methanogenic bacteria in faeces of different mammals . *Current Microbiology* , 1988 , 17: 33-36.
- [ 4 ] Mao SY , Yang CF , Zhu WY. Phylogenetic analysis of methanogens in the pig feces. *Current Microbiology* , 2011 , 62(5) :1386-1389.
- [ 5 ] 秦为琳. 应用气相色谱法测定挥发性脂肪酸的改进. 南京农学院学报 ( *Journal of Nanjing Agricultural College* ) , 1982 5:110-116.
- [ 6 ] Zoetendal EG , Akkermans ADL , De Vos WM. 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 ] Yu Z , García-González R , Schanbacher FL , Morrison M. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* , 2008 , 74(3) :889-893.
- [ 8 ] Muyzer G , de Waal EC , Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA . *Applied and Environmental Microbiology* , 1993 , 59: 695-700.
- [ 9 ] Christensen K , Thorbek G. Methane excretion in the growing pig. *British of Journal Nutrition* , 1987 , 57(3) : 355-361.
- [10] Franz R , Soliva CR , Kreuzer M , Hummel J , Claus M. Methane output of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) fed a hay-only diet: implications for the scaling of methane production with body mass in non-ruminant mammalian herbivores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* , 2011 , 158(1) :177-181.
- [11] Jensen BB , Jørgensen H. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Applied and Environmental Microbiology* , 1994 , 60(6) :1897-1904.
- [12] Robinson JA , Smolenski WJ , Ogilvie ML , Peters JP. *In vitro* total-gas , CH<sub>4</sub> , H<sub>2</sub> , volatile fatty acid and lactate kinetics studies on luminal contents from the small intestine , caecum , and colon of the pig. *Applied and Environmental Microbiology* , 1989 , 55: 2460-2467.
- [13] Miller TL , Wolin MJ. Methanogens in human and animal intestinal tracts. *Systematic and Applied Microbiology* , 1986 , 7:223-229.
- [14] 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 ( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2003 43(4) : 503-508.
- [15] Konstantinov SR , Favier CF , Zhu W-Y. Microbial diversity study of the porcine GI tract during the weaning transition . *Animal Research* , 2004 , 54: 317-324.
- [16] Hook SE , Wright AD , McBride BW. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* , 2010 30: 1-8.

## Methanogen diversity in the piglet colon and its correlation with environmental factors

Shengyong Mao<sup>\*</sup>, Yong Su, Cuifeng Yang, Weiyun Zhu

College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** [objective] We investigated the correlation between the methanogen diversity in the piglet colon and the environmental factor (weaning stress, diet type and age). [Methods] The colonic contents of piglets at 7, 14, 21, 28 and 35 days old were collected for the determination of volatile fatty acids and total DNA extraction. DNA was subject to PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) analysis and interesting bands were excised and sequenced. Redundancy analysis (RDA) was performed for the correlation between methanogen diversity and environmental factors. [Results] As the piglets grew, acetate, propionate and the total volatile fatty acid production increased significantly ( $P < 0.05$ ), but butyrate concentration remained stable ( $P > 0.05$ ). The similarity indices of DGGE profiles was higher during the period of the 7 day to 24 day after birth, with grouped in one cluster, and the samples from the 35 days were dropped into another cluster. DGGE analysis showed three dominant bands appeared in samples of 35 d old, with their 16S rRNA gene sequences closely related to *Methanobacteria* and a novel group of uncultivated Achaean. Redundancy analysis (RDA) showed that age has the largest relevance to the community structure of bacteria in colonic samples, followed by the diet type. [Conclusion] The results indicated that the methanogen community in the piglet colon was stable during the first 24 days after birth, and became more diverse at 35 days of age. The methanogens community was mainly affected by age and the diet type.

**Keywords:** piglets, colon, methanogens, denaturing gradient gel electrophoresis, redundancy analysis

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30810103909) and by the Research and Development Special Fund for Public Welfare In Agriculture of China (200903003)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: maoshengyong@163.com

Received: 25 March 2011/Revised: 15 May 2011