反刍动物瘤胃原虫的分离培养与形态学分析

Separation and Morphological Analysis of Protozoa from Rumen Contents

高健，甄永康，王梦芝*，王洪荣

动物科学与技术学院，扬州大学，扬州，江苏

*通讯作者邮箱: mengzhiwangyz@126.com

引用格式：高健，甄永康，王梦芝，王洪荣. (2021). 反刍动物瘤胃原虫的分离培养与形态学分析. Bio-101 e2003581. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003581.

How to cite: Gao, J., Zhen, Y. K., Wang, M. Z. and Wang, H. R. (2021). Separation and Morphological Analysis of Protozoa from Rumen Contents. Bio-101 e2003581. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003581. (in Chinese)

摘要：反刍动物瘤胃中含有大量原虫，其在保持瘤胃微生态环境稳定、促进饲料分解与发酵等方面起着重要的作用。瘤胃原虫主要有内毛属、双毛属、等毛属、头毛属、前毛属和坚甲属，其胞核的数量与形态是分类的重要标志。本文介绍了在厌氧工作站中，先通过显微镜进行原虫细胞分选，再培养瘤胃原虫，最后在显微镜下对瘤胃原虫进行形态学分析。

关键词：瘤胃原虫，微生物分离，形态学分析

材料与试剂

1. 16 × 150 mm 培养管 (配备橡胶塞)
2. 毛细吸管
3. 大口径吸管
4. 载玻片
5. 纱布
6. CO_2 气体，纯度为 99.999%
7. 磷酸氢二钾，K_2HPO_4
8. 磷酸二氢钾，KH_2PO_4
9. 硫酸铵，$(NH_4)_2SO_4$

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

10. 氯化钠，NaCl
11. 硫酸镁，$MgSO_4$
12. 二水合氯化钙，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
13. 半胱氨酸盐酸盐
14. 碳酸钠，Na_2CO_3
15. 刃天青
16. 乙酸钠，CH_3COONa
17. 碳酸氢钠，$NaHCO_3$
18. 小麦粉
19. 鸭茅粉
20. 无氧稀释液溶液（见溶液配方）
21. 培养液 M (见溶液配方)
22. 培养液 SP (见溶液配方)
23. 底物悬液（见溶液配方）

仪器设备

1. 40 目筛
2. 解剖显微镜
3. 恒温水浴锅
4. 厌氧工作站
5. 离心机

实验步骤

1. 晨饲后，采用负压装置从装有永久瘘管的反刍动物瘤胃中采集瘤胃液，经双层纱布过滤后，放入到充 CO_2 并 39 °C 预温保温瓶中带回实验室。
2. 过滤的瘤胃液放入到厌氧工作站中，使用无氧稀释液依次进行十倍梯度稀释（10^{-2}、10^{-3} 或其他倍数，以每个计数格 6-8 只原虫为准)，稀释后的瘤胃液放置于厌氧工作站中 39 °C 保存。
3. 吸取 0.1 ml 稀释后的瘤胃液至载玻片，在厌氧工作站中通过显微镜检查（100

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

×)，并分离原虫。

4. 将单个原虫细胞在显微镜下吸取到毛细管中，并在转移到培养管之前检查原虫细胞是否存活，转移原虫细胞至 16 × 150 mm 培养管中，每个培养管放置 1-3 个细胞。
5. 培养管中加入 10 ml 培养液 (根据不同的原虫属生长状态选择不同的培养液，如前毛属原虫使用培养液 M 培养生长较好，内毛属原虫适合使用培养液 SP 培养生长较好) 和 1 ml 底物悬液，厌氧封闭培养管，将培养管以 10°夹角放置于 39 °C 的厌氧工作站中培养。
6. 每天在厌氧工作站中加入 0.1 ml 底物悬液至培养管中，在解剖显微镜下观察原虫生长状态，生长到每个计数格 6-8 只原虫为准。
7. 在厌氧工作站中将培养的原虫每周转接种至新的培养管两次，使用大口径吸管吸取 5 ml 培养液，加入到已经装有 5 ml 新鲜培养液和 0.1 ml 底物悬液的培养管 中，在接种到新培养管后，每日进行观察，以每个计数格 6-8 只原虫为准。
8. 使用解剖显微镜，在放大 400 ×条件下根据原虫大小和形态学对培养的原虫进行鉴定，具体形态可参考 Dehority (1993) 和注意事项中常见原虫形态和图片。

注意事项

瘤胃内常见原虫形态特点：

1. 内毛属 (*Entodinium*) 平均体型约 2-168 µm × 13-104 µm，体纤毛大部分消失，只有少部分纤毛在体前面体表具有一个复合纤毛带，可伸缩。虫体开头较平直，虫体 6 面定向分区，口位于前段，棒状大核靠右边。一个收缩泡，无骨板，部分种类具有尾刺。此属纤毛虫所占比例较大，约为 50%左右。

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

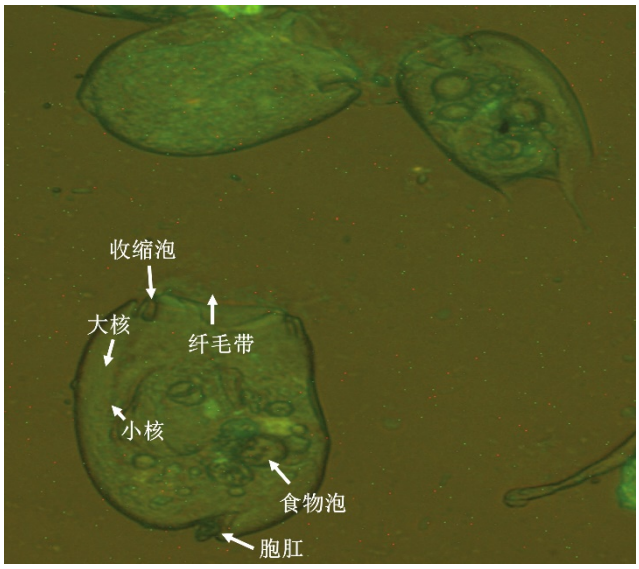

图 1. 内毛属 (*Entodinium*) 原虫形态示意图 (400 ×)

2. 双毛属 (*Diplodinium*) 体为近似方形 (77-86 μm × 53-61 μm)，定向分 6 区，大核前粗后细，形状复杂，位于体左侧，染色界限不明显，小核一般位于大核上。体前有两束复合纤毛带，分别为口部和体左前部，之间有明显隆起的顶盖。多数有两个收缩泡，无骨板，有或无尾刺。

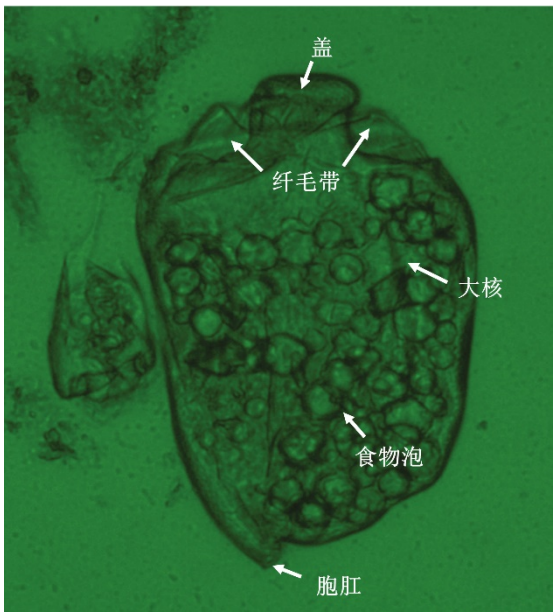

图 2. 双毛属 (*Diplodinium*) 原虫形态示意图 (400 ×)

3. 等毛属 (*Isotricha*) 虫体形态结构简单，体型较大 (108-207 μm × 73-128 μm)，但

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

体壁较薄（10 nm）。形状如扁平卵型，体表布满等长纤毛。有口部、微弯曲的杆状大核、小核以及 1-4 个不等的收缩泡。

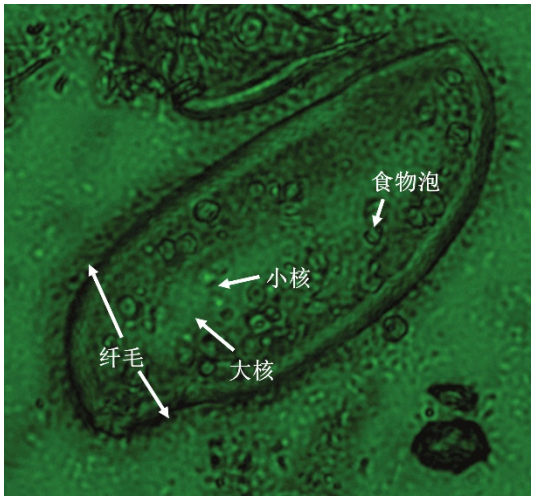

图 3. 等毛属（*Isotricha*）原虫形态示意图（400 ×）

4. 头毛属（*Ophryosolex*）体型较大（140-160 μm × 80-110 μm），呈锥形或不规则，较坚硬。具 2 个纤毛带，背部纤毛带在体中央形成类似带子状。有 9 个收缩泡，排成 2 列，无鳃盖，有 3 枚骨板，2 枚在体上，一枚在体右，体后有数目不等的尾刺。

图 4. 头毛属（*Ophryosolex*）原虫形态示意图（400 ×）

5. 前毛属（*Epidinium*）体型较大且偏长（80-150 μm × 40-70 μm），后端呈锥形。具

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

有两个纤毛带，均在体前部，近口纤毛带靠顶端，背部左纤毛带距离顶端 1/5 处，2 个收缩泡纵列在棒状大核左前、后部，小核位于大核左侧前沟处。无鳃盖，三个骨板，有或无尾刺。

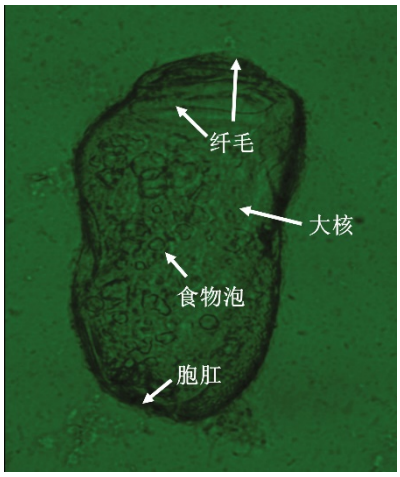

图 5. 前毛属（*Epidinium*）原虫形态示意图（400 ×）

6. 坚甲属（*Osteracodinium*）体为椭圆形（100-130 μm × 50-60 μm），主要特征为一块宽大的骨板占据虫体的上面体表的大半部分。前部具有两个纤毛带。大核杆状较长，左侧中间有一凹陷，小核位于其中。6 个以上收缩泡纵列与大核左面。

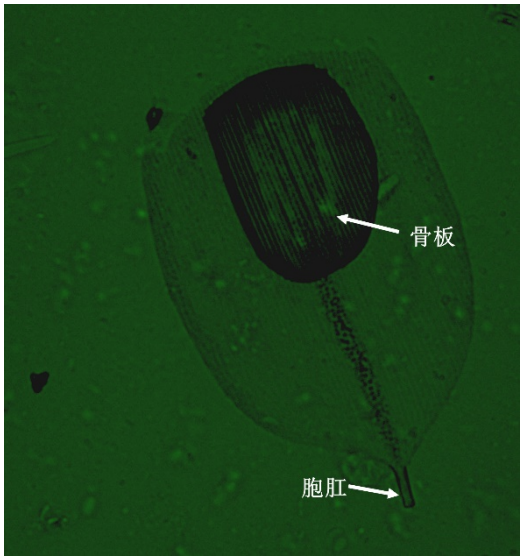

图 6. 坚甲属（*Osteracodinium*）原虫形态示意图（400 ×）

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

溶液配方

1. 无氧稀释液 (Bryant and Burkey, 1953)

   100 ml 无氧稀释液包含 45 ml 矿物液 No.1 (0.3% K_2HPO_4)，45 ml 矿物液 No.2 (0.3% KH_2PO_4，0.6% $(NH_4)_2SO_4$，0.6% NaCl，0.06% $MgSO_4$ 和 0.08% $CaCl_2·2H_2O$)，加入 1.67 ml 3%半胱氨酸盐酸盐，5 ml 0.3%碳酸钠溶液，加蒸馏水至 100 ml。此外，无氧稀释液中还包含 0.0001%刃天青。稀释液放入高压蒸汽灭菌器灭菌 (121 °C，0.1 MPa 灭菌 20 min)，当打开灭菌器时，立即使用无菌橡胶塞封闭稀释液，待稀释液温度冷却至 45-50 °C 时，向溶液中充入 CO_2 至饱和。

2. 培养液 M (Dehority, 1998)

   每 100 ml 培养液 M 包含 50 ml 混合矿物溶液 M (6.0 g/L NaCl，0.2 g/L $MgSO_4$，0.26 g/L $CaCl_2·2H_2O$ 和 2.0 g/L KH_2PO_4)，5 ml 1.5%乙酸钠溶液，8.33 ml 6%碳酸氢钠溶液，26 ml 蒸馏水，10 ml 瘤胃液 (瘤胃液为经 2 层纱布过滤，1,000 × *g* 离心 10 min 后的上清液)，0.67 ml 含 3%半胱氨酸盐酸盐溶液 (在氮气条件下厌氧保存在无菌离心管中，直到使用前取出)。半胱氨酸添加前需混合培养液通 CO_2 15-20 min，如果需要，可以使用 1 mol/L NaOH 或者 1 mol/L HCl 调节溶液 pH 至 6.6-6.8，然后在厌氧条件下添加含 3%半胱氨酸盐酸盐溶液。培养液 M 使用高压蒸汽灭菌器灭菌 (121 °C，0.1 MPa 灭菌 20 min)。

3. 培养液 SP (Dehority, 1998)

   每 100 ml 培养液 SP 包含 25 ml 混合矿物溶液 SP-1 (20 g/L K_2HPO_4)，25 ml 混合矿物溶液 SP-2 (16 g/L KH_2PO_4，4.0 g/L NaCl，0.212 g/L $CaCl_2·2H_2O$ 和 0.154 g/L $MgSO_4$)，10 ml 瘤胃液 (瘤胃液为经 2 层纱布过滤，1,000 × *g* 离心 10 min 后的上清液)，10 ml 6%碳酸氢钠溶液，29.33 ml 蒸馏水，0.67 ml 含 3%半胱氨酸盐酸盐溶液 (在氮气条件下厌氧保存在无菌离心管中，直到使用前取出)。半胱氨酸添加前需混合培养液通 CO_2 15-20 min，如果需要，可以使用 NaOH 或者 HCl 调节溶液 pH 至 6.6-6.8，然后在厌氧条件下添加含 3%半胱氨酸盐酸盐溶液。培养液 SP 使用高压蒸汽灭菌器灭菌 (121 °C，0.1 MPa 灭菌 20 min)。

4. 底物悬液

   每 100 ml 蒸馏水中加入 1.5 g 小麦粉，1.0 g 鸭茅粉制作底物悬液，小麦粉和鸭茅粉均粉碎过 40-60 目标准筛，底物悬液通 CO_2 15-20 min 以保证厌氧。底物悬液使

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

用高压蒸汽灭菌器灭菌（121 °C，0.1 MPa 灭菌 20 min）。底物悬液冷冻保存，使用前解冻。

致谢

感谢国家自然科学基金（30771567）对本实验的支持。感谢扬州大学动物科学与技术学院王梦芝所做的研究工作，对本实验提供了很大的帮助。已发表的使用过本实验方案的文章：王梦芝，程欣，谢文文，张柏松，刘翔，王洪荣. (2010). 体外法研究不同油脂对瘤胃原虫吞噬细菌微循环的影响. *中国农业科学* 43(18): 3831-3837. 王梦芝. (2008). 山羊瘤胃原虫与细菌吞噬关系和微生物 AA 变化机制的研究. 博士学位论文. 扬州大学.

参考文献

1. Dehority, B. A. (1998). Generation times of *Epidinium caudatum* and *Entodinium caudatum*, determined *in vitro* by transferring at various time intervals. *J Anim Sci* 76(4): 1189-1196.
2. Bryant, M. P. and Burkey, L. A. (1953). Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J Dairy Sci* 36: 205-217.
3. Dehority, B. A. (1993). Laboratory manual for classification and morphology of rumen cilate protozoa. CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN: 08-493-48757.

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.