

瘤胃微生物移植

Rumen Microbiota Transplantation

王佳堃*, 杨斌, 俞少博

奶业科学研究所, 动物科学学院, 浙江大学, 杭州, 浙江

*通讯作者邮箱: jiakunwang@zju.edu.cn

摘要: 瘤胃微生物移植 (Rumen Microbiota Transplantation) 是将符合要求的供体瘤胃微生物移植到受体动物的瘤胃中, 从而重塑瘤胃菌群结构, 提高反刍动物生产性能或治疗动物疾病。本文介绍了瘤胃微生物移植实验中, 供体反刍动物的选择、瘤胃液的采集、瘤胃微生物冻干粉的制备, 以及受体动物瘤胃微生物移植的基本方法。

关键词: 瘤胃, 微生物, 移植

材料与试剂

1. 试验动物
2. 瘤胃液采集管 (科立博牧业科技有限公司, catalog number: A1141K、A1164K 或 A1320K, 图 1, 表 1)



图 1. 瘤胃液采集管

(图片摘自 <https://www.anscitech.cn/>)

表 1. 瘤胃液采集管型号及适用范围

目录号	长度 (m)	适用范围
A1141K	2.6	成年牛
A1164K	2.0	小牛
A1320K	1.7	犊牛或成年羊

3. 密封保温瓶
4. 50 ml 离心管
5. 血清瓶
6. CO₂ 气体
7. 无菌纱布
8. 100~200 ml 注射器 (若需要移植的瘤胃液较多, 选用相应型号注射器)
9. 250 ml 离心杯 (离心机配套)
10. 脱脂奶粉
11. 瘤胃插管
羔羊采用鼻饲管 (Freka Tube, catalog number: 7980111, 图 2); 牛或成年羊采用
瘤胃液采集管。



图 2. Freka Tube 鼻饲管

12. 冻干保护剂 (见溶液配方)
13. 碳水化合物厌氧固体培养基 (见溶液配方)
14. PBS 磷酸缓冲液

仪器设备

1. 水浴锅
2. 高速离心机

3. 真空冷冻干燥机

4. -80 °C 超低温冰箱

5. 厌氧培养箱

实验步骤

1. 瘤胃液移植

1.1 供体动物的选择

选取 5 头或以上健康供体反刍动物。供体筛选原则如下：

(1) 大于 5 月龄

(2) 体温 38-39.5 °C (直肠温度)

(3) 自由采食和饮水

(4) 采食、排泄、呼吸、社交、繁殖等日常行为均无异常

(5) 外观无伤

(6) 瘤胃内环境正常，无酸中毒、胀气等

(7) 精神行为正常

(8) 无其他异常行为

(9) 2 周内未使用抗生素，且未接种活的病毒疫苗

(10) 无腹泻、便秘、便血等情况

(11) 未接触其他患病的动物

(12) 经血清学检测，无动物疾病，在移植过程中无传播传染病的风险

将供体反刍动物按照试验要求进行 14 天预饲，以富集瘤胃微生物，减少个体差异。预饲期间不得使用抗生素。

1.2 供体瘤胃液的采集

于瘤胃液移植当天晨饲前，使用瘤胃采集管通过口腔采集供体动物的瘤胃液 (视频 1)。弃去前 100 ml 瘤胃液 (防止唾液污染)，随后收集的瘤胃液于密封保温瓶中暂存。待所有供体动物瘤胃液采集完毕后，在 CO₂ 气流保护下，将所有供体瘤胃液等体积混合。混合后的瘤胃液经四层纱布过滤，用离心管或血清瓶密封，至于 39 °C 水浴备用。

口腔采集瘤胃液

视频 1. 口腔采集瘤胃液

1.3 受体动物移植

受体动物在微生物移植前 1~2 周停止使用抗生素。将瘤胃插管经受体动物口腔插入瘤胃中。羔羊采用鼻饲管，将鼻饲管从口腔插入时，羔羊会自动吞咽鼻饲管，帮助插管插入瘤胃，鼻饲管插入 30~40 cm (图 3)，切勿过度插入；成年羊或牛采用瘤胃液采集管插入瘤胃底部，成年羊或犊牛插入约 1.2 m，成年牛插入约 2 m。用注射器将瘤胃液经瘤胃插管注入。从瘤胃液采集完毕到移植的时间不超过 30 min。

2. 瘤胃微生物冻干粉移植

2.1 瘤胃微生物冻干粉制备 (视频 2)

经四层纱布过滤后的瘤胃液装入 250 ml 离心杯，并充入 CO₂，500 × g 室温下低速离心 5 min 以去除饲料大颗粒。将上清液继续装入离心杯并充入 CO₂，24,000 × g 室温下高速离心 20 min 沉淀细菌菌体。弃去上清，加入 1000 ml 冻干保护剂重悬菌体，充入 CO₂ 密封后置于 -80 °C 硬化 2 h。使用真空冷冻干燥机将硬化后的菌体冻干，混合所有批次的瘤胃微生物冻干粉备用。

瘤胃液冻干粉的制备

视频 2. 瘤胃液冻干粉的制备

2.2 微生物冻干粉活菌数检测和残留挥发性脂肪酸的测定

(1) 制备冻干粉的过程中，记录并计算瘤胃液冻干粉的平均得率。

(2) 取 0.5 g 微生物冻干粉，溶于 1 ml PBS 缓冲液中，经 10 倍梯度稀释形成系列微生物溶液。取各浓度微生物溶液 20 μ l，均匀涂布于碳水化合物厌氧固体培养基上，39 $^{\circ}$ C 下培养 48 h。培养后，选择合适的稀释浓度（培养皿上菌落数为 30~200 个），计算活菌数。

(3) 取 2.5 g 冻干粉，溶于 10 ml PBS 缓冲液，以提取冻干粉中残留的挥发性脂肪酸，使用气相色谱测定挥发性脂肪酸的浓度。

2.3 受体动物移植

受体动物在微生物移植前 1~2 周停止使用抗生素。将瘤胃微生物冻干粉溶于代乳粉或水，随代乳粉或水一起饲喂。溶解时，代乳粉或水的温度为 39~40 $^{\circ}$ C。

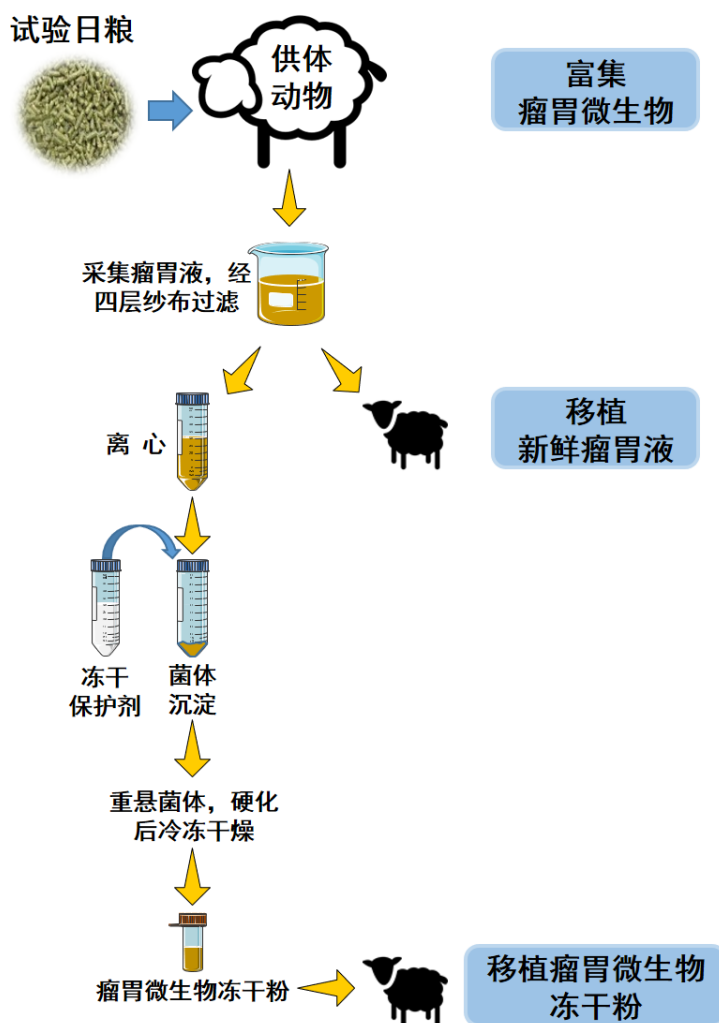


图 3. 瘤胃微生物移植流程图

结果与分析

1. 移植瘤胃液的活菌数

按照本文方法处理的新鲜瘤胃液的平均活菌数为 4.5×10^7 CFU/ml, 满足移植要求。

2. 瘤胃微生物冻干粉的得率、活菌数和残留挥发性脂肪酸

按照本文方法, 平均每 40 ml 瘤胃液可获得 1 g 瘤胃微生物冻干粉, 其平均活菌数为 6.8×10^8 CFU/g, 冻干粉中残余的乙酸、丙酸和丁酸的浓度依次为 15.98 μ mol/g、1.97 μ mol/g 和 2.09 μ mol/g。

溶液配方

1. 冻干保护剂

称取 100 g 脱脂奶粉溶于 1 L 煮沸的蒸馏水, 用微波炉中再次煮沸去除溶氧, 然后持续通入 CO₂ 冷却备用。

2. 碳水化合物厌氧固体培养基

培养基配方参考 Leedle 等 (1980), 如表 2 所示。配制完成后煮沸去除氧气, 通入 CO₂ 气体 30~45 min, 使培养基变成无色。121 °C 高压灭菌 15 min, 于厌氧培养基中稍稍冷却, 加入 Na₂S/L-半胱氨酸盐酸盐溶液和 Na₂CO₃, 倒入培养皿中冷却备用。

表2 碳水化合物厌氧培养基配方

配 方	百分比 (%)
碳水化合物 ¹	0.45
胰酶解酪蛋白	0.20
酵母提取物	0.05
矿物质I ²	4.0
矿物质II ³	4.0
血红素 ⁴	1.0
挥发性脂肪酸 ⁵	1.0
刃天青 (0.1 %)	0.1

瘤胃液 ⁶	40.0
琼脂	2.0
纯水	47.2
Na ₂ S/L-半胱氨酸盐酸盐溶液 (2.5 %) ⁷	1.0
Na ₂ CO ₃ (8 %) ⁷	5.0

¹碳水化合物: 纤维素、纤维二糖、葡萄糖、麦芽糖、果胶、可溶性淀粉、木聚糖、木糖 (w/v) 和甘油 (v/v) 各0.05 %

²矿物质I: 0.6 % K₂HPO₄

³矿物质II: 0.6 % KH₂PO₄、0.6 % (NH₄)₂SO₄、1.2 % NaCl、0.255 % MgSO₄·7H₂O、0.169 % CaCl₂·2H₂O

⁴血红素溶于50 ml乙醇和50 ml 0.05 M NaOH中

⁵每100 ml挥发性脂肪酸溶液包含17 ml乙酸、6 ml丙酸、4 ml丁酸, 以及异丁酸、正戊酸、异戊酸和DL-α-甲基丁酸各1 ml, 加蒸馏水混匀, 用NaOH调节pH至7.5

⁶瘤胃液以24000 × g离心30 min后储存在-80 °C条件下

⁷溶液过0.22μm Millipore®滤膜除菌, 待培养基高压灭菌后添加

致谢

感谢国家重点研发计划 (2017YFD0500502) 和国家自然科学基金 (31622056 和 31572431) 的资助。

使用本试验方案的文章: Yu 等 (2020)。

参考文献

1. 胡军, 谢春琳, 唐义梅, 晏向华. (2017). [我国猪粪便微生物移植技术的标准程序初探](#). 中国畜牧杂志, 53(8): 1-4.
2. Hu, J., Chen, L., Tang, Y., Xie, C., Xu, B., Shi, M., Zheng, W., Zhou, S., Wang, W., Liu, L., Yan, Y., Yang, T., Niu, Y., Hou, Q., Xu, B., Yan, X. (2018). Standardized preparation for fecal microbiota transplantation in pigs. *Front Microbiol* 9, 1328.
3. Leedle, J.A., & Hespell, R.B. (1980). [Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations](#). *Appl Environ Microbiol* 39(4): 709-719.

4. Shen, J.S., Chai, Z., Song, L.J., Liu, J.X. and Wu, Y.M. (2012). [Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows](#). *J Dairy Sci* 95(10): 5978-5984.
5. Yu, S., Shi, W., Yang, B., Gao, G., Chen, H., Cao, L., Yu, Z. and Wang, J. (2020). [Effects of repeated oral inoculation of artificially fed lambs with lyophilized rumen fluid on growth performance, rumen fermentation, microbial population and organ development](#). *Anim Feed Sci Technol* 264.