

# 瘤胃混合细菌连续传代培养技术

## Sequentially Transfer Ruminant Bacterial Cultures Technology *in vitro*

封丽梅, 胡光辉, 晏琦, 林淼\*

动物科学与技术学院, 扬州大学, 扬州, 江苏省

\*通讯作者邮箱: [linmiao@yzu.edu.cn](mailto:linmiao@yzu.edu.cn)

**摘要:** 反刍动物瘤胃是一个复杂的微生物共生生态系统, 瘤胃中的微生物种类繁多、数量巨大, 包括原虫 (主要为纤毛虫)、细菌及部分厌氧真菌和少量侵害发酵有机体的噬菌体、病毒等, 绝大部分属厌氧菌。瘤胃厌氧细菌不仅能够促进瘤胃的发酵, 为宿主提供生命所需的能量、蛋白质、氨基酸和维生素等营养成分, 还能够帮助反刍动物更好地利用纤维类饲料。因此, 培养瘤胃混合细菌对提高饲料的消化利用率、降低饲料成本、扩大饲料原料的利用范围以及进一步促进畜牧业的发展具有重要意义。本实验是以饲料为发酵底物, 在体外环境下对瘤胃混合细菌连续传代培养。此方法还可适用于分离纯化细菌, 挖掘其功能。

**关键词:** 瘤胃液, 饲料, 连续传代, 细菌

### 材料与试剂

1. 各种型号枪头
2. 离心管 (2 mL、15 mL、50 mL)
3. 锥形瓶 (500 mL)
4. 容量瓶 (1 L)
5. 量筒 (500 mL)
6. 螺口瓶 (1 L)
7. 注射器 (1 mL)
8. 胶塞 (Bellco Glass Inc., 20 mm, 2048-11800A)

- 29 9. 厌氧培养瓶 (150 mL)
- 30 10.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 31 11.  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 32 12.  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (天津市科密欧化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 33 13.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 34 14.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (天津市科密欧化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 35 15.  $\text{NaHCO}_3$  (上海苏懿化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 36 16.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (天津市科密欧化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 37 17.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 38 18.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 39 19.  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 40 20. 刃天青 (Solarbio, 北京)
- 41 21. 超纯水
- 42 22. 人工培养缓冲液

## 43 仪器设备

- 44 1. 恒温培养箱
- 45 2. 磁力搅拌器
- 46 3. 二氧化碳气罐及气体
- 47 4. 气压测定计 (DPG1000B15PSIG-5, CeComp Electronics Inc.)

## 49 实验步骤

### 50 一、矿物盐缓冲液的制备

51 根据矿物盐缓冲液（配方见表1），分别配制A、B、C液，按照400 mL蒸馏水  
52 +0.1 mL A液+200 mL B液+200 mL C液+1 mL 刃天青的比例混合各溶液，配制成矿物盐  
53 缓冲液，并持续通入无氧二氧化碳（纯度：99.9%以上），控制气体流速，有连续气泡  
54 流出即可。加入磁力转子（蒸馏水洗干净）在磁力搅拌器上搅拌，通气约3 h（pH=6.8  
55  $\pm 0.1$ ）。A、B、C液经灭菌后可保存1个月（4℃），若不灭菌，现用现配。

### 57 二、发酵底物准备

将发酵底物（如植物性饲料）经 65 °C 干燥 48 h 后，粉碎过 40 目筛（0.42 mm 粒径），密封备用。实验使用 150 mL 体积的厌氧培养瓶为培养装置，采集牛/羊瘤胃液（瘤胃液采集时间可根据试验目的来确定）前用小药勺称取发酵底物于干燥培养瓶中。为了保证测试样品具有代表性，每个样品至少做 6 个平行测定。

### 三、接种（林森等，2020）

每只培养瓶加入 15 mL 缓冲液，并持续通入 CO<sub>2</sub>（纯度：99.9%） 5 min，加入 2.5 %硫化钠溶液 0.15 mL 后，胶塞密封，光照至缓冲液内的刃天青由蓝到粉直到褪至无色。瘤胃液来自带有永久性瘤胃瘘管的牛或羊，经 4 层无菌纱布过滤后，将容器灌满，立刻于 39 °C 水浴迅速带回实验室。每瓶加入 2 mL 瘤胃液，胶塞密封加铝盖后，测初始气压值。将培养瓶于 39 °C 静置培养。

### 四、传代

每 72 h (根据实验目的可调整)传代一次，传代量为 2 mL，其操作同“三、接种”。具体培养代数可根据试验目的选择。在每次传代后和 72 h 培养结束时，测定气压和发酵液 pH 值。收集发酵混合液。如为了研究细菌量的差异，可以在传代前和培养过程中根据试验目的留样测定细菌量。

### 溶液配方

矿物盐培养缓冲液（Menke, et al., 1979）配方见表 1。

表 1. 溶液配方

微量元素溶液 (A 液):			
氯化钙	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		13.2 g
氯化锰	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		10.0 g
氯化钴	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		1.0 g
三氯化铁	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O		8.0 g
蒸馏水至			100 mL
缓冲溶液 (B 液):			
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>		4.0 g
	NaHCO <sub>3</sub>		35.0 g

	蒸馏水至	1000 mL
常量元素溶液 (C 液):		
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.7 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.2 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6 g
	蒸馏水至	1000 mL
	刃天青溶液:	0.1 % (w/v)

注: 灭菌超纯水 400 mL + A 液 0.1 mL + B 液 200 mL + C 液 200 mL + 刃天青溶液 1 mL。配制 A、B、C、刃天青、还原剂溶液的水需要无菌。使用前配制。

## 致谢

1. 本研究得到了国家现代农业产业技术体系 (CARS-36), 江苏省高校优势学科建设自主工程项目资助。
2. Lin, M., Dai X. X., Weimer P. J. (2019). Shifts in fermentation end products and bacterial community composition in long-term, sequentially transferred *in vitro* ruminal enrichment cultures fed switchgrass with and without ethanol as a co-substrate. *Bioresource Technol* 285: 121324.

## 参考文献

1. 林淼, 王阔鹏, 陈映良, 孙文婧, 封丽梅, 胡梓轩. (2020). 乙醇对瘤胃液接种稻秸的体外发酵产物及细菌群落结构的影响. *生物技术通报*, 36 (2): 91-99.
2. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J Agr Sci* 93 (1): 217-222.