

# 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](mailto:mengzhiwangyz@126.com)

**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、头毛属和前毛属，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<sub>2</sub> 气体，纯度为 99.999%
7. 磷酸氢二钾，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
8. 磷酸二氢钾，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
9. 硫酸铵，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
10. 氯化钠，NaCl
11. 硫酸镁，MgSO<sub>4</sub>
12. 二水合氯化钙，CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O
13. 半胱氨酸盐酸盐
14. 碳酸钠，Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
15. 刃天青

- 30 16. 乙酸钠,  $\text{CH}_3\text{COONa}$
- 31 17. 碳酸氢钠,  $\text{NaHCO}_3$
- 32 18. 小麦粉
- 33 19. 鸭茅粉
- 34 20. 无氧稀释液溶液 (见溶液配方)
- 35 21. 培养液 M (见溶液配方)
- 36 22. 培养液 SP (见溶液配方)
- 37 23. 底物悬液 (见溶液配方)

38

## 39 仪器设备

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

45

## 46 实验步骤

- 47 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
- 48 布过滤后, 放入到充  $\text{CO}_2$  并  $39^\circ\text{C}$  预温保温瓶中带回实验室。
- 49 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 ( $10^{-2}$ 、
- 50  $10^{-3}$  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
- 51 站中  $39^\circ\text{C}$  保存。
- 52 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
- 53  $\times$ ), 并分离原虫。
- 54 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
- 55 是否存活, 转移原虫细胞至  $16 \times 150 \text{ mm}$  培养管中, 每个培养管放置 1~3 个细胞。
- 56 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
- 57 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。

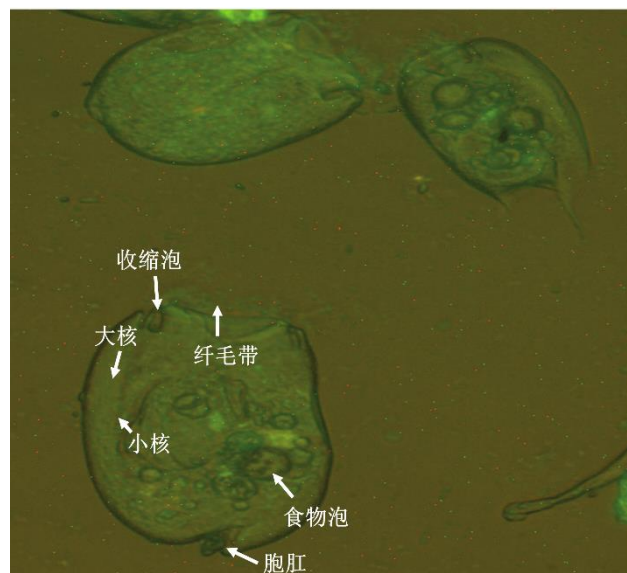
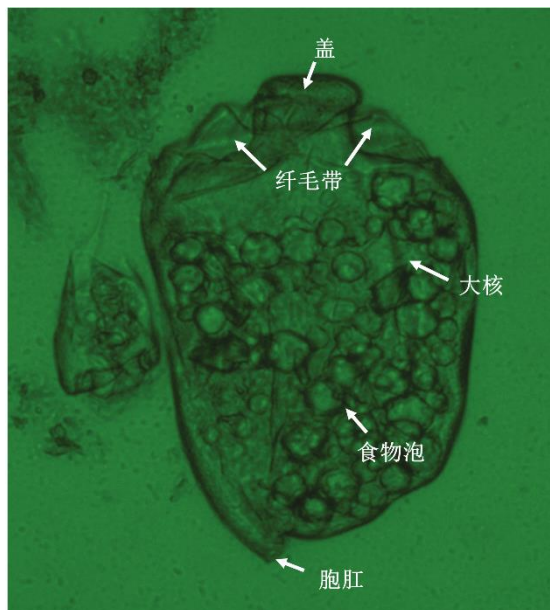


图 1 内毛属 (*Entodinium*)原虫形态示意图 (400 ×)

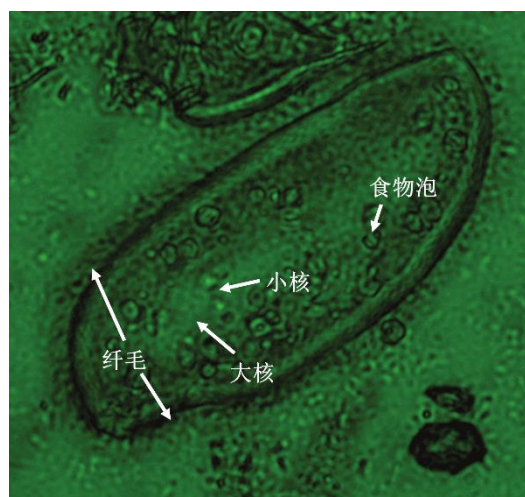
2. 双毛属 (*Diplodinium*) 体为近似方形 (77-86 μm × 53-61 μm)，定向分 6 区，大核前粗后细，形状复杂，位于体左侧，染色界限不明显，小核一般位于大核上。体前有两束复合纤毛带，分别为口部和体左前部，之间有明显隆起的顶盖。多数有两个收缩泡，无

79 骨板，有或无尾刺。



80  
81 图 2 双毛属 (*Diplodinium*)原虫形态示意图 (400 ×)

82 3. 等毛属 (*Isotricha*) 虫体形态结构简单，体型较大 ( $108-207\ \mu\text{m} \times 73-128\ \mu\text{m}$ )，但体壁  
83 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  
84 核以及 1-4 个不等的收缩泡。



85  
86 图 3 等毛属 (*Isotricha*)原虫形态示意图 (400 ×)

87 4. 头毛属 (*Ophryosolex*) 体型较大 ( $140-160\ \mu\text{m} \times 80-110\ \mu\text{m}$ )，呈锥形或不规则，较  
88 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，  
89 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  $\mu\text{m}$   $\times$  40-70  $\mu\text{m}$ ), 后端呈锥形。具有两个纤毛带, 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。

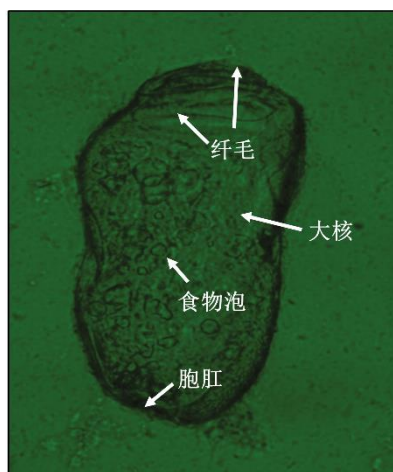


图5 前毛属 (*Epidinium*)原虫形态示意图 (400 ×)

6. 坚甲属 (*Osteracodinium*) 体为椭圆形 (100-130  $\mu\text{m}$   $\times$  50-60  $\mu\text{m}$ ), 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。



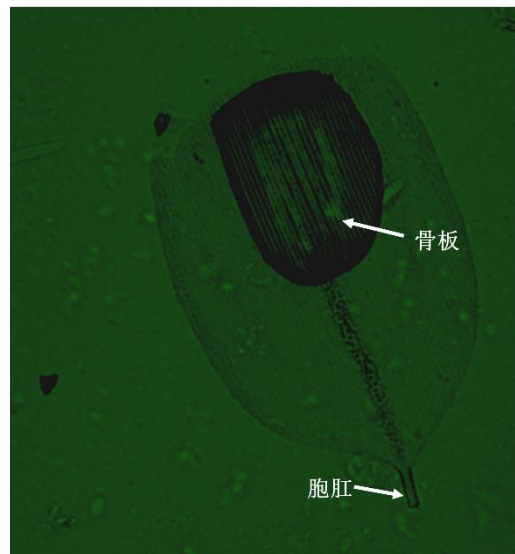


图 6 坚甲属 (*Osteracodinium*)原虫形态示意图 (400 ×)

## 溶液配方

### 1. 无氧稀释液 (Bryant 和 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%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 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  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.0 g/L NaCl, 0.212 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和 0.154 g/L  $\text{MgSO}_4$ ), 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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  15~20 min 以保证厌氧。底物悬液使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

1. 感谢国家自然科学基金 (30771567) 对本实验的支持。
2. 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.
3. 王梦芝. 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[D]. 扬州大学, 2008.
4. 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。

### 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., 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 ciliate protozoa. CRC Press, Boca Raton, FL.