**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. CO2气体，纯度为99.999%
7. 磷酸氢二钾，K2HPO4
8. 磷酸二氢钾，KH2PO4
9. 硫酸铵，(NH4)2SO4
10. 氯化钠，NaCl
11. 硫酸镁，MgSO4
12. 二水合氯化钙，CaCl2·2H2O
13. 半胱氨酸盐酸盐
14. 碳酸钠，Na₂CO₃
15. 刃天青
16. 乙酸钠，CH3COONa
17. 碳酸氢钠，NaHCO3
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CO2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 ×)，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。



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 ×)

**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% K2HPO4)，45 mL矿物液No.2 (0.3% KH2PO4，0.6% (NH4)2SO4，0.6% NaCl，0.06% MgSO4和0.08% CaCl2·2H2O)，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CO2至饱和。

1. 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 MgSO4，0.26 g/L CaCl2·2H2O和2.0 g/L KH2PO4)，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CO2 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)。

1. 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 K2HPO4)，25 mL混合矿物溶液SP-2 (16 g/L KH2PO4，4.0 g/L NaCl，0.212 g/L CaCl2·2H2O和0.154 g/L MgSO4)，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CO2 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)。

1. 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CO2 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9581944) *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.](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030253914829) *J Dairy Sci* 36: 205-217.
3. Dehority, B. A. (1993). [Laboratory manual for classification and morphology of rumen cilate protozoa.](https://www.routledge.com/Laboratory-Manual-for-Classification-and-Morphology-of-Rumen-Ciliate-Protozoa/Dehority/p/book/9781315894812) CRC Press, Boca Raton, FL.