

# 显微观察中国荷斯坦牛瘤胃 纤毛虫的物种多样性

陆源鸿<sup>①</sup> 余杨骏<sup>①</sup> 姜传奇<sup>②</sup> 邹璟轩<sup>①</sup> 陈启明<sup>①</sup> 陈立焱<sup>①</sup>  
苏明颜<sup>①</sup> 郭静颖<sup>①</sup> 徐勤辉<sup>①</sup> 袁发洙<sup>①</sup> 刘锴<sup>①</sup> 冯金梅<sup>①\*</sup>

① 江汉大学医学院病原生物学教研室 武汉 430056; ② 中国科学院水生生物研究所, 水生生物多样性与保护重点实验室 武汉 430072

**摘要:** 瘤胃纤毛虫是反刍动物瘤胃微生物的重要组成部分, 在维持瘤胃微生态和对宿主动物供能等方面起重要作用。本研究采集 5 头中国荷斯坦牛 (*Bos taurus*) 瘤胃液样品固定染色, 而后通过光学显微镜计数瘤胃纤毛虫的密度和属的组成及组成比, 并对其中常见属进行观察和特征描述, 旨在了解中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的物种多样性, 为反刍动物的瘤胃内纤毛虫生物多样性研究提供资料。结果发现, 中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫在瘤胃液中的平均密度为  $(3.2 \pm 3.4) \times 10^8$  个/L, 共检出 13 属瘤胃纤毛虫, 其中检出率最高的 3 个属依次为内毛属 (*Entodinium*)、单甲属 (*Eremoplastron*) 和双毛属 (*Diplodinium*), 检出率最低的 3 个属依次为鞘甲属 (*Elytroplastron*)、后毛属 (*Metadinium*) 和多甲属 (*Polyplastron*)。内毛属是中国荷斯坦牛瘤胃液中最主要的属, 其平均组成比为  $84.0\% \pm 10.2\%$ , 而其他属的组成比都低于 5%。本研究表明, 中国荷斯坦牛瘤胃液中瘤胃纤毛虫具有丰富的物种多样性。

**关键词:** 原生动物; 瘤胃纤毛虫; 物种多样性

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2022) 03-383-09

## Microscopic Observation Reveals Ciliate Species Diversity in the Rumen of Chinese Holstein Cattle

LU Yuan-Hong<sup>①</sup> YU Yang-Jun<sup>①</sup> JIANG Chuan-Qi<sup>②</sup> ZOU Jing-Xuan<sup>①</sup> CHEN Qi-Ming<sup>①</sup>  
CHEN Li-Yi<sup>①</sup> SU Ming-Yan<sup>①</sup> GUO Jing-Ying<sup>①</sup> XU Qin-Hui<sup>①</sup> YUAN Fa-Hu<sup>①</sup>  
LIU Kai<sup>①</sup> FENG Jin-Mei<sup>①\*</sup>

① *Department of Pathogenic Biology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056;* ② *Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China*

**Abstract:** Rumen ciliates are important components of rumen microorganisms and play an important role in maintaining rumen microecology and supplying energy to the host animal. **[Objectives]** This study aims to

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 32070420);

\* 通讯作者, E-mail: fengjm@jhun.edu.cn;

**第一作者介绍** 陆源鸿, 男, 硕士研究生; 研究方向: 瘤胃纤毛虫的物种多样性与系统学; E-mail: lyh1983276@163.com.

收稿日期: 2021-11-24, 修回日期: 2022-04-09 DOI: 10.13859/j.cjz.202203007

clarify rumen ciliate species diversity in Holstein cows. **[Methods]** In this study, rumen fluid samples of five healthy mid-lactation Chinese Holstein (*Bos taurus*) cows were collected. For each cow, three samples were collected, and each sample includes 2 ml of rumen fluid which were fixed and stained with 8 ml MFS (methyl-green-formalin-saline) solution. The density of rumen ciliates was counted by hemocytometer: The sample was gently shaken repeatedly, and 6.5  $\mu\text{l}$  of samples were immediately aspirated onto a hemocytometer plate (size: XB.K.25) to fill the counting cell, covered with a clean coverslip for 5-10 min, and the density of rumen ciliates was counted under a  $10 \times 10$  microscope (NEXCOPE NE610, USA). Each sample was randomly counted 6 times. And the means and standard deviation of the acquired data were calculated. Total genera and percentage composition of genera of rumen ciliates were counted under light microscopy: The sample was gently shaken repeatedly, 20  $\mu\text{l}$  was pipetted onto a clean slide with coverslip and 300 rumen ciliates cells were counted under a  $10 \times 40$  microscope. The number of rumen ciliates of different genera was recorded. Each sample was randomly counted 3 times. The percentage composition of genera (%) was obtained by counting the number of each genus out of the total 300 rumen ciliates in each count and then the mean and standard deviation were calculated; the frequency of detectable genera (%) was calculated from the frequency of each genus in the total times of counts. We observed and described the common genera of rumen ciliates in the rumen of Chinese Holstein (Fig. 1), aiming to understand the rumen ciliates biodiversity **[Results]** The results show that the average density of ciliates in rumen fluid of Chinese Holstein was  $(3.2 \pm 3.4) \times 10^8$  ind/L, and 13 genera of rumen ciliates were identified. Table 1 shows the results of density ( $\times 10^8$  ind/L) and total genera of rumen ciliates in five Chinese Holsteins. Table 2 reveals the results of the frequency of detectable genera (%) and percentage composition of genera (%) in five Chinese Holsteins. Of which three genera with the highest frequency of detection were *Entodinium*, *Eremoplastron* and *Diplodinium*, and three genera with the lowest frequency of detection were *Elytroplastron*, *Metadinium* and *Polyplastron*. In terms of the percentage composition of genera, *Entodinium* was the most abundant genus in the rumen fluid of Chinese Holstein, with an average percentage composition of  $84.0\% \pm 10.2\%$ , while the percentage compositions of all other genera were less than 5%. In Table 3 and Table 4, we also compared the results in the present study with reported data on rumen ciliates of Holstein cattle. **[Conclusion]** Our results reveal that rumen ciliates in rumen fluid of Chinese Holstein have rich species diversity.

**Key words:** Protozoa; Rumen ciliates; Species diversity

瘤胃纤毛虫 (rumen ciliates) (Gruby et al. 1843) 是一类主要生活在牛和羊等反刍动物瘤胃内与宿主互利共生的原生动物 (Feng et al. 2020)。瘤胃纤毛虫是瘤胃微生物的重要组成部分, 在多数家养反刍动物瘤胃的瘤胃液中其丰度高达  $10^8 \sim 10^9$  个/L, 占整个瘤胃微生物生物总量的 50% (Newbold et al. 2015)。前人的研究表明, 瘤胃纤毛虫在维持瘤胃生态系统平衡和维护宿主动物健康和高效的生产性能方面发挥着重要作用, 瘤胃纤毛虫在瘤胃内可快速

吞噬淀粉及其他可溶性糖类物质, 从而避免瘤胃内细菌爆发式发酵, 防止乳酸中毒, 起到稳定瘤胃 pH 的作用 (Hungate 1966, Coleman 1967); 还有一些大型瘤胃纤毛虫被证明具有纤维素分解活性, 它们能分泌分解纤维素、半纤维素和果胶的酶类帮助宿主降解纤维素 (Imai 1988); 瘤胃纤毛虫在瘤胃内还能消化可溶性和不可溶性蛋白质、吞食细菌或自溶从而影响含氮物质的代谢 (Kurihara et al. 1968, Sylvester et al. 2004); 瘤胃纤毛虫还具有降低

瘤胃内硝酸盐、亚硝酸盐致毒的作用(Bonhomme 1990)。

目前,国内外研究者已研究了内蒙古的绵羊(*Ovis aries*) (桂荣 1992)、蒙藏川三省的牦牛(*Bos grunniens*) (Gui et al. 2000)、广西的水牛(*Bubalus bubalis*) (桂荣等 2005)、西藏的黄牛(*Bos taurus*) (田发益等 2010)、天津的荷斯坦牛(*Bos taurus*) (刘景喜等 2013)、西藏的藏羊(*Ovis aries*) (梁桂荣等 2014)、阿拉斯加的驼鹿(*Alces americana*) (Dehority 1974)、内蒙古的驯鹿(*Rangifer tarandus*) (Imai et al. 2004)、日本的黑牛(*Bos taurus*) (Ito et al. 2005)、土耳其的绵羊和山羊(*Capra aegagrus hircus*) (Gocmen et al. 2006, Berber et al. 2019)、突尼斯的骆驼(*Camelus dromedarius*) 和家牛(*Bos taurus*) (Gürelli et al. 2020) 等多个地区的多种反刍动物的瘤胃内纤毛虫的多样性。报道的瘤胃纤毛虫类群已超过 42 个属多达 250 余种形态种(morphospecies), 它们的虫体形态大小差异很大, 体长从 15  $\mu\text{m}$  到 250  $\mu\text{m}$  不等(Dehority 2003), 是一类形态复杂、物种多样性丰富的微生物类群。

荷斯坦牛(*Bos taurus*) 产奶量高, 是国内常见的饲养奶牛品种, 但目前关于其瘤胃内纤毛虫的密度、种群组成和形态学资料尚缺乏。本研究通过光学显微观察方法计数中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫平均密度和属的组成及组成比, 并对其常见属进行观察和特征描述, 旨在了解荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的生物多样性, 为反刍动物的瘤胃内纤毛虫物种多样性研究提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集与固定

2021 年 4 月于湖北省武汉市江夏区某牧场, 选用 5 头健康三胎泌乳中期的中国荷斯坦牛, 体重为 500~600 kg, 平均体重为(552 $\pm$ 24.7) kg, 统一采取散栏式饲喂全混合日粮(total mixed ration, TMR), 日粮营养水平满足我国《奶牛饲养标准》(NY/T 34-2004)(中

国奶业协会 2005), 自由饮水。晨饲后 3 h, 将灭菌的瘤胃液采集导管经中国荷斯坦牛的口腔、食道直接进入瘤胃采集瘤胃液, 经双层棉质纱布快速过滤至专用收集量杯。按照 1:4 的比例将 2 ml 混匀的瘤胃液用 8 ml 甲基绿-福尔马林水溶液(methyl-green-formalin-saline, MFS)(8.0 g NaCl 粉末与 0.6 g 甲基绿粉末溶于 100 ml 35% 甲醛溶液中, 使用蒸馏水定容至 1 L) 固定(Cedrola et al. 2015), 每头牛的瘤胃液随机固定 3 个样品, 固定后混匀样品, 用锡箔纸包裹 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 待检。

### 1.2 瘤胃纤毛虫的计数

反复摇匀固定样品后, 立即吸取 6.5  $\mu\text{l}$  样品至血细胞计数板(规格: XB.K.25) 填充满计数池(Gürelli et al. 2020), 加盖洁净的盖玻片静置 5~10 min, 待瘤胃纤毛虫充分沉降后在 10 $\times$ 10 倍显微镜(NEXCOPE NE610, 美国) 下计数瘤胃纤毛虫密度。

本研究中瘤胃纤毛虫的计数区域为血细胞计数板中央大方格中四角和正中的 5 个中方格。镜检统计左上、左下、右上、右下和中间 5 个中方格所含有的瘤胃纤毛虫总数。若瘤胃纤毛虫位于格线上, 计数原则为数上不数下、数左不数右。即位于本格上线和左线上的虫体计入本格, 本格的下线和右线上的则不计入本格, 以减少误差。本实验镜检计数瘤胃纤毛虫密度(个/L) 公式为  $(N/5) \times 25D \times 10 \times 10^6 = ND \times 5 \times 10^7$ , 式中,  $N$  为计数 5 个中方格中瘤胃纤毛虫的总数,  $D$  为稀释倍数, MFS 溶液稀释倍数为 5,  $N/5 \times 25$ : 中央大方格的瘤胃纤毛虫数目;  $\times 10$ : 将中央大方格的体积 0.1  $\mu\text{l}$  换算成 1  $\mu\text{l}$ ;  $\times 10^6$ : 将单位 1  $\mu\text{l}$  换算成 1 L。每个固定样品混匀后随机重复计数 6 次。

### 1.3 瘤胃纤毛虫的组成与形态观察

反复摇匀固定样品后吸取 20  $\mu\text{l}$  至洁净载玻片上, 加盖玻片后在 10 $\times$ 40 倍显微镜下按照“城垛式”镜检顺序计数 300 个瘤胃纤毛虫, 分别记录不同属的瘤胃纤毛虫个数。每个样品随机取样重复计数 3 次。属的组成比(%) 由

每次计数各属数目在总数 300 中的占比，再将每次百分比结果计算平均值及标准差求得；属的检出率（%）由总计数次数中各属出现频次求得。

瘤胃纤毛虫属的分类依据前人研究报道（Dogiel 1927, Williams 1992），光学显微镜下鉴定瘤胃纤毛虫属和种参考前人报道（冯仰廉 2004, Baraka 2012）。在 10 × 40 倍显微镜下对各属瘤胃纤毛虫进行观察鉴定并拍照。

## 2 结果

### 2.1 瘤胃纤毛虫的密度与组成

5 头荷斯坦牛瘤胃液中瘤胃纤毛虫的平均密度为  $(3.2 \pm 3.4) \times 10^8$  个/L，共检出 13 属瘤胃纤毛虫（表 1），其中，检出率最高的 3 个属依次为内毛属（*Entodinium*）、单甲属（*Eremoplastron*）和双毛属（*Diplodinium*），检出率最低的 3 个属依次为鞘甲属（*Elytroplastron*）、后毛属（*Metadinium*）和多甲属（*Polyplastron*）（表 2）。在属的组成比从高到低依次为内毛属、前毛属（*Epidinium*）、等毛属（*Isotricha*）、单甲属、硬甲属（*Ostracodinium*）、双毛属、厚毛属

（*Dasytricha*）、真双毛属（*Eudiplodinium*）、头毛属（*Ophryoscolex*）、双甲属（*Diploplastron*）、多甲属、后毛属和鞘甲属。内毛属的组成比高达  $84.0\% \pm 10.2\%$ ，其他 12 属的组成比均低于 5%。

### 2.2 各属瘤胃纤毛虫形态

本研究结合光镜下观察甲基绿-福尔马林水溶液固定瘤胃纤毛虫各属样品的形态结构（图 1），对中国荷斯坦牛瘤胃液中常见 13 属瘤胃纤毛虫的形态进行描述。

表 1 5 头中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫平均密度与检出属数

Table 1 Density and total genera of rumen ciliates in five Holstein Cows

宿主编号 Number of cowse	纤毛虫密度 ( $\times 10^8$ 个/L) Ciliate density ( $\times 10^8$ ind/L)		检出属数 Total genera
	平均值	标准差 Mean $\pm$ SD	
1	2.6	2.3	9
2	5.0	4.6	12
3	3.8	2.5	10
4	2.9	3.7	13
5	1.5	1.9	10
总计 Total	3.2	3.4	13

表 2 5 头荷斯坦牛瘤胃纤毛虫属检出率和组成比

Table 2 Frequency of detectable genera and percentage composition of genera in five Holstein Cows

属 Genus	检出率 (%) Frequency	属组成比 Percentage composition of genera (%)					总计 Total
		1	2	3	4	5	
内毛属 <i>Entodinium</i>	100.0	93.9 $\pm$ 0.7	89.4 $\pm$ 2.5	86.9 $\pm$ 4.6	83.6 $\pm$ 3.5	66.0 $\pm$ 5.0	84.0 $\pm$ 10.2
双毛属 <i>Diplodinium</i>	97.8	1.2 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 1.0	5.5 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 2.0
真双毛属 <i>Eudiplodinium</i>	57.8	0.3 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	0.0	1.3 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 1.7	1.1 $\pm$ 1.7
硬甲属 <i>Ostracodinium</i>	86.7	1.2 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 1.0	0.4 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 3.0	2.3 $\pm$ 2.7
后毛属 <i>Metadinium</i>	15.6	0.3 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.1	0.0	0.0	0.0	0.1 $\pm$ 0.2
前毛属 <i>Epidinium</i>	48.9	0.0	0.3 $\pm$ 0.3	0.0	3.3 $\pm$ 1.4	10.3 $\pm$ 1.8	2.8 $\pm$ 4.1
头毛属 <i>Ophryoscolex</i>	60.0	0.5 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 1.3	0.9 $\pm$ 0.5	0.0	0.7 $\pm$ 0.9
等毛属 <i>Isotricha</i>	95.6	0.7 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 1.0	4.5 $\pm$ 2.1	2.8 $\pm$ 1.4	24.8 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 1.8
厚毛属 <i>Dasytricha</i>	84.4	0.3 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.8	3.2 $\pm$ 1.9	1.3 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 1.5
单甲属 <i>Eremoplastron</i>	100.0	1.7 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 1.2
双甲属 <i>Diploplastron</i>	44.4	0.0	0.7 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.4
多甲属 <i>Polyplastron</i>	17.8	0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.2
鞘甲属 <i>Elytroplastron</i>	2.2	0.0	0.0	0.0	0.04 $\pm$ 0.1	0.0	0.01 $\pm$ 0.05

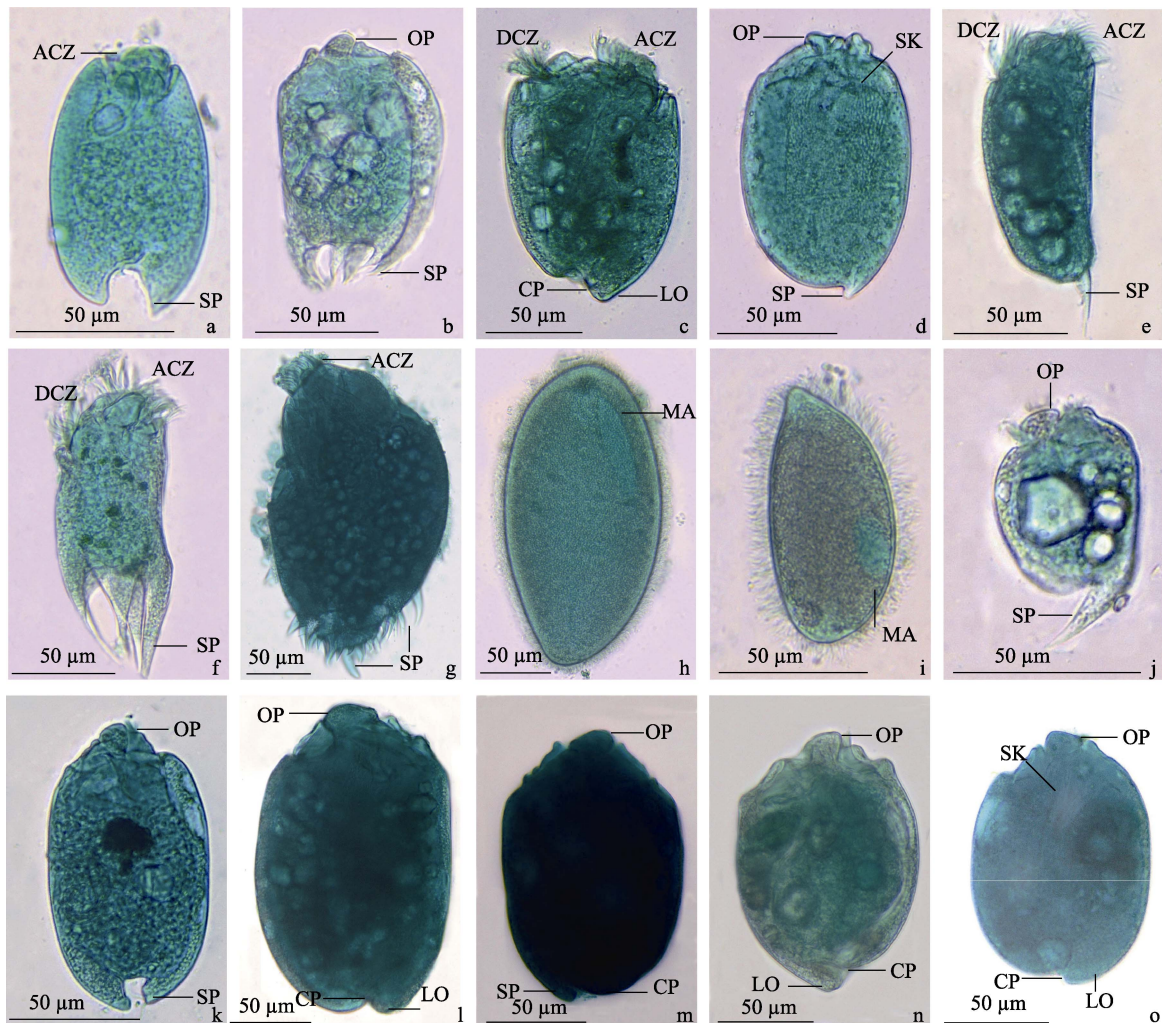


图 1 光学显微镜下常见的瘤胃纤毛虫各属代表种 (10 × 40 倍)

Fig. 1 Morphology of the common genera of rumen ciliates under the light microscope (10 × 40)

a. 内毛属; b. 双毛属; c. 真双毛属; d. 硬甲属; e. f. 前毛属; g. 头毛属; h. 等毛属; i. 厚毛属; j. k. 单甲属; l. 多甲属; m. 鞘甲属; n. 后毛属; o. 双甲属; 标尺. 50 μm。

a. *Entodinium*; b. *Diplodinium*; c. *Eudiplodinium*; d. *Ostracodinium*; e, f. *Epidinium*; g. *Ophryoscolex*; h. *Isotricha*; i. *Dasytricha*; j, k. *Eremoplastron*; l. *Polyplastron*; m. *Elytroplastron*; n. *Metadinium*; o. *Diploplastron*; Bar. 50 μm.

ACZ. 口纤毛区; CP. 胞肛; DCZ. 背纤毛区; LO. 尾叶; MA. 大核; OP. 顶盖式障; SK. 骨板; SP. 尾棘

ACZ. Adoral ciliary zone; CP. Cytoproct; DCZ. Dorsal ciliary zone; LO. Lobe; MA. Macronucleus; OP. Operculum; SK. Skeletal plates; SP. Spine

**内毛属 (图 1a)：**体小，前端呈截断状，只在前端口区存在纤毛，可在口区内外伸缩，用于摄食和运动，无骨板 (skeletal plates)，后端有尾棘 (spine) 或尾叶 (lobe)。大核呈肾形或香肠形，虫体长 25 ~ 110 μm，宽 25 ~ 80 μm。

**双毛属 (图 1b)：**虫体呈椭圆形或方形，虫体前端两个纤毛区中有一明显突起为顶盖式障 (operculum) (冯仰廉 2004)，在该属及下文双毛亚科其他属中均可见，无骨板。后端有尾棘，其中具齿双毛虫 (*Diplodinium dentatum*)

后端可有 6 个尾棘。虫体长 40 ~ 210  $\mu\text{m}$ ，宽 25 ~ 120  $\mu\text{m}$ 。

**真双毛属 (图 1c) :** *Eudiplodinium Maggii* 体大呈倒置梯形，前端呈宽而平的截断状并有两个较大纤毛区，体表中央有一狭长小骨板。胞肛 (cytoproct) 大，虫体长 110 ~ 220  $\mu\text{m}$ ，宽 75 ~ 150  $\mu\text{m}$ 。

**硬甲属 (图 1d) :** 虫体扁平呈椭圆形，前端两个纤毛区，宽大且明显的骨板为该属的主要特征 (Ito et al. 1998)。后端一侧有凸起的短尾棘，长 50 ~ 150  $\mu\text{m}$ ，宽 40 ~ 80  $\mu\text{m}$ 。

**前毛属 (图 1e, f) :** 虫体呈长条棒状，前端有两个纤毛区，后端可有一至数根长而细的尾棘 (钩状或长直形)。长 80 ~ 150  $\mu\text{m}$ ，宽 35 ~ 60  $\mu\text{m}$ 。

**头毛属 (图 1g) :** 虫体呈圆柱形或螺形，前端有两个纤毛区，口纤毛区位于最前端，背纤毛区下移至虫体中端并几乎环绕整个虫体，尾端有许多叉状尾棘 (粗短且数量多，呈带状排列)。长 140 ~ 190  $\mu\text{m}$ ，宽 80 ~ 110  $\mu\text{m}$ 。

**等毛属 (图 1h) :** 虫体呈长椭圆形，周身均匀覆盖纤毛。前端呈尖锥形，前庭口区在前端顶部或一侧，大核呈杆状或三角形。长 80 ~ 200  $\mu\text{m}$ ，宽 50 ~ 150  $\mu\text{m}$ 。

**厚毛属 (图 1i) :** 虫体呈椭圆形，虫体均匀覆着纤毛，纤毛呈螺旋状纵向排列，前端较后端细。该属比等毛属小很多，长 45 ~ 100  $\mu\text{m}$ ，宽 25 ~ 50  $\mu\text{m}$ 。

**单甲属 (图 1j, k) :** 虫体小近似椭圆。前端两个纤毛区，尾部可有喙状细长尾棘或对

称的叶状凸起。长 40 ~ 100  $\mu\text{m}$ ，宽 22 ~ 70  $\mu\text{m}$ 。

**多甲属 (图 1l) :** 体大呈长椭圆形。前端两个纤毛区，顶盖式广大。尾端有两个大小一致的尾叶，胞肛开口位于其中间。长 110 ~ 200  $\mu\text{m}$ ，宽 80 ~ 170  $\mu\text{m}$ 。

**鞘甲属 (图 1m) :** 虫体呈椭圆形，前端两个纤毛区。尾端一侧有一较尖锐尾叶，胞肛开口紧邻该尾叶。长 120 ~ 190  $\mu\text{m}$ ，宽 65 ~ 100  $\mu\text{m}$ 。

**后毛属 (图 1n) :** 呈不规则椭圆形，前端较宽呈截断状并有两个纤毛区，尾叶大且明显。长 60 ~ 280  $\mu\text{m}$ ，宽 50 ~ 180  $\mu\text{m}$ 。

**双甲属 (图 1o) :** 体呈椭圆形，两块狭长骨板其前端紧靠口纤毛区下方，后端紧密相邻，排列呈狭窄的“V”字形。长 90 ~ 130  $\mu\text{m}$ ，宽 60 ~ 90  $\mu\text{m}$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 瘤胃纤毛虫平均密度和检出属数

总结了国内外已报道的宿主荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的平均密度和种属数 (表 3)，与本研究成果比较发现，中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的平均密度接近于日本荷斯坦牛 (Ito et al. 1994) 瘤胃纤毛虫的平均密度，低于利比亚 (Selim et al. 1999) 和埃及 (Selim et al. 1996) 荷斯坦牛，高于加拿大 (Imai et al. 1989) 荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的平均密度。中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的检出属数多于利比亚 (Selim et al. 1999) 和埃及 (Selim et al. 1996) 荷斯坦牛，与加拿大 (Imai et al. 1989) 荷斯坦牛接近，少于日本 (Ito et al. 1994) 荷斯坦牛。概括来说，中国

表 3 本研究与已报道荷斯坦牛瘤胃纤毛虫相关数据的比较

Table 3 Comparison of present study with reported data on rumen ciliates of Holstein Cows

	宿主数 (头) Counts of cattle (ind)	密度 ( $\times 10^8$ 个/L) Ciliate density ( $\times 10^8$ ind/L)	属数 Total genera	种数 Total species	参考文献 References
日本 Japan	125	4.0	15	48	Ito et al. 1994
利比亚 Libya	9	8.1	9	27	Selim et al. 1999
埃及 Egypt	7	4.5	10	28	Selim et al. 1996
加拿大 Canada	11	0.7	12	28	Imai et al. 1989
中国 China	5	3.2	13	—	本研究 Present study

— 未记录。 — Not recorded.

荷斯坦牛瘤胃液中瘤胃纤毛虫平均密度  $3.2 \times 10^8$  个/L, 检出 13 属瘤胃纤毛虫, 与日本荷斯坦牛 (Ito et al. 1994) 瘤胃纤毛虫平均密度和检出属数相接近。Imai 等 (1989) 的研究揭示, 瘤胃纤毛虫种群分布存在地理差异, 因此我们推测上述结果可能与日本和中国两地同处东北亚地区, 地理环境相近有关。

### 3.2 瘤胃纤毛虫属的检出率和组成比

总结了已报道荷斯坦牛瘤胃纤毛虫属检出率与组成比 (表 4), 与本研究结果比较发现, 中国荷斯坦牛中内毛属检出率 100%, 与日本 (Ito et al. 1994)、埃及 (Selim et al. 1996)、

利比亚 (Selim et al. 1999)、加拿大 (Imai et al. 1989) 报道的荷斯坦牛瘤胃纤毛虫内毛属的检出率结果完全一致。中国荷斯坦牛双毛属、等毛属、厚毛属的检出率与日本 (Ito et al. 1994)、埃及 (Selim et al. 1996)、加拿大 (Imai et al. 1989) 荷斯坦牛对应属的检出率结果相接近。日本 (Ito et al. 1994)、埃及 (Selim et al. 1996)、利比亚 (Selim et al. 1999) 荷斯坦牛中检出率高达 86% ~ 100% 的真双毛属在本次研究中检出率仅有 57%, 这与此次计算各属组成比时将具有争议的单甲属从真双毛属划分出来有关, 本研究中单甲属的检出率高达 100%。前毛属在

表 4 已报道荷斯坦牛瘤胃纤毛虫属的检出率和组成比 (%)

Table 4 Detectable frequency and percentage composition of rumen ciliate genera in Holstein Cows around the world

属 Genus	日本 Japan (Ito et al. 1994)		埃及 Egypt (Selim et al. 1996)		利比亚 Libya (Selim et al. 1999)		加拿大 Canada (Imai et al. 1989)	
	检出率 Frequency	组成比 Percentage	检出率 Frequency	组成比 Percentage	检出率 Frequency	组成比 Percentage	检出率 Frequency	组成比 Percentage
内毛属 <i>Entodinium</i>	100.0	80 ± 12.3	100.0	64.0	100.0	73.0	100.0	82.6 ± 6.8
双毛属 <i>Diplodinium</i>	71.2	2.4 ± 4.6	71.0	3.8	33.0	0.8	80.0	0.5 ± 0.5
真双毛属 <i>Eudiplodinium</i>	96.0	4.7 ± 3.7	86.0	6.5	100.0	7.4	—	—
硬甲属 <i>Ostracodinium</i>	89.6	2.0 ± 1.9	71.0	3.1	100.0	2.6	90.0	1.9 ± 1.7
后毛属 <i>Metadinium</i>	49.6	0.5 ± 0.8	29.0	1.2	22.0	0.3	—	—
前毛属 <i>Epidinium</i>	29.6	2.0 ± 5.3	100.0	7.5	100.0	12.0	—	—
头毛属 <i>Ophryoscolex</i>	9.6	0.1 ± 0.3	—	—	—	—	70.0	0.8 ± 0.8
等毛属 <i>Isotricha</i>	83.2	1.6 ± 1.6	71.0	3.4	22.0	0.4	100.0	1.4 ± 0.8
厚毛属 <i>Dasytricha</i>	80.8	2.8 ± 3.1	100.0	7.9	33.0	0.6	100.0	6.8 ± 4.4
单甲属 <i>Eremoplastron</i>	—	—	—	—	—	—	50.0	0.8 ± 1.3
双甲属 <i>Diploplastron</i>	—	—	—	—	—	—	40.0	0.4 ± 0.7
多甲属 <i>Polyplastron</i>	34.4	0.2 ± 0.3	29.0	1.4	—	—	50.0	0.4 ± 0.5
鞘甲属 <i>Elytroplastron</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
寡等毛属 <i>Oligoisotricha</i>	21.6	0.7 ± 1.9	—	—	—	—	—	—
<i>Microcetus</i>	1.6	0.1 ± 0.4	—	—	—	—	—	—
端毛属 <i>Charonina</i>	65.6	1.0 ± 1.5	14.0	1.1	—	—	90.0	0.4 ± 1.5
原始纤毛属 <i>Eodinium</i>	79.2	2.0 ± 1.7	—	—	78.0	2.9	90.0	3.1 ± 3.2
<i>Enoploplastron</i>	4.0	0.1 ± 0.4	—	—	—	—	40.0	0.9 ± 2.0

埃及与利比亚的荷斯坦牛瘤胃纤毛虫报道中, 属的组成比均以均值呈现而非均值 ± 标准差; 加拿大的荷斯坦牛瘤胃纤毛虫报道中将单甲属从真双毛属划出; —. 未检出。

Percentage composition of genera in reports of Holsteincow rumen ciliates from Egypt and Libya are presented as means only and not as Mean ± SD; Canada study delineated the genus *Eremoplastron* from the genus *Eudiplodinium*; —. Not detected.



本研究中检出率为 48%，略高于日本 (Ito et al. 1994) 的 29%，而该属在埃及 (Selim et al. 1996) 和利比亚 (Selim et al. 1999) 的报道中检出率却达到 100%。另外，本研究中低检出率的后毛属和多甲属在其他四个地区的报道中检出率也只有 20%~50% (Imai et al. 1989, Ito et al. 1994, Selim et al. 1996, 1999)。鞘甲属仅在本研究中以 2% 的检出率检出。其它四个地区 (Imai et al. 1989, Ito et al. 1994, Selim et al. 1996, 1999) 中报道的端毛属 (*Charonina*)、原始纤毛属 (*Eodinium*)、寡等毛属 (*Oligoisotricha*)、*Microcetus* 属和 *Enoploplastron* 属在本研究中均未见，这可能与本研究调查样品数量较少有关。

本研究内毛属组成比高达 84%，这与日本 (Ito et al. 1994) 和加拿大 (Imai et al. 1989) 的结果相似，埃及 (Selim et al. 1996) 和利比亚 (Selim et al. 1999) 荷斯坦牛瘤胃纤毛虫内毛属组成比也有 64% 和 73%。本研究中其他属瘤胃纤毛虫的组成比皆不足 5%，与日本地区 (Ito et al. 1994) 荷斯坦牛的结果十分相似，而利比亚 (Selim et al. 1999)、埃及 (Selim et al. 1996)、加拿大 (Imai et al. 1989) 地区的报道中，除内毛属外均有组成比超过 5% 的属。

综上所述结果表明，荷斯坦牛瘤胃中常见纤毛虫属为内毛属、等毛属、厚毛属、双毛属和硬甲属。其中，优势属为内毛属，组成比在 60%~90% 之间。前人的研究表明，内毛属尤其在饲喂富含精料的反刍动物瘤胃中生长迅速，组成比和密度会更高 (Hungate 1966)。此外，内毛属还是非常重要的细菌捕食者，每个内毛属瘤胃纤毛虫每小时捕食超过  $10^5$  个细菌，对于防止瘤胃内细菌爆发式发酵，降低 pH，防止瘤胃内酸中毒有着重要意义 (Williams et al. 1993)。等毛属和厚毛属在瘤胃环境中优先摄取淀粉，它们在瘤胃中占比一般不高，但出现频率高 (冯仰廉 2004)。单甲属与真双毛属的划分存在争议，单甲属最早由 Kofoid 等 (1932) 建立，然而 Dehority (2003) 与 Hungate

(1978) 对该属的划分产生了不同意见，因而本研究所观察到的单甲属的两个代表物种 *Eremoplastron dilobum* 和 *E. rostratum* 未被归为真双毛属中。前毛属、真双毛属、硬甲属、双毛属和后毛属的瘤胃纤毛虫具有纤维素分解活性并能摄取许多植物碎片 (Imai 1988)，宿主饲养方式和饲料类型的不同导致这些属的数量和占比受影响。因此不同地区荷斯坦牛瘤胃纤毛虫属和种的组成及组成比的差异可能受宿主的地域分布、宿主瘤胃内 pH 值、宿主动物摄食习惯、饲喂方式、饲料类型与量、饲喂频率等多因素的影响 (Gürelli 2016, Vdacný 2018)。

## 参 考 文 献

- Baraka T A. 2012. Comparative studies of rumen pH, total protozoa count, generic and species composition of ciliates in camel, buffalo, cattle, sheep and goat in Egypt. *Journal of American Science*, 8(2): 448–462.
- Berber B, Gürelli G. 2019. Rumen ciliate fauna of domestic sheep in Kastamonu, Turkey, and infraciliature of *Diplodinium quinquespinosum*, *Metadinium affine*, and *M. tauricum* (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae). *Zootaxa*, 4695(6): 550–558.
- Bonhomme A. 1990. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Animal Feed Science and Technology*, 30(3): 203–266.
- Cedrola F, Rossi M F, Dias R J P, et al. 2015. Methods for taxonomic studies of rumen ciliates (Alveolata, Ciliophora): A brief review. *Zoological Science*, 32(1): 8–15.
- Coleman G S. 1967. The metabolism of the amino acids of *Escherichia coli* and other bacteria by the rumen ciliate *Entodinium caudatum*. *Journal of General Microbiology*, 47(3): 449–464.
- Dehority B A. 1974. Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (*Alces americana*), musk-ox (*Ovibos moschatus*) and dall mountain sheep (*Ovis dalli*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 21(1): 26–32.
- Dehority B A. 2003. *Rumen Microbiology*. 2nd ed. Nottingham: Nottingham University Press, 372.
- Dogiel V A. 1927. Monographie der familie Ophryoscolecidae. *Archiv für Protistenkunde*, 59: 1–288.
- Feng J M, Jiang C Q, Sun Z Y, et al. 2020. Single cell transcriptome sequencing of rumen ciliates provides insight into their molecular



- adaptations to the anaerobic and carbohydrate-rich rumen microenvironment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 143: 106687.
- Gocmen B, Sezgin Y. 2006. Rumen ciliate, *Ophryoscolex purkynjei* Stein, 1858 (Sensu Göçmen, 1999) of the domestic goats (*Capra hircus*) in Northern Cyprus. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(3): 246–251.
- Gruby D, Delafond H M O. 1843. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans l'intestins, pendant la digestion des animaux herbivores e carnivores. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 17: 1304–1308.
- Gui R, Su N R, Hua Z X, et al. 2000. Rumen ciliated protozoan fauna of the yak (*Bos grunniens*) in China with the description of *Entodinium monuon*.sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(2): 178–182.
- Gürelli G. 2016. Rumen ciliates of domestic cattle (*Bos taurus taurus*) in Kastamonu, Turkey with the description of a new species. *European Journal of Protistology*, 56: 51–59.
- Gürelli G, Daw A F O E. 2020. Endosymbiotic ciliated protozoan biota of dromedary camels and domestic cattle in Tunisia. *Zootaxa*, 4859(3): 409–418.
- Hungate R E. 1966. The rumen and its microbes. New York: Academic Press, 91–147.
- Hungate R E. 1978. The rumen protozoa. London: Academic Press, 655–695.
- Imai S. 1988. Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. *The Journal of protozoology*, 35(1): 130–136.
- Imai S, Han S S, Cheng K J, et al. 1989. Composition of the rumen ciliate population in experimental herds of cattle and sheep in Lethbridge, Alberta, Western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(7): 686–690.
- Imai S, Oku Y, Morita T. 2004. Rumen ciliate protozoal fauna of reindeer in Inner Mongolia, China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(2): 209–212.
- Ito A, Imai S, Ogimoto K. 1994. Rumen ciliate composition and diversity of Japanese beef black cattle in comparison with those of Holstein-Friesian cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56(4): 707–714.
- Ito A, Imai S. 1998. Infraciliary bands in rumen ophryoscolecoid ciliate, *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(6): 628–636.
- Ito A, Imai S. 2005. Infraciliature and morphogenesis in three rumen *Diplodinium* ciliates, *Diplodinium polygonale*, *Diplodinium leche*, and *Diplodinium nanum*, observed by light microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(1): 44–51.
- Kofoid C A, MacLennan R F. 1932. Ciliates from *Bos indicus* Linn. II. A revision of *Diplodinium Schuberg*. University of California Publications in Zoology, 37(5): 53–152.
- Kurihara Y, Eadie J M, Hobson P N, et al. 1968. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep tureen. *Journal of General Microbiology*, 51(2): 267–288.
- Newbold C J, De La Fuente G, Belanche A, et al. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1313.
- Selim H M, Imai S, Sheik A K, et al. 1999. Rumen ciliate protozoal fauna of native sheep, friesian cattle and dromedary camel in Libya. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(3): 303–305.
- Selim H M, Imai S, Yamato O, et al. 1996. Comparative study of rumen ciliates in buffalo, cattle and sheep in Egypt. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(8): 799–801.
- Sylvester J T, Karnati S K, Yu Z, et al. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *The Journal of Nutrition*, 134(12): 3378–3384.
- Vdácny P. 2018. Evolutionary associations of endosymbiotic ciliates shed light on the timing of the marsupial-placental split. *Molecular Biology and Evolution*, 35(7): 1757–1769.
- Williams A G, Coleman G S. 1992. The rumen protozoa. New York: Springer, 6–80.
- Williams A G, Joblin K N, Butler R D, et al. 1993. Interactions bactéries-protistes dans le rumen. *Année Biologique*, 32(1): 13–30.
- 冯仰康. 2004. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社, 46–74.
- 桂荣. 1992. 放牧绵羊瘤胃纤毛虫种类分布及补饲对它的影响. *畜牧兽医学报*, 23(4): 372–378.
- 桂荣, 赵青余, 那日苏, 等. 2005. 中国水牛瘤胃纤毛虫分布与挥发性脂肪酸的研究. *畜牧兽医学报*, 36(12): 1286–1291.
- 梁桂荣, 田发益, 邢东义, 等. 2014. 西藏林芝地区藏羊瘤胃纤毛虫初步分类鉴定. *甘肃畜牧兽医*, 44(7): 26–28.
- 刘景喜, 韩静, 潘振亮, 等. 2013. 不同月龄荷斯坦犊牛瘤胃纤毛虫计数及形态观察. *饲料研究*, (2): 38–41.
- 田发益, 李晓忠, 巴平, 等. 2010. 西藏农区黄牛主要瘤胃微生物及瘤胃液物质特征值. *中国兽医学报*, 30(9): 1239–1244.
- 中国奶业协会. 2005. NY/T 34-2004 奶牛饲养标准. 北京: 中国农业出版社.