

结肠小袋纤毛虫滋养体体外成囊条件的筛选和优化

何 凯, 闫文朝, 孙晨阳, 赵立卓, 王天奇

摘要:目的 筛选和优化结肠小袋纤毛虫滋养体体外形成包囊的条件。**方法** 设定不同动物粪便、孵育液、pH 值、 Ca^{2+} 浓度、温度、静置和振荡培养等不同条件, 孵育 24 h 观察其成囊情况。另外, 用体外形成的包囊接种给仔猪, 验证其感染性。**结果** 滋养体在新鲜的正常猪粪便和鸡粪便中, 于 37 °C、28 °C、15 °C~20 °C 和 -11 °C~-2 °C 环境下, 均没观察到包囊形成; 在不含小牛血清和淀粉的蒸馏水、生理盐水、PBS 溶液以及 DMEM 培养基中孵育, 镜检发现在生理盐水 (pH 6.5) 和 PBS 中存在大量滋养体和少量早期包囊出现; 在 pH 值 3~5 之间的生理盐水中包囊的形成数量明显增加, 28 °C 环境下平均成囊率达到 38.9%, 相同 pH 值范围的蒸馏水却没发现包囊和滋养体。 Ca^{2+} 浓度、温度、振荡和静置培养等因素对体外成囊效果均没有明显影响。两头仔猪接种包囊后第 4 d, 均在粪便中检出该虫滋养体。**结论** 在 15 °C~28 °C, pH 值 3~5 的不含小牛血清和淀粉的生理盐水中是结肠小袋纤毛虫体外成囊的适宜条件。

关键词:结肠小袋纤毛虫; 滋养体; 包囊; 体外成囊; pH 值

中图分类号:S855.9

文献标识码:A

文章编号:1004-2694(2020)06-0434-05

Screening and optimization of encystation conditions of *Balantiooides coli* trophozoite *in vitro*

HE Kai, YAN Wen-chao, SUN Chen-yang, ZHAO Li-zhuo, WANG Tian-qi

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: In order to screen and optimize the encystation conditions of *Balantiooides coli* trophozoites *in vitro*, different conditions including animal feces, incubation solutions, pH values, Ca^{2+} concentration, temperature, static and shaking culture were assayed, and the encystation of *B. coli* was observed after incubating 24 hours. In addition, piglets were inoculated with formed cysts *in vitro* to verify their infectivity. The trophozoites were added to fresh normal pig and chicken feces at 37 °C, 28 °C, 15 °C~20 °C and -11 °C~-2 °C, respectively. Results showed that there were no cysts observed in each group. When incubating in distilled water, 0.9% saline solution, PBS solution, DMEM medium without calf serum and starch, the presence of numerous trophozoites and few early stage cysts in saline solution (pH 6.5) and PBS were found by microscopic examination. The amount of formed cysts incubated in pH 3~5 saline solution was significantly increased, with the average encystation rate of 38.9% at 28 °C. However, no cysts and trophozoites were found in the distilled water with the same pH range. Ca^{2+} concentration, temperature, shaking and static culture have no significant effect on the encystation of *B. coli* trophozoite *in vitro*. Subsequently, trophozoites of *B. coli* were detected in the feces of two piglets on the 4th day after inoculating cysts. In conclusion, the saline solution of pH 3~5 without calf serum and starch is a suitable condition for the formation of cysts *in vitro* at 15 °C~28 °C.

Keywords: *Balantiooides coli*; trophozoite; cysts; encystation *in vitro*; pH values

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31772733)

Corresponding author: Yan Wen-chao, Email: ywchao11@126.com

国家自然科学基金项目(No.31772733)

通讯作者:闫文朝, Email: ywchao11@126.com;

ORCID: 0000-0002-7899-3386

作者单位:河南科技大学动物科技学院,洛阳 471023

结肠小袋纤毛虫 (*Balantiooides coli*, 简称小袋虫) 是一种常见的人兽共患寄生性原虫, 寄生于人和猪等宿主的结肠和盲肠, 主要引起腹泻^[1-3], 偶尔可以引起人的泌尿生殖道、肺脏等肠外感染^[4-6]。结肠

小袋纤毛虫的发育过程可分为滋养体和包囊2个阶段,在猪和豚鼠等动物的盲肠和结肠内以滋养体形式存在,在直肠和排出的新鲜粪便中能发现大量滋养体和少量包囊,其中随粪便排出的滋养体在体外干燥等逆环境下,大多滋养体崩解死亡,还有一部分会形成具有感染活性的包囊^[1-2]。宿主直肠内和体外的逆环境因素能促使小袋虫滋养体形成包囊。

目前小袋虫已经成功建立了滋养体体外人工培养技术,可以实现持续稳定的体外扩增和传代^[7-9],但是小袋虫滋养体的体外人工成囊条件尚未报道,进而阻碍了对小袋虫致病性的研究。既往研究证实^[10-13],四膜虫(*Tetrahymena rostrata*)、贻贝棘尾虫(*Stylonychia mytilus*)和似组毛虫(*Histrichulus similis*)等纤毛虫在体外干燥、温度骤变、饥饿或缺乏必要营养物质等不利条件下能形成包囊,当体外恢复最佳生长培养条件时又会脱囊逸出。因此,本研究参考其他纤毛虫成囊条件^[10-12],通过体外筛选与优化小袋虫滋养体成囊条件,为研究小袋虫的感染性和致病性提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 虫株 采自洛阳市伊川县某猪场自然发病猪的新鲜粪便,带回实验室镜检发现大量运动活跃的滋养体,然后用已报道的改进型DMEM培养基于28℃恒温箱内进行体外培养扩增和传代^[9,14],镜检取滋养体密度大的培养物进行后续体外成囊条件筛选与优化试验。

1.2 试验动物 30 d龄的断奶仔猪3头,购自洛阳市伊川县某猪场,接种前对其进行连续粪检3d,确定无结肠小袋纤毛虫滋养体、包囊后,隔离饲养待用。

1.3 小袋虫滋养体体外成囊试验设计

1.3.1 动物粪便的筛选 采集新鲜的正常猪粪便和鸡粪便,镜检小袋虫均为阴性。设置8组,1~4组每组加入5 g猪粪便,5~8组每组加入5 g鸡粪便,然后每组加入2 000个滋养体搅拌混匀后,将猪粪便和鸡粪便的4个组依次置于37℃温箱、28℃温箱、室内(15℃~20℃)和室外(-11℃~-2℃)环境中,孵育24 h后,粪便直接涂片法在10倍物镜下镜检。为避免漏检,需对阴性样品重复制片镜检3次,未见包囊者方可判为阴性。

1.3.2 孵育液的筛选 选取蒸馏水、0.9%生理盐水、PBS、DMEM培养基为孵育液,4种孵育液均不加小牛血清和淀粉,每种孵育液组设置3个重复,每个重复溶液体积为1 mL,每个重复加入2 000个滋

养体混匀后,置于28℃恒温箱内孵育24 h后,镜检是否有包囊形成,并显微测量包囊或滋养体的大小。

1.3.3 Ca²⁺浓度的筛选 选择蒸馏水和生理盐水为孵育液,配制0.2 mol/L CaCl₂储存液,参考有关文献[7],每种孵育液设置0.02、0.04、0.06、0.08、0.16 mol/L共6个梯度,每个梯度加入2 000个滋养体,总体积为1 mL,混匀置于28℃恒温箱内孵育24 h后,镜检Ca²⁺浓度对小袋虫成囊的影响情况。

1.3.4 pH值的优化 首先用蒸馏水配制5%(v/v)醋酸和10%(m/v)氢氧化钠溶液,用于调节pH值。选取蒸馏水和0.9%生理盐水为孵育液,每种孵育液设置pH为1-10共10个梯度,每个梯度加入2 000个滋养体混匀后,置于28℃恒温箱内孵育24 h后,镜检并显微测量包囊或滋养体的大小,按照1.4部分的方法计算成囊率。

1.3.5 温度的优化 选取0.9%生理盐水为孵育液,用5%醋酸调节pH至4,设置室外(-11~-4℃)、室温(15~20℃)、28℃、37℃4个孵育温度,每个温度3个重复,每个重复样品中加入2 000个滋养体混匀后,分别放置室外、室温、28℃和37℃温箱孵育24 h后,镜检,观察温度对成囊的影响。

1.3.6 静置和振荡培养的影响 选取0.9%生理盐水为孵育液,用5%醋酸调节pH至4,将1 mL pH4的生理盐水加入1.5 mL无菌离心管中,然后加入2 000个滋养体混匀,放入28℃的恒温箱和转速为120 r/min的28℃恒温摇床内孵育24 h后,镜检,观察静置和振荡培养对成囊的影响。静置和振荡培养分别设置3个重复。

1.4 小袋虫滋养体成囊率的计算 为评价1.3中不同条件下小袋虫滋养体成囊效果,参考有关文献[14],我们用倍比稀释法来计数包囊数量,然后根据公式计算小袋虫滋养体成囊率。孵育24 h后,如果镜检观察到包囊,用微量移液器吸取100 μL混匀的孵育悬液,用生理盐水10倍稀释后,取20 μL稀释悬液滴于载玻片上,于4倍物镜下计完20 μL稀释悬液中包囊数量n,然后换算出每毫升孵育悬液中包囊数量N=n×50×10。由于上述每个重复或组中加入的滋养体数量均为2 000,因此,计算成囊率A=(N/2000)×100%即可。

1.5 动物接种试验 用无小袋虫断奶仔猪3头,编号1~3号,1、2号仔猪用导胃管灌服2×10⁴个体外成囊的小袋虫包囊悬液,3号仔猪接种生理盐水作为阴性对照。接种后第3 d开始连续粪检1周,看是否排出小袋虫滋养体或包囊^[15]。

1.6 数据处理与分析 试验数据用EXCEL整理,

用 SPSS 17.0 统计软件中的 One-way ANOVA 方法对不同孵育液、 Ca^{2+} 浓度、pH 值、温度、静置和振荡培养处理组小袋虫滋养体成囊率进行统计分析, 检验水准 α 为 0.05 或 0.01。

2 结 果

2.1 小袋虫滋养体体外成囊条件的优化结果

2.1.1 动物粪便筛选 将滋养体与猪和鸡的正常粪便混合孵育 24 h 后, 室温($15^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$)、 28°C 和 37°C 下均没有发现形成包囊, 只在 28°C 的猪粪便中观察到少量滋养体, 其他各组中均没发现滋养体, 48 h 后, 28°C 的猪粪便中也观察不到滋养体。

孵育液筛选试验结果显示, 孵育 24 h 后, 蒸馏水组中既没有观察到包囊, 也没看到滋养体; 生理盐水组和 PBS 组中看到大量的滋养体和少量的早期包囊; DMEM 组中观察到大量滋养体, 没有包囊形成(表 1)。

表 1 小袋虫滋养体体外成囊孵育液的筛选结果

Tab.1 Screening results of incubation solution of *B.coli* trophozoite encysted *in vitro*

组别 ^a	包囊	滋养体	成囊率(%)
蒸馏水(pH6.5)	—	—	0
0.9%生理盐水(pH6.5)	+	+	$16.4 \pm 2.5^{\circ}$
PBS(pH7.2)	+	+	$5.7 \pm 1.3^{\circ}$
DMEM(pH7.2)	—	+	0

注:a 为 4 种孵育液不加血清和淀粉;与蒸馏水组相比,
①:成囊率差异有统计学意义($P < 0.05$);②:成囊率差异有
统计学意义($P < 0.01$)。

2.1.2 Ca^{2+} 浓度筛选 结果显示, 含不同 Ca^{2+} 浓度的蒸馏水中均没有观察到包囊和滋养体; 含不同 Ca^{2+} 浓度的生理盐水中能观察到少量早期包囊, 不同 Ca^{2+} 浓度组的成囊率差异无统计学意义($F = 0.369, P > 0.05$)(表 2)。

2.1.3 pH 值对小袋虫滋养体成囊影响的验证 在 10 个梯度的 pH 值的蒸馏水和生理盐水中的滋养体经过 24 h 的孵育, 镜检结果显示, pH 值在 1~10 的蒸馏水中均没观察到滋养体和包囊; pH 值 2~7 的生理盐水中均观察到包囊, 其中 pH 值 3~5 的生理盐水中包囊比例升高($F = 39.926, P < 0.01$), 平均成囊率高达 33.7%, 而 pH 值 1 和 8~10 的生理盐水中观察不到包囊和滋养体(表 3)。

表 2 小袋虫滋养体体外成囊 Ca^{2+} 浓度筛选结果

Tab.2 Ca^{2+} concentration screening results of *B.coli* trophozoite encysted *in vitro*

Ca^{2+} 浓度 mol/L	成囊率(%)	
	蒸馏水 ^b	0.9%生理盐水
0	0	14.8 ± 1.9
0.02	0	14.3 ± 1.5
0.04	0	15.3 ± 2.4
0.06	0	15.9 ± 1.8
0.08	0	15.6 ± 2.3
0.16	0	16.4 ± 2.8

注:b 为在不同 Ca^{2+} 浓度的蒸馏水中均没观察到滋养体和包囊。

表 3 小袋虫滋养体体外成囊 pH 值的优化结果

Tab.3 pH optimization results of *B.coli* trophozoite encysted *in vitro*

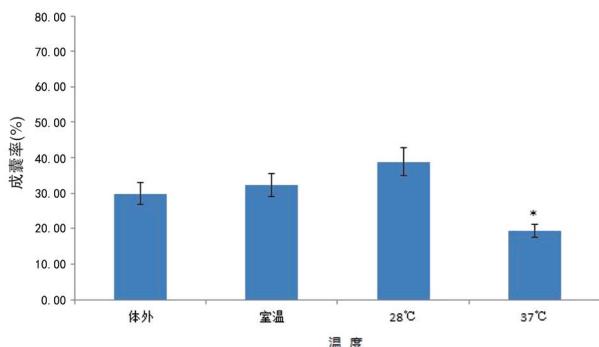
pH 值	成囊率(%)	
	蒸馏水 ^c	0.9%生理盐水
1	0	0
2	0	$17.3 \pm 1.5^{\circ}$
3	0	$32.3 \pm 3.5^{\circ}$
4	0	$38.9 \pm 4.5^{\circ}$
5	0	$34.6 \pm 2.8^{\circ}$
6	0	$16.2 \pm 2.2^{\circ}$
7	0	12.2 ± 1.3
8	0	0
9	0	0
10	0	0

注:c 为在不同 pH 值的蒸馏水中均没观察到滋养体和包囊;与 pH7 生理盐水组相比,①:成囊率差异有统计学意义($P < 0.05$);②:成囊率差异有统计学意义($P < 0.01$)。

成囊温度优化结果显示, 室外($-11^{\circ}\text{C} \sim -4^{\circ}\text{C}$)、室温($15^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$)、 28°C 组的成囊率明显高于 37°C 组($F = 62.143, P < 0.05$), 而室外($-11^{\circ}\text{C} \sim -4^{\circ}\text{C}$)、室温($15^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$)、 28°C 组间的成囊率差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1)。说明 $15^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 是小袋虫滋养体成囊的适宜温度。

另外, 静置孵育和振荡孵育均有包囊形成, 但二者的成囊率差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明溶液中的氧含量对小袋虫的成囊影响不明显。

2.2 体外成囊的显微镜观察结果 在不加小牛血清和淀粉的 pH 2~7 的生理盐水中, 小袋虫滋养体

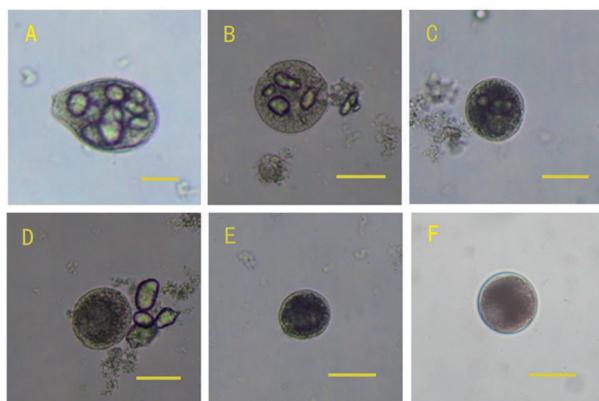


注:体外: -11 ℃ ~ -4 ℃; 室温: 15 ℃ ~ 20 ℃; 与 28 ℃ 组相比,
*: 成囊率有统计学差异($P < 0.05$)。

图 1 小袋虫滋养体体外成囊温度的优化结果

Fig.1 Temperature optimization results of *B.coli* trophozoite encysted *in vitro*

形成的包囊主要有两种,一种呈球形褐色,壁明显、光滑无纤毛,静止不运动的成熟包囊,大小为 48.9 μm ~ 60.3 μm ,相对于滋养体,体积缩小;另一种是内含淀粉颗粒、颜色较浅、壁较薄的球形早期包囊,大小为 53.5 μm ~ 85.8 μm ,相对于成熟包囊,体积较大(图 2)。而在改进型 DMEM 培养基中培养的滋养体多呈不对称的卵圆形,前端稍尖,有一明显胞口,后端钝圆,也有其他形状,大小为 (32.4 ~ 130.6) $\mu\text{m} \times (23.5 ~ 121.3) \mu\text{m}$;周围布满不停摆动的纤毛,带动滋养体做旋转向前运动;内部存在大量淀粉颗粒和大核等结构,与前面两种包囊形态结构和大小上明显不同。



注:图片中刻度尺代表 50 μm (200 倍)

图 2 pH 值 3~5 的生理盐水中小袋虫滋养体(A)、早期包囊(B)和成熟包囊(C~F)

Fig.2 Different stage of *B.coli* in saline solution with pH 3~5: trophozoite stage (A); early stage cyst (B); mature stage cyst (C~F). Bar=50μm(200×)

2.3 动物接种试验结果 在接种后第 4 d, 开始在 1

号和 2 号仔猪的性状变稀的粪便中发现少量滋养体(图 3),没有发现包囊,一直持续到试验结束。在整个试验过程中,作为对照的 3 号仔猪没有排出滋养体与包囊。说明体外形成的包囊具有感染活性。

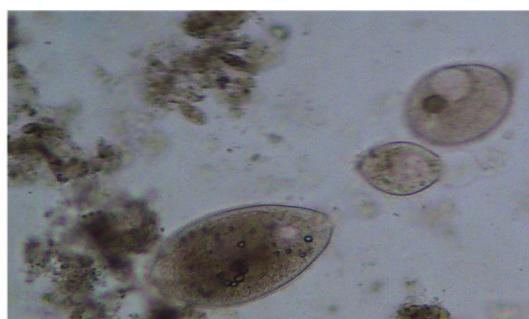


图 3 接种包囊的仔猪排出小袋虫滋养体(200 倍)

Fig.3 Trophozoites of *B.coli* in feces of piglets inoculated with cysts (200×)

3 讨论

小袋虫病是一种食源性人兽共患寄生虫病,也是猪场最常见的寄生虫病之一,是断奶仔猪腹泻的常见病因,严重影响断奶仔猪的成活率和生长速度,给猪场带来巨大的经济损失^[14~17]。小袋虫病对动物的致病性主要是根据猪场自然感染病例临床观察的初步结果,由于目前小袋虫滋养体体外人工成囊尚未实现,不能获取大量感染性包囊用于动物感染试验,导致对小袋虫的感染性和致病性的理解比较模糊。本研究通过不同动物粪便、不含血清和淀粉的孵育液、钙离子浓度、pH 值、温度、氧含量等条件的筛选和优化,最终发现,不含血清和淀粉的 pH 值为 3~5 的 0.9% 生理盐水与小袋虫滋养体在 15 ℃ ~ 28 ℃ 孵育,可形成大量的包囊,这些结果对进一步研究小袋虫感染性和致病性提供有效途径。

大多数纤毛虫遇到饥饿、温度骤变、湿度变化、虫体密度过高、代谢产物浓度过高、钙离子浓度、酸碱度和氧含量变化等不利因素,会形成休眠性包囊,其中饥饿和温度变化被认为是纤毛虫成囊的主要原因^[13,18]。在包囊形成过程中,要经历细胞内大量水分流失,细胞皮层的纤毛器、毛基体和微管结构会全部或部分被吸收,细胞质团缩化和核物质浓缩,细胞合成和分泌一些物质形成包囊壁,最后形成球形包囊,其最明显的一个变化就是体积缩小大约 60% ~ 80%^[18]。据报道,将包囊游仆虫(*Euplotes encysticus*)接入食物耗尽的培养液中,在不提供食物的情况下 1~2 h 后即可形成包囊^[13]。生活在土壤中的僧帽肾形虫(*Colpoda cucullus*)夜间在土壤湿润时

正常活动,白天在地表露水干涸前形成包囊^[19]。在饥饿状态下,四膜虫(*Tetrahymena rostrata*)在18℃~25℃成囊达到高峰,10℃时,成囊效率开始下降,5℃时成囊停止^[10]。营寄生生活的多子小瓜虫在鱼皮肤和鳃上是以滋养体形式存在,离开鱼体在水中是包囊形式存在^[13]。会造成人类感染的棘阿米巴(*Acanthamoeba*)遭受营养缺乏或渗透压力时,也会启动分化过程形成包囊,使其能够在恶劣的条件下生存,并抵抗消毒药物的杀伤^[21]。寄生于人、猪和豚鼠等宿主的盲肠和结肠内小袋虫以滋养体形式存在,而到直肠和体外会形成休眠性包囊,是其自我保护的一种生存策略,有利于小袋虫在动物和人群中的传播和存在^[1-2,13]。

本研究发现,在小袋虫滋养体转化为包囊过程中,饥饿环境和pH值是影响小袋虫成囊的主要因素。小袋虫滋养体在不含血清和淀粉的接近中性的生理盐水中孵育能形成少量的早期包囊,当改变孵育液生理盐水的pH值为3~5时,成囊率明显提高,并且可以看到典型的成熟包囊。但是过高或过低的pH值的孵育环境会快速将滋养体杀死而来不及形成包囊。研究发现^[9],改进型DMEM培养基pH在6.5~7.4小袋虫滋养体生长良好,但是pH值低于6或高于8时,滋养体数量和活性明显下降,逐渐崩解消失,却不会形成包囊。其原因可能是:虽然DMEM培养液的pH值低于6或高于8不利于滋养体生长,但是培养体系中依然有小牛血清、淀粉和其他营养成分,不是一个饥饿环境,使滋养体也不能形成包囊。而不含血清和淀粉的生理盐水仅仅维持一个正常的渗透压,可以营造一个饥饿环境,再加上pH值为3~5的不利环境,更有利于滋养体形成包囊。在pH值低于2和高于8的不含血清和淀粉的生理盐水中滋养体也不能形成包囊,其原因可能是孵育体系酸碱度过高或过低,快速将滋养体杀死而来不及形成包囊。Fouque等^[22]通过调节培养基中KCl浓度研究渗透压对哈曼属(*Hartmannella*)阿米巴虫的成囊机制的影响时,镜下观察发现若孵育环境缺乏KCl,细胞会发生膨胀并最终被溶解,当KCl浓度达到0.5 mol/L时,细胞会严重收缩,从而抑制了包囊的形成。说明渗透压也是影响包囊形成的重要因素。另外,本研究用相同pH值范围的蒸馏水与小袋虫滋养体共孵育,不仅不能形成包囊,而且也看不到滋养体。更加证实了低渗环境不利于滋养体的存活和形成包囊。

在本研究中发现,环境温度、钙离子浓度和氧含量的变化对小袋虫成囊没有明显影响,其中温度的

改变却是大部分纤毛虫形成包囊的主要原因^[13,18]。另外,我们在小袋虫滋养体体外培养过程中发现,长期不更换培养液,使培养液“老化”,不会形成包囊,反而滋养体逐渐崩解死亡。总之,这些与其他相关纤毛虫的成囊条件不一致^[18-20],可能与纤毛虫的种类不同有关,具体原因有待进一步研究。

小袋虫滋养体体外人工成囊是否成功的2个标志是:是否具有包囊的典型特征;形成的包囊是否具有感染活性^[15,21]。为检验本研究体外形成包囊的感染性,本研究将体外形成的包囊悬液接种给断奶仔猪,从接种的两头仔猪粪便均检测到小袋虫滋养体,说明本研究体外形成的小袋虫包囊具有感染活性。成功实现小袋虫体外人工成囊试验将进一步研究小袋虫不同分离株的感染性和致病性提供有效途径。

利益冲突:无

引用本文格式:何凯,闫文朝,孙晨阳,等.结肠小袋纤毛虫滋养体体外成囊条件的筛选和优化[J].中国人兽共患病学报,2020,36(6):434-438,447. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.067

参考文献:

- [1] 宋铭忻,张龙现.兽医寄生虫学[M].北京:科学出版社,2009:301-303.
- [2] Schuster FL, Ramirez-Avila L. Current world status of *Balantiooides coli*[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(4): 626-638.
- [3] McLeod C, Smith P, McGuinness SL, et al. Human case of *Balantidium* infection in Australia [J]. Pathology, 2015, 47(6): 603-604. DOI:10.1097/pat.0000000000000313
- [4] Kapur P, Das AK, Kapur PR, et al. *Balantiooides coli* liver abscess: first case report from India[J]. J Parasit Dis, 2016, 40(1):138-40. DOI: 10.1007/s12639-014-0464-0
- [5] Kaur S, Gupta A. Urinary balantidiasis: A rare incidental finding in a patient with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Cytol, 2016, 33(3):169-171. DOI: 10.4103/0970-9371.188063
- [6] Anargyrou K, Petrikos GL, Suller MT, et al. Pulmonary *Balantiooides coli* Infection in a leukemic patient[J]. Am J Hematol, 2003, 73:180-183. DOI:10.1002/ajh.10336
- [7] Barbosa ADS, Pereira BOM, Uchoa CMA, et al. Isolation and maintenance of *Balantiooides coli* (Malmsteim, 1857) cultured from fecal samples of pigs and non-human primates[J]. Vet Parasitol, 2015, 210(3/4):240-245. DOI:10.1016/j.vetpar.2015.03.030
- [8] 黄维义,张为宇,陈宁,等.结肠小袋纤毛虫体外培养观察[J].中国人兽共患病学报,2004,20(9):794-796. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2004.09.017
- [9] 闫文朝,王天奇,丁轲,等. DMEM 培养结肠小袋虫的正交试验[J]. 动物医学进展, 2010,31(8):34-37. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2010.08.008

(下转第447页)