

草履虫单克隆培养种群增长趋势比较研究^{*}

唐发辉, 李 琴, 赵元君

(重庆师范大学 生命科学学院 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】筛选行之有效的草履虫(*Paramecium*)单克隆培养方法。【方法】结合形态学与 SPSS 统计学方法对 7 种单克隆培养方法下的草履虫种群增长趋势进行比较研究。【结果】采用稻草培养法、大米培养法、莴笋叶榨汁培养法、熟鸡蛋黄培养法、马铃薯培养法、玉米培养法、酸奶培养法等不同草履虫单克隆培养法培养的草履虫在单克隆培养过程中存在明显的时空量化关系及与之相关联的生殖方式。【结论】马铃薯培养法培养效果最差, 而莴笋叶榨汁培养法培养效果最好; 生殖方式直接影响草履虫的种群增长趋势。草履虫的单克隆培养不仅应该选择行之有效的方法, 还应掌握虫体在培养过程中的时空量化关系, 以保证对草履虫材料的足量需求。

关键词:草履虫; 单克隆培养; SPSS; 量化关系; 生殖方式

中图分类号:Q958.9

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)02-0028-06

在生物分类系统中,草履虫(*Paramecium*)隶属于原生动物亚界(Protozoa)纤毛门(Ciliophora),是一类自然环境中极为常见的自由生纤毛虫。在早期的原生动物学研究中,许多原生动物学家已对草履虫的形态结构、生殖发育及其他生物学特征等进行了深入探索和报道^[1-3]。草履虫具有单细胞的身体结构及各种发达特化的胞器,因此成为了细胞生物学中研究细胞膜结构、细胞核和其他细胞器功能的较为适宜的研究材料^[4-5]。后期因现代生物学技术的引入,尤其是分子生物学、基因组学等研究手段的介入,草履虫的基因组学奥秘也被科学家们逐渐揭示,早期有关它的形态结构及功能研究发现在基因层面得到了印证或新的解释。因此,作为草履虫的一个代表种,尾草履虫(*Paramecium caudatum*)现已成为动物学中被研究得较为透彻的典型模式动物^[6-10]。在中学或高校的生物学教学中,为了让学生更好更直观地了解原生动物的基本细胞结构、运动机理、各类胞器结构及功能等,草履虫常被做为重要的教学实验材料。此外,由于草履虫具有抗污性高、净化污水、吞噬细菌和单细胞藻类等习性,因而在环境保护科学研究中也常被用做进行环境监测和水质净化的生物活性材料^[11-13]。

迄今有关草履虫的培养方法已有许多报道^[14-16],不同培养方法的培养条件及培养效果各有差异。然而,如何在短时间内培养得到大量性状稳定的草履虫以及不同培养方法下草履虫时空变化及差异性的比较却鲜有报道。本研究选取了几种常见且效果相对较好的草履虫的单克隆培养方法,不仅从时空方面对这些方法进行了比较研究,同时还应用统计学方法对几种草履虫的单克隆培养方法进行差异性的比较研究,旨在筛选出最适宜且操作性较强的草履虫单克隆培养方法,以为教学科研的实验材料供给提供有效技术基础与参考资料。

1 材料和方法

1.1 草履虫的采集

实验用草履虫采自重庆大学城重庆师范大学三春湖的有机质丰富区(腐烂荷叶集中区域),重点采集靠近烂荷叶底部略带淤泥的水样,将水样带回实验室转入小烧杯里静置一段时间(4~5 h),即可进行虫体的分离与显微观察。

1.2 草履虫培养液的准备

本研究在已有部分培养液的基础之上进行了部分改进^[14-16],具体如下:

^{*} 收稿日期:2017-11-01 修回日期:2017-12-27 网络出版时间:2018-03-23 15:54

资助项目:国家自然科学基金(No.31672280;No.31471980)

第一作者简介:唐发辉,女,副教授,博士,研究方向为原生动物学,E-mail: trichodina@126.com;通信作者:赵元君,教授,E-mail: zhaoyuanjuncnu@126.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180323.1553.008.html>

1) 稻草培养液:选取干净稻草,洗净后剪成2~3 cm长的小段,取2 g稻草碎段和200 mL水,煮沸10 min,冷却后至室温,静置24 h后即可接种草履虫。

2) 大米培养液:取8粒大米置于200 mL凉开水中,静置24 h后即可接种草履虫。

3) 莴笋叶榨汁培养液:将新鲜莴笋叶10 g洗涤后捣碎进行过滤,并将过滤后的汁液加入到300 mL水中,煮沸后冷却即可用于草履虫的接种。

4) 熟鸡蛋黄培养液:称取0.2 g或黄豆粒大小的熟鸡蛋黄于烧杯中,并加入60 mL凉开水,用玻璃棒将蛋黄捣碎,使之充分溶解后即可接种草履虫。

5) 马铃薯培养液:称取40 g马铃薯,切成块状后煮沸15 min,使用纱布过滤,取滤液加水定容至200 mL,静置24 h后即可接种草履虫。

6) 玉米(芯)培养液:称取3 g新鲜玉米(芯),剪成小块状后置入300 mL水中,加热至沸腾,然后小火煮10 min,趁热用纱布滤去块状物,待滤液冷却,放置24 h后即可接种草履虫。

7) 酸奶培养液:将酸奶与凉开水以1:200的体积比调配后可直接用于接种。

以上培养液分装后均盖上4层纱布,以防止空气中的细菌等异物可以进入培养液。同时检测培养液的pH,使之保持中性略偏酸的环境,以为草履虫创造最适的生长环境。

1.3 草履虫的分离和接种

取装有1.1部分所述水样的小烧杯,在靠近杯壁底部淤泥处,采用毛细吸管吸出少量水样,滴加在干净载玻片上,置于Nikon SMZ 1500体视镜下进行显微检查。一旦发现草履虫,则用毛细吸管对草履虫进行清洗,然后逐个吸出,并将它分别接种于上述准备好的培养液中进行单克隆培养。每种培养方法平行重复3次,每种培养液均设置为相同的20 mL培养体系,且仅接种1只草履虫。

1.4 草履虫的培养

对选用的培养液设置好相同的培养条件,包括培养箱的温度、培养液的体积、培养液的pH等,然后进行草履虫的室内单克隆培养,并注意每天定时检查是否有异常情况的出现。

1.5 草履虫的显微观察与拍照

从培养的第1天开始,每天定时对各个培养液中的草履虫进行显微观察,观察它们形态的变化、运动情况、数量的变化、是否出现生殖现象以及生殖的类型等;所有的显微拍照均在NIKON E-600显微镜与NIKON数码CCD-1200下进行。

1.6 草履虫的计数

从培养的第1天开始,在不更新培养液的情况下,每天定时对每种培养液里的草履虫进行计数,具体计数方法为在每个样品中随机取10滴培养液,最后取每滴中草履虫的平均只数。当某种培养液中的草履虫的数量降低至0时,计数工作结束。

1.7 数据的处理与统计分析

上述获取的草履虫的显微照片采用PHOTOSHOP CS进行排版;所获得的数据采用Excel 2007进行数据整理及图表的制作;采用统计学软件SPSS 16.0对不同单克隆培养方法获得的所有数据进行自由分布检验,将符合非参数检验的数据进一步采用曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U Test)^[17]进行分析,其中当 $p \leq 0.05$ 时,说明比较组数据之间存在统计学意义上的差异。

2 研究结果

2.1 草履虫在单克隆培养过程中的数量变化

在单克隆培养过程中,草履虫在各种培养液中都能正常生长,并保持“草鞋状”的形态结构及正常的运动摄食状态(图1a-g)。在数量变化方面,从第1天接种的第1只草履虫开始,各种培养液中的虫体数量逐渐增长。到第5天时,所有培养液中草履虫的数量达到峰值;其中酸奶培养液中虫体数量最多,达到每滴40只,马铃薯培养液中虫体数量最少,仅有每滴14只。在第9天,马铃薯培养液中的草履虫数量变为0;此时,莴笋叶榨汁培养液中的虫体数量最多,达每滴25只(表1)。

由图2可知,在前5天内,各种培养液中的虫体数量在第3天均开始了指数的加速增长,尤其是酸奶培养液中虫体数量增长最快;熟鸡蛋培养法与其他方法存在差异,在第4天到第5天期间,用该方法培养的草履虫数

量变化不大;总体来看,在前 5 天内,各种培养液中的虫体数量都处于上升阶段。第 6 天时,各种培养液中的虫体数量均开始下降,其中稻草培养液中草履虫数量下降速度最快并在之后几天里下降速度趋缓,而其余几种方法在第 6 天到第 9 天期间下降速度均无较大变化。从图 2 还可看到,所有培养方法的虫体数量变化曲线中,仅有马铃薯培养法的虫体数量变化曲线峰值最低,位于所有拟合曲线的底部,因此该方法与其他几种方法对草履虫培养的效果存在明显的差异。

2.2 草履虫在单克隆培养过程中的生殖现象观察

在前 4 天的培养过程中,草履虫在各种培养液中均以无性生殖方式(横二分裂)进行繁殖,并未发现任何接合生殖体(图 1h-j)。到第 5 天时,在酸奶培养液和莴笋叶榨出汁培养液中出现了少量的接合生殖体。到第 6 天时,大米培养液和稻草培养液中也出现了少量的接合生殖体(图 1k-l);此时在稻草培养液中检测到上述两种生殖体,相继在其他培养液中也检测到少量的上述两种生殖体。第 7 天至第 9 天期间,大量的接合生殖体在各种培养液中出现,如玉米培养液中的第 9 天时出现了大量的接合生殖体;而无性生殖的横二裂生殖体越来越少,直至虫体全部死亡而消失,如马铃薯培养液中的情况。

2.3 不同草履虫单克隆培养方法的 SPSS 统计结果

表 2 显示:马铃薯培养法与其他 6 种培养法相比在草履虫培养效果方面存在统计学意义上的差异($p \leq 0.05$),其中莴笋叶榨出汁培养法与马铃薯培养法的草履虫培养效果在 $p < 0.01$ 水平上具有统计学意义;其他 6 种方法在草履虫培养效果上均无统计学意义上的差异。

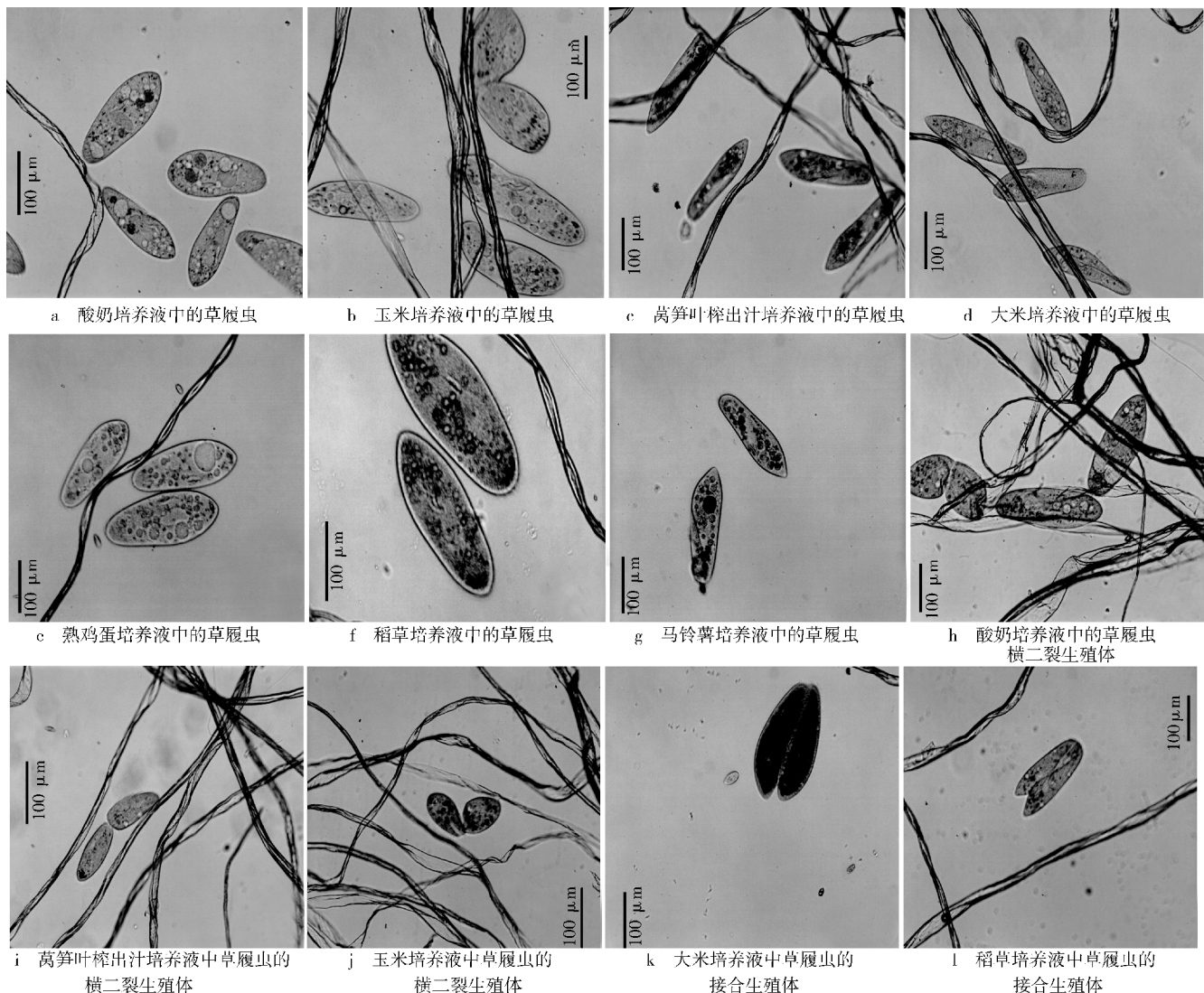


图 1 不同培养液中草履虫的显微照片

Fig. 1 Micrographs of *Paramecium* individuals in different culture medium

表 1 培养期内草履虫在不同培养液中的数量统计

Tab. 1 Quantity statistics of *Paramecium* species in different culture medium

只

时间	稻草培养液	大米培养液	莴笋叶榨出汁培养液	熟鸡蛋黄培养液	马铃薯培养液	玉米培养液	酸奶培养液
第 1 天	1	1	1	1	1	1	1
第 2 天	5±1.41	6±1.12	7±1.12	3±1.58	2±0.71	5±1.00	3±1.22
第 3 天	12±1.22	14±1.87	15±1.50	6±1.22	4±1.41	11±1.22	7±1.41
第 4 天	25±1.66	29±2.06	31±1.94	32±1.32	12±1.12	24±1.80	34±1.87
第 5 天	34±2.24	33±2.45	38±1.66	32±1.41	14±1.22	39±1.65	40±1.32
第 6 天	18±2.00	27±2.87	31±2.29	32±2.45	11±1.32	35±1.80	34±1.66
第 7 天	15±2.24	22±1.58	29±1.32	26±2.12	4±0.86	26±1.41	28±1.41
第 8 天	14±2.12	18±1.73	26±1.58	24±2.06	2±1.00	21±1.58	25±1.50
第 9 天	12±1.22	14±1.66	25±1.32	21±1.87	0	18±1.32	17±1.58

注:第 1 天为整个 20 mL 培养液中仅接种 1 只草履虫,其余天数均为每滴培养液中草履虫的平均只数;表中数据为“平均值±标准差”。

3 讨论与结论

3.1 不同草履虫单克隆培养法的时空量化关系

本研究发现,尽管草履虫的单克隆培养法不同,但在一个培养周期内或一个时间维度内,在不改变培养液成份及条件的前提下,草履虫的数量变化趋势均遵循共同的规律:指数加速增长长期一到达峰值或短期动态平衡期一下降期。这与已有的研究报道一致^[14,16]。另外,在同一时间内的不同空间范围内,不同的培养方法的虫体数量却差异较大:用马铃薯培养法得到的虫体数量一直是所有方法中最低的,用酸奶与莴笋叶榨出汁培养法的虫体始终都能维持相对较高的数量;其余几种方法的草履虫培养效果介于上述方法之间(表 1,图 2)。同时,由于草履虫数量在马铃薯培养法条件下的增长极为缓慢,因此当此方法与其他 6 种方法的培养效果进行比较时,由 SPSS 的统计结果(表 2)可知所有的统计结果 p 值均小于 0.05。这说明马铃薯培养法与其他方法相比在草履虫培养效果上存在统计学意义上的差异,其中马铃薯与莴笋叶榨出汁培养法在草履虫培养效果上的差异在 $p<0.01$ 水平上具有统计学意义。因此,相较其他方法而言,马铃薯法单克隆培养的草履虫种群在整个培养周期内生长缓慢、数量最少且虫体数量最先变为 0(表 1,图 2);而统计学数据也证明该方法与其他方法在培养的草履虫数量变化方面存在统计学意义上的差异($p\leq 0.05$),故进一步佐证了马铃薯培养法与其他方法间在培养的草履虫种群时空量化方面差异明显。

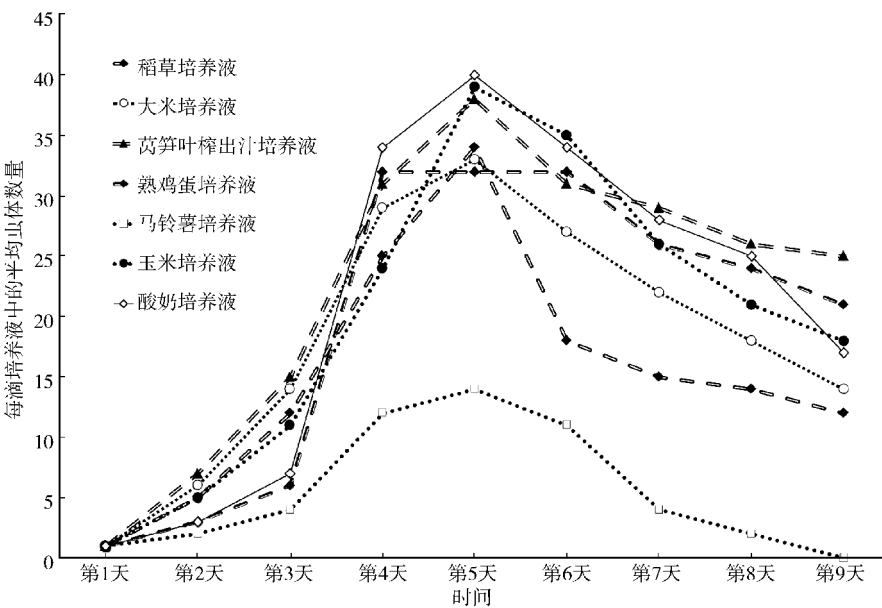


图 2 不同培养方法培养的草履虫数量变化趋势的曲线

Fig. 2 Curves of quantity change trend of *Paramecium* for different culture ways

由 SPSS 的统计结果(表 2)可知所有的统计结果 p 值均小于 0.05。这说明马铃薯培养法与其他方法相比在草履虫培养效果上存在统计学意义上的差异,其中马铃薯与莴笋叶榨出汁培养法在草履虫培养效果上的差异在 $p<0.01$ 水平上具有统计学意义。因此,相较其他方法而言,马铃薯法单克隆培养的草履虫种群在整个培养周期内生长缓慢、数量最少且虫体数量最先变为 0(表 1,图 2);而统计学数据也证明该方法与其他方法在培养的草履虫数量变化方面存在统计学意义上的差异($p\leq 0.05$),故进一步佐证了马铃薯培养法与其他方法间在培养的草履虫种群时空量化方面差异明显。

3.2 不同生殖方式对草履虫种群增长趋势的影响

一般而言,草履虫在条件良好的情况下以无性的横二裂生殖方式不断壮大种群,但条件变得不利或恶劣时,草履虫种群会慢慢退化,则会以独特的有性生殖方式——接合生殖来完成种群的复壮^[2-3,16]。在本研究中,培养过程的前 5 天内所有培养液中的虫体种群均呈指数增长状态(图 2),而此时虫体数量的增长均以无性生殖方式(横

二分裂)进行(图 1h-j)。当第 6 天培养液中出现少量接合生殖体时(图 1k-l),虫体数量的增长趋势已经改变,变为动态平衡或下降趋势(图 2);培养后期(第 7 天至第 9 天)虫体数量的加速下降伴随的是大量接合生殖体的出现。由此可见,在不同的草履虫培养方法中,均可以通过草履虫生殖方式或生殖体的形式间接给出培养条件或体系中种群增长状态的提示。良好的草履虫的生长体系应以前 5 天的培养条件最佳,从体系中能观察到大量持续的横二裂生殖体。虽然极少量的接合生殖体的出现有利于草履虫种群的复壮,然而在实际操作中,当培养液中有接合生殖体出现特别是大量出现时,就暗示着培养条件发生改变或恶化——此时需要转移虫体至新环境或更换培养液。由此可见,生殖方式直接影响了草履虫的种群增长趋势。

3.3 基于统计学分析及生殖方式对草履虫单克隆培养法的有效筛选

SPSS 目前已被广泛应用于生物学不同领域内的数据分析,如对昆虫种群差异的比较研究、对植物不同类群或品系的谱系分析、对车轮虫(*Trichodina*)的种群多样性及种间差异分析以及探索遗传距离用于区分游走类纤毛虫(Mobilida)不同阶元的可行性方面均卓有成效^[18-21]。本研究的有关统计结果表明,马铃薯培养法培养的虫体在整个培养期内生长极为缓慢,数量少,虫体数量最早(第 9 天)就变为 0,而其他培养液中的虫体还能维持一个较高的种群数量。这说明马铃薯培养法的培养效果最差。又鉴于马铃薯培养法与另外 6 种方法在培养效果上存在统计学意义上的差异($p \leq 0.05$),故另外 6 种方法均是效果较好的方法,仅是取材与操作繁简不同而已。当然,如能进一步结合草履虫接合生殖方式出现的时间进行综合筛选,并尽量筛选接合生殖体出现时间相对较晚且量少的培养方法可能效果更佳。

综上所述,较理想的草履虫单克隆培养方法不仅需要选择效果较好且行之有效的方法,而且还需较好地掌握草履虫在培养过程中的种群增长趋势,最好在培养期的前 5 天内更换新的培养液,让草履虫能持续地以无性繁殖保持加速生长状态,以此保证对草履虫材料的大量需求。但是,长期的无性繁殖会导致草履虫某些性状易发生改变如生殖能力降低等。因此,应适当地创造条件使草履虫进行必要的有性接合生殖——这样既能使草履虫种群有效复壮,保持良好的性状;同时也能使草履虫无性繁殖能力维持在一个相对较高的水平,从而形成了一个良好稳定且可持续的草履虫单克隆培养体系。

表 2 基于 SPSS 对 7 种草履虫单克隆培养方法差异的统计结果 p 值

Tab. 2 The p values of statistical results on differences of seven *Paramecium* monoclonal culture ways based on SPSS

	稻草 培养法	大米 培养法	莴笋叶榨出 汁培养法	熟鸡蛋黄 培养法	马铃薯 培养法	玉米 培养法
大米培养法	0.451					
莴笋叶榨出 汁培养法	0.157	0.353				
熟鸡蛋黄培养法	0.425	0.756	0.756			
马铃薯培养法	0.019*	0.010*	0.008**	0.027*		
玉米培养法	0.376	0.825	0.565	0.965	0.015*	
酸奶培养法	0.352	0.536	0.929	0.626	0.027*	0.086

注:*,** 分别表示两种草履虫培养方法的效果差异在 $p \leq 0.05$, $p < 0.01$ 水平上具有统计学意义。

参考文献:

- [1] FOKINA S I, CHIVILEV S M, BEIER C L, et al. Morphological and molecular investigations of *Paramecium schewiakoffi* sp. nov. (Ciliophora, Oligohymenophorea) and current status of distribution and taxonomy of *Paramecium* spp.[J]. European Journal of Protistology, 2004, 40(3): 225-243.
- [2] RICHAILLEY G, TIXADOR R, GASSET G, et al. Preliminary results of the “*Paramecium*” experiment[J]. Naturwissenschaften, 1986, 73(7): 404-406.
- [3] SONNEBORN T M. Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia* [J]. Journal of Experimental Zoology, 1950, 113(1): 87-147.
- [4] TUCKER J B, BEISSON J, ROCHE D L, et al. Microtubules and control of macronuclear ‘amitosis’ in *Paramecium* [J]. Journal of Cell Science, 1980, 44(1): 135-151.
- [5] PREER J R Jr, STARK P. Cytological observations on the cytoplasmic factor “kappa” in *Paramecium aurelia* [J]. Experimental Cell Research, 1953, 5(2): 478-491.
- [6] BRIGHT L J, GOUT J F, LYNCH M. Early stages of functional diversification in the Rab GTPase gene family revealed by genomic and localization studies in *Paramecium* species [J]. Molecular Biology of the Cell, 2017, 28(8): 1101-1110.
- [7] BARTH D, BERENDONK T U. The mitochondrial genome sequence of the ciliate *Paramecium caudatum* reveals a shift in nucleotide composition and codon usage within the genus *Paramecium* [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 272.
- [8] ARNAIZ O, SPERLING L. *Paramecium* DB in 2011: new tools and new data for functional and comparative genomics

- of the model ciliate *Paramecium tetraurelia* [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(Database issue): D632-D636.
- [9] HINRICHSSEN R D, SCHULTZ J E. *Paramecium*: a model system for the study of excitable cells[J]. Trends in Neurosciences, 1988, 11(1): 27.
- [10] AMAROLI A, RAVERA S, PARKER S, et al. The protozoan, *Paramecium primaurelia*, as a non-sentient model to test laser light irradiation: the effects of an 808nm infrared laser diode on cellular respiration[J]. Alternatives to Laboratory Animals Atla, 2015, 43(3): 155.
- [11] ECKERT R, BREHM P. Ionic mechanisms of excitation in *Paramecium* [J]. Annual Review of Biophysics & Bioengineering, 1979, 8(8): 353.
- [12] MIYOSHI N, KAWANO T, TANAKA M, et al. Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: determination of IC50 values for water pollutants[J]. Journal of Health Science, 2003, 46(6): 429-435.
- [13] CATALLO W J, HOOVER D G, VARGAS D. Effects of an environmental toxicant on ultrastructure in *Paramecium caudatum* and the protective effect of dissolved calcium[J]. Aquatic Toxicology, 1994, 29(3/4): 291-303.
- [14] 杜天奎, 丁华, 牛永强. 培养草履虫的几种方法比较[J]. 宁夏农学院学报, 2003, 24(2): 31-32.
- DU T K, DING H, NIU Y Q. Some simple methods of rapid culture of *Paramecium caudatum* [J]. Journal of Ningxia Agricultural College, 2003, 24(2): 31-32.
- [15] 潘志崇, 童丽娟. 草履虫培养液的选择及浓度和 pH 值的影响[J]. 实验室研究与探索, 2001, 20(5): 55-56.
- PANG Z C, TONG L J. The selection of mediums and the influence of concentration and pH on *Paramecium* [J]. Laboratory Research and Exploration, 2001, 20(5): 55-56.
- [16] 侯勇, 张会芳, 刘军英, 等. 几种常用草履虫培养和观察方法及改进[J]. 四川动物, 2009, 28(3): 450-451.
- HOU Y, ZHANG H F, LIU J Y. Improvements on the cultivation and observation of *Paramecium caudatum* [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2009, 28(3): 450-451.
- [17] GEORGE D, MALLERY P. SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference [J]. Computer Software, 2003(100): 357.
- [18] 董兆克, 戈峰. 昆虫种群数据分析及在 SPSS 软件上的实现[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(4): 1163-1169.
- DONG Z K, GE F. Statistical analysis of insect population data and the use of SPSS [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2013, 50(4): 1163-1169.
- [19] 鲁兆新, 于歆, 程大友, 等. 利用 SPSS 与 AFLP 方法对双丰甜菜品种(系)间亲缘关系与系谱分析比较[J]. 生物信息学, 2008, 6(1): 18-21.
- LU Z X, YU X, CHENG D Y et al. Analysis and comparison of genetic relationship and family tree on Sumfull beet variety (Lines) by the methods of SPSS and AFLP [J]. China Journal of Bioinformatics, 2008, 6(1): 18-21.
- [20] 李进, 唐发辉, 赵元荇. 单型车轮虫(*Trichodina uniforma*) 种群多样性研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2014(2): 10-15.
- LI J, TANG F H, ZHAO Y J. Study on population diversity of *Trichodina uniforma* [J]. Journal of Chongqing Normal University(Natural Science), 2014(2): 10-15.
- [21] 唐发辉, 赵元荇. 基于 18S rDNA 遗传距离与 GC 含量对游走类纤毛虫的分子系统学研究[J]. 水生生物学报, 2016, 40(2): 358-369.
- Tang F H, Zhao Y J. Molecular phylogenetic evidences on Mobilida based on genetic distance and GC content of 18S rDNA using broad taxon sampling [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 358-369.

Animal Sciences

The Comparative Study on the Growth Trend of Monoclonal Cultured *Paramecium* Population

TANG Fahui, LI Qin, ZHAO Yuanjun

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] This study aims to compare and select those effective ways for monoclonal culture methods for *Paramecium* species. [Methods] Morphological and SPSS statistical methods were applied into the comparative study for seven monoclonal culture methods for *Paramecium* species. [Findings] The different *Paramecium* monoclonal culture ways, including ways of straw-culture, rice-culture, lettuce leaf culture, culture of cooked egg, potato-culture, corn-culture and yoghurt-culture, revealed that the distinct relationship of space-time quantization with the related reproduction way in the present study. [Conclusions] In the present study, the way of potato-culture was the worst, whereas the way of juice culture of lettuce leaf was the best. The difference of reproduction way should directly affect the trend of population increase for the *Paramecium* species. Therefore, except that those effective ways could be selected, some important factors should be considered, such as relationship of space-time quantization and reproduction way, which could ensure the enough experimental material requirement for *Paramecium*.

Keywords: *Paramecium*; monoclonal culture; SPSS; quantization relation; reproduction way

(责任编辑 方 兴)