

Real-time PCR 法检测日粮中添加小黑麦干酒糟 对肉牛瘤胃 *Prevotella* 属菌数量的影响

武瑞兵 苏蕊 张燕军 王瑞军 张文广 李金泉*

(内蒙古农业大学动物科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 通过在肉牛日粮中添加不同比例的小黑麦干酒糟及其可溶物(TDDGS), 运用 Real-time PCR 方法检测在添加 TDDGS 后对 3 种瘤胃普雷沃菌(*Prevotella ruminicola*、*Prevotella brevis* 和 *Prevotella bryantii*)数量的影响。结果表明, TDDGS 组(20%、25%和 30% TDDGS)与对照组(CG)相比, 瘤胃中 *P. ruminicola* 和 *P. brevis* 菌数量均有升高, 且在 20% TDDGS 组的数量分别显著升高 47 倍($P < 0.05$)和 794 倍($P < 0.05$), 而 *P. bryantii* 菌数量却有所降低, 并且在 20% TDDGS 组的数量显著降低 5 倍($P < 0.05$); 另一方面, TDDGS 组间相比, 除了 *P. ruminicola* 菌数量在 20%和 30% TDDGS 组间存在显著差异, 其余 TDDGS 组间的 3 种菌数量差异均不显著。结论是在肉牛日粮中添加 20% TDDGS 对 3 种瘤胃普雷沃菌数量都产生了显著影响, 3 种菌在 TDDGS 组间的数量变化差异不明显。

关键词: 小黑麦干酒糟及其可溶物, Real-time PCR, 瘤胃普雷沃菌

Use of Real-time PCR Method in Determination of the Effects of Triticale Dried Distillers Grains with Solubles Inclusion in Beef Cattle Diets on the Populations of Rumen *Prevotella* Species

WU Rui-Bing SU Rui ZHANG Yan-Jun WANG Rui-Jun ZHANG Wen-Guang
LI Jin-Quan*

(College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: Using real-time PCR method to detect the effects of varying levels of triticale dried distillers grains with solubles (TDDGS) inclusion in beef cattle diets on the populations of three rumen *Prevotella* species viz., *Prevotella ruminicola*, *Prevotella brevis* and *Prevotella bryantii*. The results showed that 1) compared with control group (CG), the populations of *P. ruminicola* and *P. brevis* in all TDDGS groups (20%, 25% and 30% TDDGS) increased, and a 47-fold ($P < 0.05$) and a 794-fold ($P < 0.05$) significant increase were observed in 20% TDDGS group respectively, however, the population of *P. bryantii* de-

creased in all TDDGS groups and a 5-fold ($P < 0.05$) significant decrease was found in 20% TDDGS group; 2) compared among TDDGS groups, significant population difference was only observed between 20% and 30% TDDGS groups for *P. ruminicola*, however, no other significant population differences were found between the TDDGS groups for the three *Prevotella* species. The conclusion was that incorporation of 20% TDDGS in beef cattle diet significantly affected the populations of all three rumen *Prevotella* species but no obvious population changes were found between the TDDGS groups.

Keywords: Triticale dried distillers grains with solubles, Real-time PCR, Rumen *Prevotella* species

瘤胃微生物菌群数量和区系组成受诸多因素影响,其中日粮是最重要的因素^[1-3],因此监测日粮影响下瘤胃微生物数量的变化在瘤胃生态和发酵研究方面具有重要意义。早期人们使用培养法来检测瘤胃微生物的变化,但是这种方法过分依赖细菌在培养基上的生长能力,而且培养条件的建立难度极大,这些因素导致此方法存在很大的局限性^[4]。现代分子生物学技术的发展使得不再需要使用传统培养法来分析瘤胃微生物,因此可以把鉴定一些非培养的功能性细菌作为基础和应用研究的新对象^[5]。实时定量 PCR (RT-PCR)以其灵敏度高,特异性强、定量准确、重复性好和操作简便等优点在瘤胃微生物的定量分析中得到了广泛应用。Tajima 等^[6]、Mosoni 等^[7]和 Wanapat 等^[8]用 RT-PCR 检测了瘤胃微生物菌群数量对日粮改变的反应; Weimer 等^[9]利用 RT-PCR 定量分析了日粮中添加抗生素及去除抗生素后对瘤胃微生物菌群数量的影响; Ozutsumi 等^[10]通过 RT-PCR 定量检测了原虫对瘤胃微生物菌群数量的影响。

有研究表明,糖、氨基酸和小肽可以促进瘤胃普雷沃菌的生长,并且日粮中的碳水化合物和蛋白质对瘤胃普雷沃菌具有选择性优势^[11]。另外,组成谷物 2/3 的淀粉被发酵利用可以导致酒糟及其可溶物(DGS)中除淀粉外的其他成分含量,例如中性洗涤纤维(NDF)、蛋白质和脂肪等相对于谷物中都大约提高 3 倍^[12]。因此, DGS 常作为蛋白和纤维来源被用作精料的替代料^[13-15]。但是目前关于 DGS 对瘤胃微生物菌群数量影响的研究非常少,只有极少数文献报道了日粮中添加 DGS 增加了淀粉和乳酸利用菌的数量进而改善了瘤胃发酵^[16],而直接针对降解及利用碳水化合物和蛋白质的瘤胃普雷沃菌数量变化方面的研究报道几乎没有。因此,本研究运用 RT-PCR 方法研究在日粮中添加不同比例的小黑麦干酒糟及其可溶物(TDDGS)对肉牛 3 种主要瘤胃普

雷沃菌(*Prevotella ruminicola*、*Prevotella brevis* 和 *Prevotella bryantii*)数量的影响,从而为进一步揭示反刍动物瘤胃发酵机理奠定基础以及为瘤胃普雷沃菌的定量方法提供一种参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物、试验日粮及管理

试验动物选用 4 头体重(BW)为(457 ± 36) kg, 装有永久性瘤胃瘘管的健康肉牛。每日喂 1 次(08:00),自由饮水。4 头牛被随机分成 4 组,分别饲喂 4 种不同的日粮(表 1): (1) 对照组(CG): 精:粗(90:10) 85%干轧大麦全混合日粮, 5%矿物质维生素添加剂, 10%大麦青贮; (2) 20%小黑麦干酒糟组(20% TDDGS): 精:粗(90:10) 65%干轧大麦全混合日粮, 20% TDDGS, 5%矿物质维生素添加剂, 10%大麦青贮; (3) 25%小黑麦干酒糟组(25% TDDGS): 精:粗(95:5) 65%干轧大麦全混合日粮, 25% TDDGS, 5%矿物质维生素添加剂, 5%大麦青贮; (4) 30%小黑麦干酒糟组(30% TDDGS): 精:粗(100:0) 65%干轧大麦全混合日粮, 30% TDDGS 和 5%矿物质维生素添加剂。试验采用 4 × 4 拉丁方设计,进行 4 期动物试验,每期 28 d。

1.2 瘤胃微生物总 DNA 的提取和纯化

1.2.1 瘤胃微生物样品的采集: 试验第 28 天,在供体牛晨饲前采集瘤胃液和内容物的混合物,将瘤胃液、内容物在 Stomacher (Seward Ltd., Worthing, West Sussex, UK) 高效自动均质器中混匀, 4°C, 6500 × g 离心 30 min, 弃上清,将沉淀物装入无菌塑料管中 -80°C 保存,以备提取 DNA,具体方法见文献[7]。采样过程中对每个动物都更换一次无菌手套,并且以上操作均在无菌条件下完成。

1.2.2 瘤胃微生物总 DNA 的提取与浓度检测: 称取 0.5 g 上述瘤胃液和内容物混匀离心后的沉淀物,采用强力土壤 DNA 提取试剂盒^[17] (Power Soil®

DNA Kit), 按照该试剂盒的说明书提取瘤胃微生物总 DNA。DNA 浓度由 Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific)全波长紫外分光光度计在 260 nm 下测定。 $OD_{260/280}$ 比值大于 1.8 的 DNA 用于试验。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 PCR 引物: *Prevotella ruminicola* 和 *Prevotella brevis* 菌的特异性引物见文献[11], *Prevotella bryantii* 菌的特异性引物见文献[6], 引物序列见表 2。

1.3.2 保守区域片段的扩增: 用表 2 中 3 种菌的引物分别对这 3 种菌基因组 DNA 和待测样品中 16S rRNA 基因目的片段进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95°C 2 min; 95°C 1 min, 不同退火温度(表 2) 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。总体积 25 μ L, 每个体系中每个引物为 300 nmol, 模板 DNA 20 ng, 1 倍 Ex Taq 反应缓冲液, 2.5 mmol 寡核苷酸

底物(dNTPs 混合液), 1.25 U 的 Ex Taq DNA 聚合酶。PCR 产物由琼脂糖电泳分离, EB 染色。

1.3.3 目标菌的同源性检测: 将从 3 种菌基因组 DNA 中扩增得到的 3 个 PCR 产物纯化后进行测序。测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 进行序列的同源性分析。

1.3.4 目标菌 Real-time PCR 标准曲线制作: 用目标菌纯化的 PCR 产物与 QIAGEN 公司的 pDrive 载体连接, 转化至感受态细胞(QIAGEN), 进行克隆培养, 然后蓝白斑筛选, 随机挑选白斑菌落。同时用 QIAGEN 质粒 DNA 提取试剂盒(QIAprep Spin Miniprep Kit)提取重组质粒 DNA (具体操作方法参照说明书)。然后用对应的目标菌的引物, 用 PCR 鉴定阳性克隆。并测定阳性克隆质粒 DNA 的浓度, 进行梯度稀释, 制作标准曲线。16S rRNA 基因拷贝数通过 Yu 等^[18]的方法计算, 具体计算方法见公式(1):

$$16S \text{ rRNA (copy/mL)} = \frac{16S \text{ rRNA concentration (g/mL)} \times 6 \times 10^{23} \text{ (copy/mole)}}{16S \text{ rRNA amplicon size (bp)} \times 660 \text{ (g 16S rRNA/mole/bp)}} \quad (1)$$

表 1 日粮组成和营养水平

Table 1 Ingredients and nutrient composition of four beef cattle diets containing varying percentage of triticale dried distillers grains with solubles (TDDGS) used in this study

	含量(干物质为基础) Content (DM, %)			
	对照组 Control	20%小黑麦干酒糟组 20% TDDGS	25%小黑麦干酒糟组 25% TDDGS	30%小黑麦干酒糟组 30% TDDGS
原料 Ingredients				
干轧大麦全混合日粮 Dry-rolled barley grain	85	65	65	65
大麦青贮	10	10	5	0
Barley silage mineral and vitamin mix	5	5	5	5
营养成分 Nutrient composition				
粗蛋白 CP (%)	13.40	17.20	17.70	19.70
中性洗涤纤维 NDF (%)	23.60	25.80	23.20	22.20
酸性洗涤纤维 ADF (%)	8.00	10.20	8.70	7.90
淀粉 Starch (%)	51.40	41.50	41.80	44.00
Ca (%)	0.78	0.78	0.71	0.87
P (%)	0.41	0.52	0.55	0.58

表 2 PCR 反应检测瘤胃细菌的引物

Table 2 PCR primers for detection of rumen bacteria

目标菌 Target bacteria	产物大小 Size (bp)	引物 Primers (5'→3')	退火温度 T_m (°C)
<i>Prevotella ruminicola</i>	74	F: GAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTG R: CATCCATATAGCGGTAACCTTTGG	59
<i>Prevotella brevis</i>	220	F: GGTTTCCTTGAGTGTATTTCGACGTC R: CTTTCGCTTGCCGCTG	59
<i>Prevotella bryantii</i>	540	F: ACTGCAGCGGAACTGTCAGA R: ACCTTACGGTGGCAGTGTCTC	68

以 *Prevotella ruminicola* 为例, 配制的标准曲线是从 2.36×10^7 – 2.36×10^0 拷贝的 10 倍序列稀释的 16S rRNA 片段的质粒克隆序列。以质粒为模板, 进行 PCR 反应, 共 8 个梯度, 每梯度 3 个重复。同时, 做 3 个无模板空白对照, 体系(12.5 μ L)如下: $2 \times$ MasterMix (Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix) 6.25 μ L, 20 μ mol 的引物 F 和引物 R 各 0.31 μ L, 2 μ mol 的 ROX reference dye 0.19 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 4.44 μ L。反应参数: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 59°C 1 min, 72°C 90 s, 45 个循环; 72°C 10 min。3 种菌的标准曲线, 标准曲线方程及标准曲线 r^2 (图 1)。

1.3.5 目标菌未知样品的定量: 用 Stratagene Mx3005p[®]型荧光定量 PCR 仪和 SYBR[®] Green I 荧光染料进行定量扩增。检测效率是根据随机挑选模板的浓度梯度进行定量。反应体系为 12.5 μ L, 模板浓度为 20 ng, 6.25 μ L 的 $2 \times$ MasterMix (包括 Surestart[®] Taq 酶、Reaction buffer、dNTPs、MgCl₂ 和 SYBR Green I 染料), 上、下游引物各 0.31 μ L。 *Prevotella*

ruminicola 和 *Prevotella brevis* 的反应条件: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 59°C 1 min, 72°C 90 s, 45 个循环; 72°C 10 min。 *Prevotella bryantii* 的反应条件: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 68°C 30 s, 72°C 30 s, 45 个循环; 72°C 10 min。荧光检测设在每个循环的最后一步。熔解曲线从 55°C–95°C, 每秒增加 0.2°C, 并收集荧光信号。

1.4 数据分析

试验数据采用 SAS 9.2 软件 ANOVA 程序进行统计分析, 多重比较采用 Duncan 法。

2 结果

2.1 肉牛瘤胃微生物总 DNA

本试验应用强力土壤 DNA 提取试剂盒所提取瘤胃微生物总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。因为此试剂盒自带纯化步骤, 所测 DNA 的浓度基本在 100 mg/L 以上, $OD_{260/280}$ 值在 1.8–2.0 之间, 纯度达到了后续试验的要求。

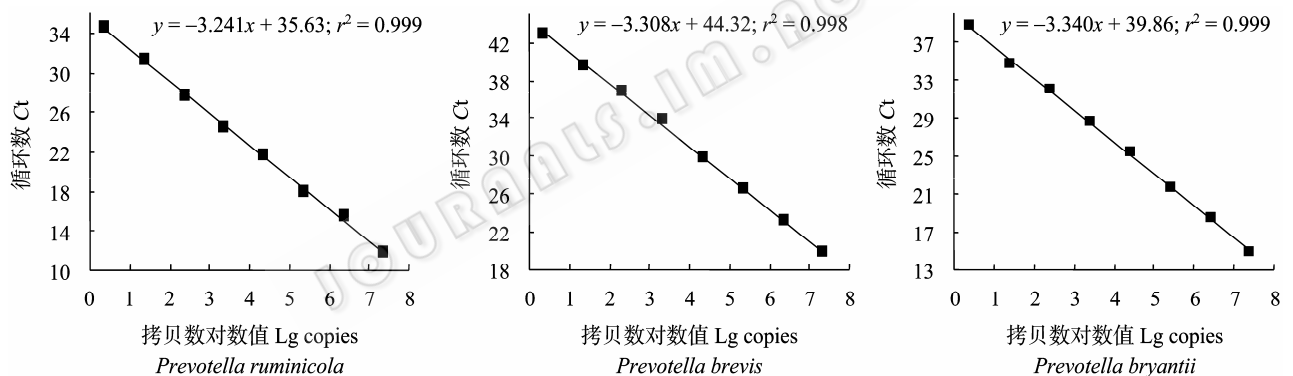


图 1 3 种瘤胃普雷沃菌 Real-time PCR 标准曲线定量图

Fig. 1 Standard curve obtained by using real-time PCR quantify rumen *Prevotella ruminicola*, *Prevotella brevis* and *Prevotella bryantii*

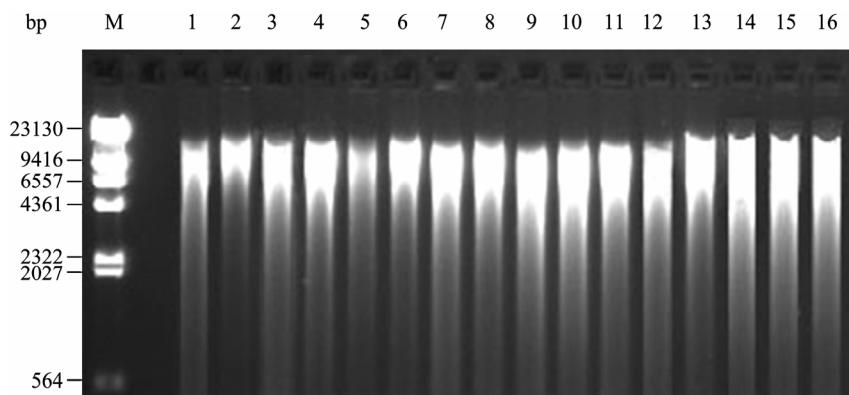


图 2 肉牛瘤胃微生物 DNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from rumen contents of beef cattle

Note: M: DNA marker, Lambda DNA/*Hind* III; 1–4: Control group (CG); 5–8: 20% TDDGS group; 9–12: 25% TDDGS group; 13–16: 30% TDDGS group.

2.2 目标片段的扩增

用文献中前人已经建立的引物,进行普通 PCR 检测,纯化后的 3 种菌基因组 DNA 中均能扩增出目的片段,结果见图 3。待测样品中也均能扩增出目的片段且每种引物的扩增片段长度与文献报道的一致。

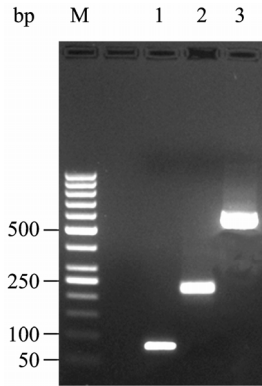


图 3 3 种菌目标片段基因组 DNA 扩增

Fig. 3 Amplification of three bacterial target fragments with genomic DNA template

Note: M: DNA marker, 50 bp ladder; 1-3: *Prevotella ruminicola* (74 bp), *Prevotella brevis* (220 bp) and *Prevotella bryantii* (540 bp).

2.3 目标菌的同源性检测

在 GenBank 上利用 BLAST 进行序列的同源性分析,结果表明,所测序列与 GenBank 中标准菌株序列相似性大于 99%。因此,可将 3 段序列的克隆质粒浓度转换成拷贝数,进而制作标准曲线用以确切定量。

2.4 待测样品定量结果

所测样品的 Ct 值在 16-34 之间,且都在标准曲线扩增范围之内。3 种菌的溶解曲线都没有检测到其他杂峰,表明无非特异性条带和引物二聚体。

从图 4 中可以看出, *P. ruminicola* 菌在 20% (6.42×10^{12} copies/mL)、25% (3.84×10^{12} copies/mL) 和 30% (7.43×10^{11} copies/mL) TDDGS 组与对照组 (1.37×10^{11} copies/mL) 相比平均拷贝数均有升高,分别升高 47、28、6 倍;而且 20% 和 25% TDDGS 组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 30% TDDGS 组与对照组差异不显著。*P. ruminicola* 在 TDDGS 组间 (20%、25% 和 30% TDDGS) 比较时, 20% 与 30% TDDGS 组相比差异显著 ($P < 0.05$), 其余组间均差异不显著。类似于 *P. ruminicola*, *P. brevis* 在 20% (5.39×10^{11} copies/mL)、25% (2.81×10^{10} copies/mL)

和 30% (1.17×10^{10} copies/mL) TDDGS 组与对照组 (6.80×10^8 copies/mL) 相比平均拷贝数均有升高,分别升高 794、41、17 倍;而且 20% TDDGS 组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 25% 和 30% TDDGS 组与对照组均差异不显著。*P. brevis* 在 TDDGS 组间比较时,所有组间都差异不显著。相反, *P. bryantii* 在 20% (8.77×10^6 copies/mL)、25% (1.57×10^7 copies/mL) 和 30% (3.54×10^7 copies/mL) TDDGS 组与对照组 (4.34×10^7 copies/mL) 相比平均拷贝数均有降低,分别降低 5、3、1 倍;而且 20% 和 25% TDDGS 组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 30% TDDGS 组与对照组差异不显著。*P. bryantii* 在 TDDGS 组间比较时,所有组间均差异不显著。

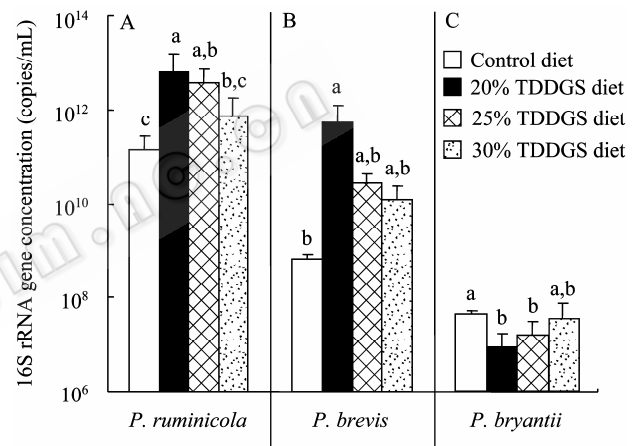


图 4 3 种瘤胃普雷沃菌 16S rRNA 基因拷贝数随日粮更替的变化图

Fig. 4 Average copy number of 16S rRNA gene from three rumen *Prevotella* species viz.

Note: A: *P. ruminicola*; B: *P. brevis*; C: *P. bryantii*. Significant differences between diets (control, 20%, 25% and 30% TDDGS) ($P < 0.05$) are noted by different lower case letters within each organism.

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 法检测了日粮中添加不同比例的 TDDGS 对 3 种主要瘤胃普雷沃菌 (*P. ruminicola*、*P. brevis*、*P. bryantii*) 数量的影响。从试验设计的角度,本试验需要从两方面解释所得的结果。

(1) 所有 TDDGS 组 (20%、25% 和 30% TDDGS) 与对照组相比的差异; (2) 所有 TDDGS 组间 (20%、25% 和 30% TDDGS) 的差异即不同比例的 TDDGS 的剂量效应 (Dose effect) 差异。

本试验中, *P. ruminicola* 菌在 4 种日粮下的平均

拷贝数高于 *P. brevis* 菌, *P. brevis* 菌又高于 *P. bryantii* 菌, 这与前人的报道相一致。Weimer 等^[9]在去除奶牛高精料日粮中莫能菌素 6 周后检测到瘤胃中 *P. ruminicola* 菌的相对数量高于 *P. brevis* 菌, 而 *P. brevis* 菌相对数量又高于 *P. bryantii* 菌。此外, Tajima 等^[6]也发现不管在高粗料还是高精料日粮条件下, *P. ruminicola* 菌数量都远远显著高于 *P. bryantii* 菌。

从 TDDGS 组与对照组结果对比来看, *P. ruminicola* 和 *P. brevis* 菌数量均高于对照组, 其中 20% TDDGS 组检测到的 *P. ruminicola* 和 *P. brevis* 菌数量相对于对照组分别升高 47 倍 ($P < 0.05$) 和 794 倍 ($P < 0.05$), 而所有 TDDGS 组检测到的 *P. bryantii* 菌数量却低于对照组, 其中 20% TDDGS 组检测到的 *P. bryantii* 菌数量相对于对照组降低 5 倍 ($P < 0.05$)。这些结果表明, 日粮中添加不同比例的 TDDGS 可能是导致瘤胃中这 3 种菌数量变化的原因。根据表 1 中的日粮配比, 日粮中添加 TDDGS 对 20% TDDGS 组日粮成分含量影响较大, 这可能是 20% TDDGS 组与对照组 3 种菌数量有显著差异的原因。另一方面从 TDDGS 组间结果对比来看, 随着日粮中 TDDGS 比例的提高(精料比例增加), *P. ruminicola* 和 *P. brevis* 菌数量均呈下降趋势, 而 *P. bryantii* 菌数量呈上升趋势, 这与 Tajima 等^[6]在奶牛向高精料日粮转变后的第 28 天检测发现 *P. ruminicola* 菌的数量下降了 3 倍, 而 *P. bryantii* 菌数量增加了 10 倍的结果相一致。此外, Hobson 等^[19]和 Tajima 等^[6]均发现在高粗料的日粮条件下, *P. ruminicola* 菌是瘤胃中的优势菌群。这或许可以用来解释本研究中随着日粮中 TDDGS 比例升高(精料比例增加) *P. ruminicola* 菌数量因何下降的原因。

瘤胃微生态环境中, 普雷沃菌 (*Prevotella* species) 是瘤胃微生物中数量庞大的一支, 并且在饲喂多种不同日粮的反刍动物中均有发现, 这些细菌被认为参与降解及利用碳水化合物或蛋白质^[19]。本研究中 *P. ruminicola* 和 *P. brevis* 菌尽管随日粮中 TDDGS 比例升高(20%–30% TDDGS) 数量有所下降, 但终究高于对照组数量, 说明日粮中添加 TDDGS 可能会促进瘤胃中这两种菌数量的增殖或对其数量的保持有一定作用, 而 *P. bryantii* 菌与其他两种菌正好相反的变化趋势, 可能与它的淀粉降解能力有关^[6,19]。从表 1 中看出, 随着 TDDGS 添加比例

增加(20%–30% TDDGS), 日粮中淀粉含量虽有少量增加(41.5%–44.0%), 但却明显低于对照组日粮淀粉含量(51.4%)。因此, 日粮淀粉含量的变化可能是导致 *P. bryantii* 菌随日粮中 TDDGS 比例升高(20%–30% TDDGS) 数量有所升高但终究低于对照组数量的原因, 但这还需要更深入的研究。

通过本研究结果表明, 不同 TDDGS 添加比例的日粮对 3 种瘤胃普雷沃菌数量均有所影响, 当日粮中添加 20% TDDGS 时, 显著升高了 *P. ruminicola* 和 *P. brevis* 菌数量, 而降低了 *P. bryantii* 菌数量; 3 种菌在 TDDGS 组间的数量变化差异不明显。

致谢: 感谢美国威斯康辛麦迪逊大学细菌学学院 Paul J Weimer 博士对 3 种瘤胃普雷沃菌标准菌株基因组 DNA 的提供。





参 考 文 献

- [1] Grubb JA, Dehority BA. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. *Appl Environ Microbiol*, 1975, **30**(3): 404–412.
- [2] Leedle JAZ, Bryant MP, Hespell RB. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed lower high-forage diets. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**(2): 402–412.
- [3] Dehority BA, Tirabasso PA, Grifo AP. Most probable number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(11): 2789–2792.
- [4] Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, et al. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, **40**(12): 4423–4427.
- [5] Kobayashi Y. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim Sci J*, 2006(77): 375–385.
- [6] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(6): 2766–2774.
- [7] Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Bera-Maillet C, et al. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J Appl Microbiol*, 2007, **103**(6): 2676–2685.
- [8] Wanapat M, Cherdthong A. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr Microbiol*, 2009, **58**(4): 294–299.

- [9] Weimer PJ, Stevenson DM, Mertens DR, *et al.* Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80**(1): 135-145.
- [10] Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A, *et al.* Real-time PCR detection of the effects of protozoa on rumen bacteria in cattle. *Curr Microbiol*, 2006, **52**(2): 158-162.
- [11] Stevenson DM, Weimer PJ. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen as revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(1): 165-174.
- [12] Linn JG, Chase L. Using distillers grains in dairy cattle rations. Available at <http://www.ddgs.umn.edu/articles-dairy/1996-Linn-%20Using%20dg.pdf>. Accessed 19 Sep 2010.
- [13] Schingoethe DJ, Brouk MJ, Birkelo CP. Milk production and composition from cows fed wet corn distillers grains. *J Dairy Sci*, 1999, **82**(3): 574-580.
- [14] Liu C, Schingoethe DJ, Stegeman GA. Corn distillers grains versus a blend of protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows. *J Dairy Sci*, 2000, **83**(9): 2075-2084.
- [15] Anderson JL, Schingoethe DJ, Kalscheur KF, *et al.* Evaluation of dried and wet distillers grains included at two concentrations in the diets of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2006, **89**(8): 3133-3142.
- [16] Lardy G. Feeding coproducts of the ethanol industry to beef cattle. Available at <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/beef/as1242.pdf>. Accessed 19 Sep 2010.
- [17] Ohene-Adjei S, Chaves AV, McAllister TA, *et al.* Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microb Ecol*, 2008, **56**(2): 234-242.
- [18] Yu Y, Kim J, Hwang S. Use of real-time PCR for group-specific quantification of aceticlastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(3): 424-433.
- [19] Hobson PN, Stewart CS. The Rumen Microbial Ecosystem. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997: 14-19.

征订启事

2011 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。