

蝎子肠道内微生物多样性研究

王保军¹ 刘 缨^{1*} 姜嘉彤¹ 刘 斌² 刘双江¹

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 河北科技大学理工学院 石家庄 050035)

摘 要 蝎子是一种重要的药用动物,还具有很高的营养价值。分别采用非培养和纯培养方法研究蝎子肠道内的微生物群落,结果表明,非培养方法检测到的蝎子肠道内微生物大部分属于 α , β , γ -Proteobacteria 类群,纯培养法分离到的菌株多属于高 G + C 含量的革兰氏阳性菌,两种方法都检测到肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*) 菌株,综合两种方法检测结果,蝎子肠道微生物共包括 23 个属,分别是肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、土地杆菌属(*Pedobacter*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)、罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、鞘鞍醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、两面神菌属(*Janibacter*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、微球菌属(*Micrococcus*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、土壤球菌属(*Agrococcus*)、异常球菌属(*Deinococcus*)、鸟氨酸微菌属(*Ornithinimicrobium*) 还有一些属于不能培养的未知菌。

关键词: 蝎子; 肠道微生物; 非培养方法; 纯培养方法; 菌群多样性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0888-06

蝎子又称全蝎或全虫,属节肢动物门、蛛形纲、蝎目,是已知最古老的陆生节肢动物之一。蝎子分布广泛,品种繁多。全世界约有 1000 余种,我国约有 15 种,主要分布在河南、河北、山东、辽宁等地,其中东亚钳蝎是我国蝎群中分布最广的一种,可整体入药,通常人们所说的蝎子,也往往指东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch)^[1]。

有关蝎子的药用价值研究历史久远,全蝎入药的记载,我国最早见于五代后蜀韩保廉的《蜀本草》。现代研究表明,蝎子的主要活性成分是蝎毒素和酶,在临床上,蝎子多用于治疗神经系统、脑血管系统方面的疾病,此外还具有较强的抗癌活性^[2-4]。蝎子不仅是一味传统的中药材,本身还具有很高的营养价值。蝎子中富含人体生长所需的多种氨基酸和微量元素^[5],有望开发成美味可口的食品。

随着人们对蝎子需求的不断增大,自然界野生蝎子产量难以满足市场的需要,我国许多地方开始采用人工养蝎,但该技术目前还不尽完善,蝎子病死率比较高,人工饲料营养单一是原因之一。在野生环境中,蝎子捕捉各种昆虫为食,食性较杂,人工养

殖往往难以满足蝎子的生长需求,容易造成营养不良,抗病性减弱,死亡率增高。国内有研究在蝎子饲料中添加 EM 菌(Effective Micro-Organisms),研究表明,添加 EM 菌的东亚钳蝎的生长、产子及存活率都优于其它传统的养殖方法^[6]。

蝎子肠道中存在大量的微生物,形成复杂的微生物群落,这些微生物对宿主消化吸收营养物质和抵御外来菌群入侵有重要作用,如果微生态平衡失调,机体正常生理功能就会发生紊乱而发生疾病。目前,对于蝎子肠道内微生物的菌群组成、在肠道中的定植规律及其与蝎子抗病性的关系等尚不清楚。

本研究分别采用非培养和纯培养方法研究蝎子肠道内微生物群落组成,从而较为全面地了解蝎子肠道内微生物种类,为采用微生物技术改善蝎子肠道微生态环境,促进肠道菌群平衡打下基础,具有一定的理论和实际意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蝎子肠道样品: 东亚钳蝎,从山东农村野生

* 通讯作者。Tel: 86-10-64807410; E-mail: liuying@mail.im.ac.cn

作者简介: 王保军(1952 -),男,副研究员,研究方向为环境微生物学。E-mail: wangbaojun1953@163.com

其他作者: 张佳月¹

收稿日期: 2007-05-29; 接受日期: 2007-06-15; 修回日期: 2007-07-12

环境中捕捉。使用前取活蝎数只, 敲击头部致死, 用 70% 的乙醇体表消毒后, 无菌条件下解剖, 取出肠腔组织。

1.1.2 主要试剂和仪器: 硅胶膜基因组 DNA 提取试剂盒购自北京塞百盛基因技术有限公司。PCR 扩增试剂盒购自美国 Promega 公司。凝胶回收试剂盒 (E. Z. N. A Gel Extraction Kit) 购自美国 Omega 生物技术公司。限制性内切酶 *Hae* III 购自 TaKaRa 公司。pGM-T 克隆试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 引物: PCR 扩增用引物由上海生工生物工程有限公司合成。其中通用引物 FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 RC1492 (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 分别对应于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 16S rRNA 基因的 8~27 位和 1492~1513 位。引物 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 和 SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3') 位于 pGM-T 载体上, 两对引物预计扩增片段大小均为 1.4kb 左右。

1.2 蝎子肠道内微生物 DNA 提取和 16S rRNA 基因文库构建

取蝎子肠腔组织 10g, 捣碎后加入 5mL 提取液 (100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl) 和 100 μ L 50mg/mL 的溶菌酶至终浓度 1mg/mL, 37 $^{\circ}$ C 保温 2~3h。再加入 10% SDS 1mL, 灭菌的玻璃珠 1g, 匀浆 2min 后离心, 将上清液移至另一灭菌的离心管中, 用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 0.1mL TE 缓冲液中。用硅胶膜基因组 DNA 提取试剂盒纯化后, -70 $^{\circ}$ C 保存。

以纯化的蝎子肠道内微生物基因组 DNA 为模板, 用通用引物 FC27, RC1492 扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应采用 50 μ L 体系, 反应条件 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

同时进行 4 个 PCR 反应, 以减少扩增的偏向性。反应结束后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 合并 PCR 产物, 用凝胶回收试剂盒进行切胶回收纯化, 将回收产物和载体 pGM-T 连接后, 转化到大肠杆菌 *E. coli* Top10 中。

1.3 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 分析和系统发育分析

用菌落 PCR 方法验证 16S rRNA 基因文库中的阳性克隆。选择通用引物 T7 和 SP6 扩增 pGM-T 载体多克隆位点之间的序列, 扩增条件同上。扩增产

物用 4 碱基限制性内切酶 *Hae* III 进行酶切消化 (37 $^{\circ}$ C, 1h) 酶切产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

随机挑取 44 个克隆, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定, 根据测序结果, 计算文库的覆盖率。

测定的序列在 NCBI 数据库中用 BLAST 程序进行相似性搜索, 从中选择相近的典型菌株 16S rRNA 序列, 用 MEGA3.1 软件进行多重序列比对, 构建系统发育树。

1.4 蝎子肠道内好氧和兼性厌氧微生物的分离

取蝎子肠腔组织约 10g, 加入灭菌的生理盐水 20mL, 漩涡震荡混匀后, 低速离心 (300r/min, 10min) 去除大部分肠腔组织残留物。取上层悬液, 用 LB 液体培养基进行梯度稀释后, 涂布 LB 固体平板, 每个稀释度进行 3 个平行, 30 $^{\circ}$ C 培养至平板上形成单菌落。挑取不同形态单菌落, 在 LB 固体培养基上进一步分离纯化, 用显微镜镜检至菌体形态一致, 则为纯培养物。

1.5 蝎子肠道内分离微生物的鉴定

对分离纯化的蝎子肠道内微生物采用菌落 PCR 方法, 用通用引物 FC27 和 RC1492 扩增 16S rRNA 基因, PCR 反应条件同上, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 直接送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定, 16S rRNA 基因序列比对及系统发育树的构建方法同上。

参考文献 [7] 进行生化特征测定: 氧化酶, 接触酶, 葡萄糖氧化发酵, 甲基红 (M.R), V-P 测定, 硝酸盐还原, 吡啉, 明胶液化, 硫化氢。

2 结果和分析

2.1 蝎子肠道内微生物 16S rRNA 基因文库的构建和 16S rRNA 基因 PCR-RFLP 分析

用蝎子肠道内微生物基因组 DNA 为模板, 扩增 16S rRNA 基因, 产物大小为 1.4kb 左右, 符合预期片段大小。切胶回收片段, 连接到 pGM-T 载体上, 构建 16S rRNA 基因文库, 转化平板上共有阳性克隆约 400 个, 随机挑取 50 个克隆进行菌落 PCR, 经验证, 阳性克隆率为 95%。

菌落 PCR 产物用 *Hae* III 酶切后显示出 10 种以上不同的带型 (图 1), 虽然单一限制性酶切结果还不能准确反映蝎子肠道内微生物的类群, 但也在一定程度上反映了所构建文库的丰富度。

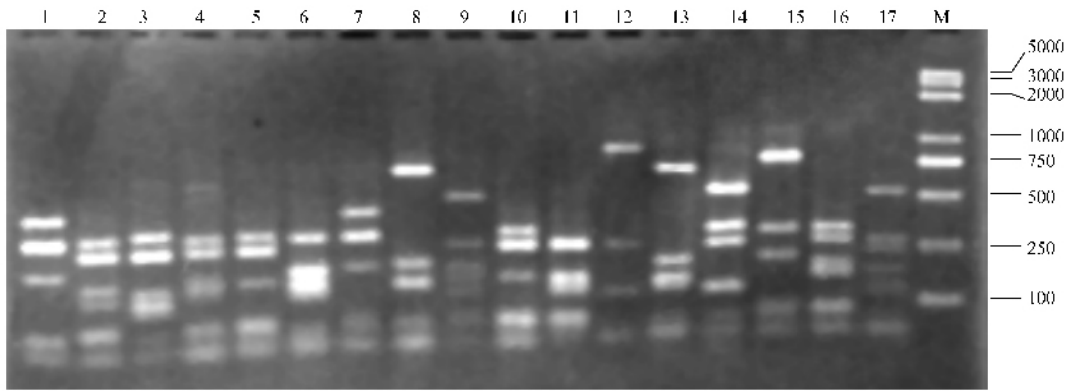


图1 16S rRNA 基因片段 *Hae* III 酶切部分图谱

Fig. 1 *Hae* III Restriction patterns of 16S rRNA gene of bacteria from scorpion intestine.

2.2 16S rRNA 基因序列比对和系统发育树的构建
随机挑选 44 个克隆,用通用引物 FC27 进行正向测序,测序片段长度 800bp 左右,介于细菌 16S

rRNA 基因的 27 ~ 800bp 位点之间。对测序结果进行分析,并通过序列比对分析,图 2 为文库中各序列所代表的细菌类群结果。

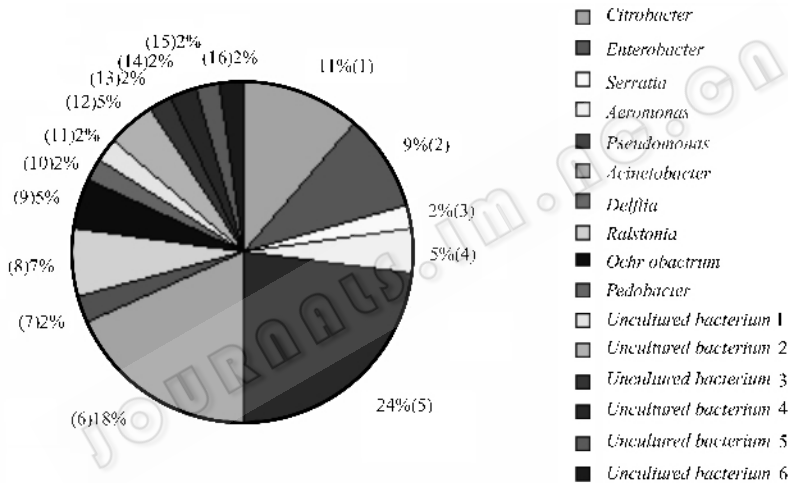


图2 DNA 测序结果统计和重复序列分析

Fig. 2 The proportion of repeat 16S rRNA gene sequence.

按以下公式计算文库的覆盖率。 $c = \left(1 - \frac{n1}{N}\right) \times 100\%$ 。其中, N 代表所分析的克隆数, $n1$ 代表具有不重复序列的克隆数(16S rRNA 序列 >97% 为重复序列)。测序的 44 个样品中,共有不重复序列的克隆数 8 个,文库的覆盖率为 82%。这表明库容值较大,文库的覆盖率高,但同时也反映出蝎子肠道内菌群生物多样性不高,种类比较少。

用 MEGA3.1 软件进行多重序列比对,选择邻位相连法构建系统发育树(图 3)。结果显示,用建库方法检测到的蝎子肠道内微生物包括 10 个属,分别是肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、土地杆菌属(*Pedobacter*)、代尔夫特菌属

(*Delftia*) 罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)。还有 6 株属于非培养的未知菌株。

2.3 蝎子肠道内好氧和兼性厌氧微生物的分离

采用传统的分离纯化方法,在 LB 固体平板上共得到 25 株异养型好氧和兼性厌氧菌,16S rRNA 基因序列比对结果显示,其中 18 株菌彼此间序列相似性低,结合生化特征检测结果,鉴定为属于 16 个属 18 个种(表 1),分别是肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、鞘鞍醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、两面神菌属(*Janibacter*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、微球菌属(*Micrococcus*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、土壤球菌属(*Agrococcus*)、异常球菌

属 (*Deinococcus*) 鸟氨酸微生物属 (*Ornithinimicrobium*) , 其中菌株 X26 与鸟氨酸微生物属 *Ornithinimicrobium*

sp. LW6 序列相似性仅为 97% , 有可能是未报道的新种。

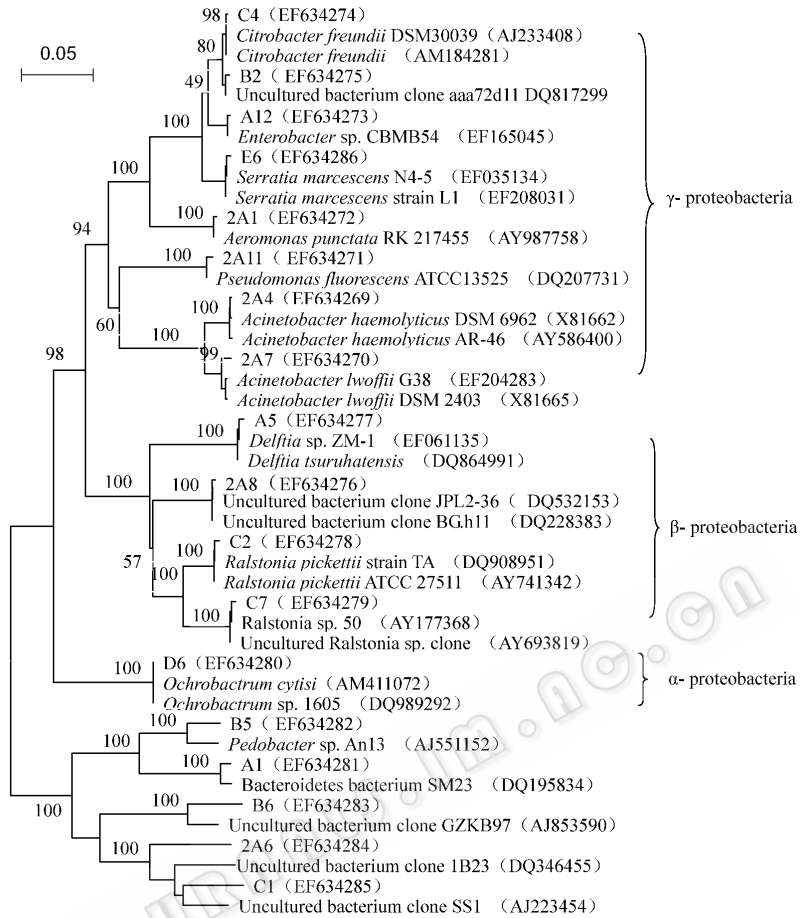


图3 非培养方法检测到的蝎子肠道内微生物系统发育分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene of bacteria community in scorpionidae intestine using culture-independent method. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GeneBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

表1 蝎子肠道分离菌株 16S rRNA 基因同源性比对及主要生化特征检测结果

Table 1 BIAST results of 16S rRNA sequences of the bacteria isolated from scorpionidae intestine and their main physiological features

Strain	Sequences source with highest identity(%)	Glucose fermentation	Nitrate reduction	MR	H ₂ S production	V-P	Indole Production	Oxidase	Catalase	Gelatin liquefactions
X2	<i>Enterobacter aerogenes</i> (99)	F	+	-	+	+	-	-	+	+
X3	<i>Exiguobacterium</i> sp. (99)	F	-	-	-	-	-	-	+	+
X5	<i>Serratia marcescens</i> (99)	F	+	-	+	+	-	-	+	+
X7	<i>Sphingomonas</i> sp. (99)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
X9	<i>Agromyces</i> sp.(99)	O	-	-	-	-	-	-	+	+
X10	<i>Micrococcus</i> sp. (99)	O	-	-	-	-	-	+	+	+
X13	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (99)	O	+	-	-	-	-	+	+	-
X14	<i>Agrococcus lahaulensis</i> (99)	A	-	-	-	-	-	-	+	+
X17	<i>Deinococcus</i> sp. (98)	O	-	-	-	-	-	+	+	+
X18	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> (98)	O	+	-	+	-	-	-	+	+
X19	<i>Gordonia hydrophobica</i> (98)	F	+	-	+	-	-	-	+	-
X20	<i>Gordonia defluvi</i> (98)	F	+	-	+	-	-	-	+	-
X21	<i>Rhodococcus zopfii</i> (99)	F	+	-	+	-	-	-	+	+
X22	<i>Janibacter</i> sp. (100)	A	+	-	-	-	-	-	+	+
X23	<i>Kocuria rosea</i> (99)	F	+	-	-	-	-	-	+	+
X24	<i>Nocardia corynebacterioides</i> (100)	-	-	+	-	-	-	-	+	+
X25	<i>Microbacterium arborescens</i> (99)	F	-	+	-	-	-	-	+	+
X26	<i>Ornithinimicrobium</i> sp. (97)	A	-	-	-	-	-	-	+	+

Glucose fermentation (O), oxidation (O), fermentation (F), no action (-), produce alkaline (A).

用 MEGA3.1 软件构建系统发育树(图 4)。其中菌株 X2、X5 和 X13 与非培养方法获得的克隆的

16S rRNA 基因序列有很高的同源性,属于同一种属的细菌。

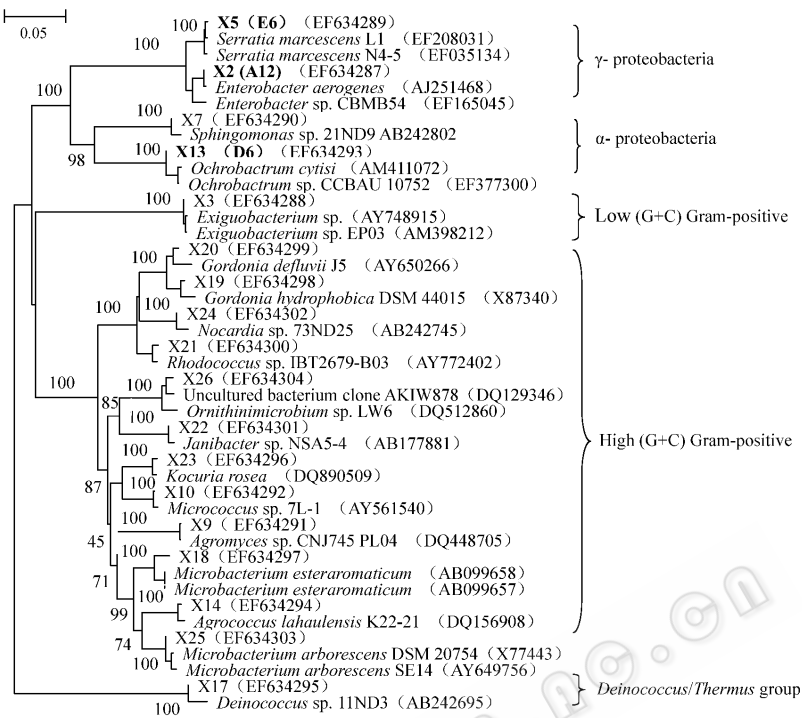


图 4 纯培养方法分离到的蝎子肠道内微生物系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA genes of bacteria community in scorpionidae intestine using culture-dependent method. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GeneBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

3 讨论

研究肠道微生物群落多样性的传统方法是采用纯培养技术,分离纯化得到单一微生物菌株后进行鉴定,但许多微生物在自然状态下处于共生体系,难以采用人工方法获得纯培养物,从而不能准确反映微生物多样性^[8,9]。随着分子生物学技术的发展,非培养技术在微生物群落分析中得到越来越多的应用,如基于 16S rRNA 基因分析的 DGGE(变性梯度凝胶电泳),TGGE(温度梯度凝胶电泳),SSCP(单链构象多态性),RFLP(限制性片段长度多态性)等新技术的应用,为微生物生态学研究开辟了新的途径。但这些技术也存在一定的不足,如 PCR 扩增偏向性、提取的微生物总 DNA 不具代表性或者操作技术上的原因等,都可能影响到非培养技术结果的可信度。将传统的纯培养技术和新发展的非培养技术结合使用,则可以相辅相成,更为全面的反映复杂环境中微生物群落多样性。

本研究分别采用非培养方法和传统分离培养方法研究蝎子肠道中微生物群落,用非培养方法获得的 44 个 16S rRNA 基因序列包括 10 个属,大部分属

于 α 、 β 、 γ -变形菌纲,优势菌属是 *Pseudomonas* 和 *Acinetobacter*,其中 *Citrobacter*、*Enterobacter*、*Serratia* 属于肠杆菌科,是人和动物肠道的正常菌群。采用纯培养方法共获得的 25 株菌属于 16 个属,大部分是高 G + C 含量的革兰氏阳性菌,其中 *Gordonia*、*Nocardia*、*Janibacter*、*Agromyces*、*Agrococcus*、*Deinococcus* 属菌株多分离自土壤或环境样品,在蝎子肠道中可能属于过路菌群,来源于其栖息的环境中。

综合两种方法检测结果,蝎子肠道微生物共包括 23 个属,分别是 *Enterobacter*、*Serratia*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Aeromonas*、*Citrobacter*、*Pedobacter*、*Delftia*、*Ralstonia*、*Ochrobactrum*、*Sphingomonas*、*Exiguobacterium*、*Gordonia*、*Nocardia*、*Rhodococcus*、*Janibacter*、*Kocuria*、*Micrococcus*、*Agromyces*、*Microbacterium*、*Agrococcus*、*Deinococcus*、*Ornithinimicrobium* 还有一些属于不能培养的未知菌。目前,对蝎子体内微生物多样性的研究尚未见相关文献报道,2006 年,Kim 等^[10]分别采用纯培养和非培养技术研究金鳢鱼肠道和黏液中微生物多样性,也检测到了 *Exiguobacterium*、*Rhodococcus*、*Kocuria*、*Micrococcus*、*Microbacterium*、*Enterobacter* 等属。

Serratia、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Aeromonas*、*Citrobacter*、*Ralstonia* 属菌株,这和蝎子肠道内微生物菌群分布有相近之处。

蝎子肠道内微生物组成受到其生活环境、食物来源的影响。同时,蝎子属于变温动物,随着季节气候的变化,它们体内的微生物群落可能也会受到影响。有关蝎子肠道中有益微生物的鉴别及环境和食物对肠道微生物种群的影响还有待作进一步的研究。

本研究分别采用非培养和纯培养方法分析蝎子肠道微生物,得到的结果有较大差异。采用非培养方法获得的7个属中,有些属于易于培养的微生物,如 *Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Aeromonas* 和 *Citrobacter* 属,但在本实验中没有培养得到,分析其原因,一方面可能与菌株生长速度及营养需求有关,另一方面,在实验中分离到多株高 G + C 含量的放线菌,这些放线菌和其它菌株混合培养时,往往会产生一些生物活性物质,抑制其他微生物的生长。在非培养方法中,可能存在以下问题:①不同提取方法对 DNA 模板的偏差性影响。蝎子肠道内菌群复杂,有些粘附在肠道的褶皱内,提取液难以渗入,其中高 G + C 含量革兰氏阳性菌的细胞壁结构致密,普通 DNA 提取方法难以进行破壁,这部分菌的染色体 DNA 在本实验中未能得到很好的提取。②PCR 扩增的偏向性影响。③文库库容大小的影响。理论上,当库容为 100% 时,表明该文库包括了样品中所有微生物的种类,而实际操作中,16S rRNA 克隆文库很难包

括环境中所有的微生物样品。总之,两种方法各有利弊,结合使用则能取长补短,较为全面的反映蝎子肠道中微生物的群落类型。

参 考 文 献

- [1] 朱明生,戚建新,宋大祥. 中国蝎目名录(蛛形纲 蝎目). 蛛形学报, 2004, 13(2): 111 - 118.
- [2] Goudet C, Chi C W, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, 2002, 40(9): 1239 - 1258.
- [3] 许均华,吴英亮,罗 锋,等. 蝎毒素结构、功能与应用研究. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(4): 13 - 16.
- [4] Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 2005, 46(8): 831 - 844.
- [5] 李 珊,高 华. 蚕蛹、蝎子、海肠中 20 种元素的 ICP - AES 测定和氨基酸含量测定. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 23 - 25.
- [6] 杨德威,黄德成,刘福安. EM 益菌于东亚钳蝎养殖的应用. 广东畜牧兽医科技, 2001, 26(4): 30 - 31.
- [7] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 叶姜瑜,罗固源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策. 微生物学报, 2005, 45(3): 478 - 482.
- [9] 郭 斌,吴晓磊,钱 易. 提高微生物可培养性的方法和措施. 微生物学报, 2006, 46(3): 504 - 507.
- [10] Kim DH, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(6): 1654 - 1664.

Microbial diversity in scorpion intestine (*Buthus martensii* Karsch)

WANG Bao-jun, LIU Ying*, JIANG Jia-tong, LIU Bin, LIU Shuang-jiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Scorpion is an important officinal animal, and has a high nutritional value. In this study, the culture-independent and culture-dependent methods were used to investigate the microbial diversity in the scorpion's intestine. Results based on culture-independent method showed the bacteria to be related to α , β , γ -proteobacteria. Bacteria isolated by the culture-dependent method were high G + C, gram-positive bacteria. The genera *Enterobacter*, *Serratia* and *Ochrobactrum* were detected by both methods. To sum up the results from the two methods, the bacteria in scorpion intestine belong to 23 genera, which are *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Pedobacter*, *Delftia*, *Ralstonia*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Exiguobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Janibacte*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Agromyces*, *Microbacterium*, *Agrococcus*, *Deinococcus*, *Ornithinimicrobium*, and some uncultured species. The two methods have both advantages and shortcomings. However, when used simultaneously, they complement each other.

Keywords: scorpion; intestinal bacteria; culture-independent method; culture-dependent method; microbial diversity

Corresponding author. Tel: 86-10-64807410; E-mail: liuying@mail.im.ac.cn

Other author: ZHANG Jia-yue¹

Received: 29 May 2007/Accepted: 15 June 2007/Revised: 12 July 2007