

Analysis of Bacterial Community Structure in Water Retting and Enzymatic Retting Liquid*

Libo Hou¹, Xiaolan Liu^{2#}

¹Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, Yokohama, Japan

²Heilongjiang Key Lab of Agricultural Product Processing, College of Food and Biology Engineering, Qiqihar University, Qiqihar

Email: hou-libo-fj@ynu.jp, #liuxiaolan001@126.com

Received: Jul. 5th, 2012; revised: Jul. 19th, 2012; accepted: Jul. 27th, 2012

Abstract: In order to investigate the bacterial community diversity of warm water retting liquid and enzymatic retting liquid, both of the retting liquid samples were studied by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). During using DGGE method to analyze the bacterial diversity, DGGE bands were separated obviously by the gel concentration of 8%, range of 25% - 65% denaturant gradient, temperature of 60°C and voltage of 150 V for electrophoresis time of about 7 h. Through analysis, the selected bands of DGGE profiles were cloned and sequenced. The obtained sequence results by Blast analysis were used to construct the phylogenetic tree. We found *Pseudomonas* of *Gamma*-*proteobacteria* were the dominant bacteria both in warm water retting and enzymatic retting liquid samples. *Bacillus* of *Firmicutes* occurred along with the whole process of the two retting samples. However, in addition to share the dominant bacteria, the two samples also represented the differences in bacterial community structure.

Keywords: Warm Water Retting; Enzymatic Retting; Bacterial Community Structure; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

温水沤麻与酶法沤麻液细菌群落结构分析*

侯立波¹, 刘晓兰^{2#}

¹ 横浜国立大学环境情报学府, 横浜, 日本

² 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江省农产品加工重点实验室, 齐齐哈尔

Email: hou-libo-fj@ynu.jp, #liuxiaolan001@126.com

收稿日期: 2012年7月5日; 修回日期: 2012年7月19日; 录用日期: 2012年7月27日

摘要: 为了研究温水沤麻与酶法沤麻液中细菌群落结构, 采用 DGGE 技术(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)对沤麻液的细菌菌群结构进行了分析。采用 DGGE 分析细菌多样性时, 当凝胶浓度为 8%, 变性剂梯度范围为 25%~65%, 恒温 60°C、150 V 电压下电泳 7 h 左右时, DGGE 分离的效果较好。PCR-DGGE 指纹图谱显示, 亚麻温水脱胶及酶法脱胶过程中条带数量不同。通过对温水沤麻与酶法沤麻样品不同时期沤麻液中 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 条带进行分子克隆、序列测定和 Blast 分析及建立系统发育树。从序列结果中我们发现, γ -变形菌亚门中的假单胞菌为温水沤麻与酶法沤麻过程中的共同优势菌属。芽孢杆菌属的出现伴随着整个温水沤麻和酶法沤麻过程。此外, 温水沤麻与酶法沤麻样品群落结构多样性也表现了一定的差异性。

关键词: 温水沤麻; 酶法沤麻; 细菌群落结构; 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

1. 引言

亚麻是人类最早使用的天然纤维之一, 距今已有一万年以上的历史。亚麻纤维是一种稀有天然纤维, 仅占天然纤维总量的 1.5%。亚麻纤维是世界上最古老

*资助信息: 教育部重点项目: 亚麻酶法脱胶中关键酶对纤维化学组成和结构的作用机制(208038)。

#通讯作者。

的纺织纤维,有“纤维皇后”的美誉^[1,2]。为了解决亚麻传统脱胶方法存在的诸多问题,缩短脱胶周期、提高纤维质量和产量、降低环境污染,在其基础上可采用加菌沤麻,加酶沤麻或加化学助剂沤麻等新工艺^[3-6]。温水沤麻与酶法沤麻的不同之处在于,酶法沤麻在沤麻所用液体中添加了果胶酶,这使得沤麻时间由原来的5~7天左右缩短至2~3天;而在这一过程中,由于厌氧细菌的减少酶法沤麻液也变得更加环保,减少了原本沤麻臭味的空气污染及液体排放中纤维素等造成的污水污染问题;麻的质量也有显著提高。因此,探索酶法沤麻中的高效沤麻菌群,必将为酶法沤麻的进一步研究有着重要的指导作用。本研究以亚麻温水脱胶及酶法脱胶液为研究对象,利用PCR-DGGE技术^[7,8]对温水脱胶和酶法脱胶过程中的细菌群落结构进行了分析和比较,以期阐明温水脱胶及酶法脱胶过程中细菌群落结构多样性的差异性及其主要优势菌,为开展亚麻脱胶中加酶与加菌脱胶新工艺研究奠定基础。

2. 材料与仪器

研究区域与样地概况

1) 原料采集。亚麻原茎:黑龙江省克山县亚麻原料厂提供;实验室沤麻用水:取自嫩江;黑曲霉 HYA4:齐齐哈尔大学保存菌种;果胶、果胶酶及半乳糖醛酸:美国 Sigma 公司生产。其它试剂均为分析试剂或生化试剂。

2) 仪器及设备。台式冷冻离心机(德国 Hermle Labortechnik Germany);纯水仪(Millipore);紫外凝胶成像分析系统(Alpha Innotech 公司);PCR 仪(Applied Biosystems 公司);水平电泳仪(北京市六一仪器厂);变性梯度凝胶电泳仪 DGGE-2401(美国 C.B.S 公司)。进行排版。

3. 实验方法

3.1. 沤麻方法

1) 温水沤麻。将亚麻原茎剪成 10 cm 长,用线绳扎成小捆,装入广口瓶中,溶比 1:10,温度 36℃条件下开始沤麻。在沤麻进行第 16 h, 28 h, 40 h, 52 h, 60 h 时分别取沤麻液样品 5 mL, -20℃保存备用。

2) 酶法沤麻。a) 酶液的制备:黑曲霉发酵产果胶酶粗酶液的制作方法^[9]。b) 沤麻终点的判断采用感官法^[10]。c) 酶法沤麻方法:沤麻方法同温水沤麻,在沤麻进行第 16 h, 28 h, 40 h, 52 h 时分别取沤麻液样品 5 mL, -20℃保存备用。

3.2. 细菌总 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法提取沤麻水中的总 DNA。分别取不同沤麻方法中的沤麻水 5 mL 放入 Ep 管中, 12,000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集沉淀加入 1000 μ L 1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)溶液, 冰浴 10 min。12,000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀加入 800 μ L 2%CTAB 混匀后, 65℃水浴 1 h。12,000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液加入等体积氯仿:异戊醇(24:1 V/V)混合液, 12,000 r/min 离心 10 min, 取上清加入 0.6 倍体积预冷异丙醇, -20℃放置 30 min。12,000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 70%乙醇洗涤, 最后加入 50 μ L 的 TE 缓冲液 (pH 8.0)溶解粗提 DNA, 溶解后的粗提 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

3.3. 16S rDNA V3 区扩增

1) 引物。采用对大多数细菌和古细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F338GC 和 R518, 它们的序列分别为: F338GC: 5'-CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CGGGG CGGGG GCACG GGGGG ACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3'(横线部分为 GC 发卡结构)。R518: 5'-ATTAC CGCGG CTGCT GG-3' 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 扩增产物片段长约 230 bp。

2) PCR 反应体系 PCR 扩增中所用反应体系为 25 μ L 组成如下: 1 μ L DNA 模板, 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 混合溶液 2.0 μ L, 0.1 μ mol/ μ L 上下游引物各 2.5 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.1 μ L, 灭菌去离子水补足至总体积 25 μ L。

3) PCR 反应条件 PCR 反应条件: 反应条件为 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 sec, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 40 sec, 35 个循环, 最后再 72℃延伸 7 min^[11]。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析检测。DNA Marker 选用 pUC19(上海生工), 紫外成像保存结果。

4. 温水沤麻与酶法沤麻过程的细菌 DGGE 分析

4.1. 变性梯度凝胶电泳

变性梯度凝胶电泳 PCR 产物采用 DGGE-2401 突变检测系统对样品进行 DGGE 分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%，变性梯度为 25%~65%(100%的变性剂为 7 mol/L 尿素, 40%甲酰胺), 150 V, 60℃恒温, 1 × TAE 中电泳 7 h 左右, 银染 30 min, UVI 成像系统拍照。用 Quantity One 分析软件确定样品电泳条带的多少和条带的亮度峰值。

4.2. 条带的基因克隆和测序

将 DGGE 图谱中优势性条带标记后割胶回收、捣碎, 加入灭菌去离子水、离心、50℃水浴 30 min 后离心取上清作为 PCR 的模板进行 PCR 扩增, 反应程序与 1.4.3 相同。将经过 TAKARA PCR 产物纯化试剂盒纯化的 PCR 产物, 连接在 pMD-19T 载体上, 而后热激转化到 *E. coli* DH5 α 菌株细胞中。以氨苄青霉素(100 μ g/mL)抗性和蓝白斑筛选阳性转化子, 将其摇成菌液后, 取 1 μ L 进行菌液 PCR, 快速检测阳性克隆, 所用引物为载体引物 M13, PCR 扩增体系和程序与 16S rDNA V3 区扩增相同。菌液送至测序公司进行测序。登陆 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 将所得的序列提交到 GenBank 登记, 在 GenBank 数据库中用 BLAST 进行检索和同源性比较。

5. 结果与讨论

5.1. DGGE 分析

将从温水沤麻和酶法沤麻样品的不同脱胶时期提取的 DNA 样品进行 16S rDNA V3 区扩增, 扩增产物进行 DGGE 分析, 如图 1 所示。

从银染结果可以看出, 不同脱胶时间样品的电泳图谱从条带的位置、多少、亮度上有一些差异, 说明不同方法与脱胶时间的沤麻液中存在不同的菌群结构。其中在温水沤麻样品 1、3、4、5、6、7 条带在不同时期的样品中均有存在, 应属亚麻脱胶过程中的主要优势菌群, 对亚麻脱胶过程起决定性的作用。其中温水沤麻与酶法沤麻样品的各泳道的条带有一定的差异性。其中在 W2 与 W1 时期相比条带明显增多, W3~W5 各个时期的较亮条带可能是不同时期起主要作用的菌属。在酶法沤麻样品中, 15、16 及 18

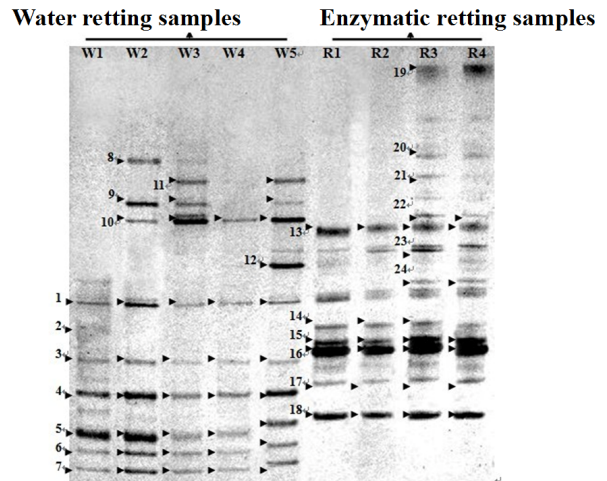


Figure 1. DGGE profiles of bacterial V3 16S rDNA gene fragments amplified from retting samples (Lanes W1-W5: Water retting samples, Lanes R1-R4: Enzymatic retting samples)

图 1. 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱(泳道 W1~W5: 温水沤麻样品; 泳道 R1~R4: 酶法沤麻样品)

号条带亮度较亮并出现在沤麻的各个时期, 应属酶法沤麻中的优势菌。从条带多样性可以看出, 酶法沤麻的前两个时期与后两个时期群落变化较小, 酶法沤麻过程中群落变化较慢。

5.2. DGGE 图谱聚类分析

应用统计学方法对不同微生物群落样品的 DGGE 结果进行分析, 可以研究群落之间的相互关系。对 DGGE 图谱分析中, 较早应用的是聚类分析(Clustering)方法。目前, 应用较多的是凝聚分层聚类分析中的非加权算术平均(UPGMA)^[12,13]。

为研究温水沤麻样品及酶法沤麻样品细菌的相似性, 使用 Quantity One 软件分析中的 UPGMA(The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages)方法进行聚类分析, 生成 DGGE 条带图谱相似性的系统树图(图 2)所示的不同沤麻样品中细菌之间的遗传簇关系, 通过各泳道所代表遗传簇的异同, 表示各样品之间的多样性及亲缘关系。

由分析结果可知, 树图分成两簇, 即酶法沤麻泳道 R4、R3、R2、R1 为一簇和温水沤麻样品 W5、W3、W1、W4、W2 为一簇。第一簇中 R4 和 R3 与 R2 和 R1 的群落结构相似程度较高, 群落演替进程较慢。R2 和 R3 的群落结构相似程度降低, 群落演替进程较慢。由此可见酶法沤麻的前两个取样时期与后两个取样时期群落结构变化较小。在温水沤麻的样品中,

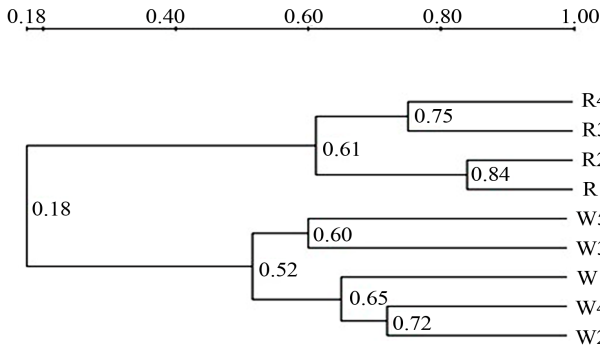


Figure 2. Cluster analysis of profiles obtained from DGGE banding patterns. W1-W5: Water retting samples (Lanes R1-R4: Enzymatic retting samples. Dendrogram was generated by an UPGMA cluster analysis based on DGGE bands)

图 2. DGGE 条带图谱聚类分析(W1~W5: 温水沤麻样品; R1~R4: 酶法沤麻样品。采用 UPGMA 方法对 DGGE 条带进行分析, 并构建图谱)

W1 与 W2、W2 与 W3、W3 与 W4 及 W4 与 W5 的群落结构相似度均有所降低, 这说明在温水沤麻的过程的各个时期中, 群落演替进程较快。

5.3. DGGE 条带回收 PCR 扩增结果

将 DGGE 图谱中的凝胶条带经切割后进行胶回收, 回收后的条带直接用于 PCR 扩增, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 扩增产物长度约为 230 bp, 条带均较亮均得到特异性扩增如图 3 所示。所得的扩增产物用于后续基因的克隆测序。

5.4. DGGE 条带基因片段的测序分析

将测序结果提交到 GenBank, 使用 GenBank 中的 BLAST 程序, 将测序结果序列与数据库中的序列进行比对, 获得各条序列的同源性信息。

测序结果(表 1)显示, 序列片段长度大多在 195 bp 左右, 且测得的结果与数据库中已知菌种具有较高的相似性, 均在 96%以上。如图 1 所示, 1~12 号 DGGE 条带为温水沤麻样品, 13~24 号 DGGE 条带为酶法沤麻样品。比对结果显示, 1 号条带相似菌为 *Aquitalea magnusonii* GU195189, 属于 β -变形菌亚门, 相似性为 98%; 2、4、5、12 号条带相似菌为 *Uncultured bacterium*, 相似性分别为 98%、98%、100%、100%; 3、7、8 号条带均为 *Uncultured Pseudomonas sp.*属于 γ -变形菌亚门, 相似性分别为 98%、98%、99%; 6 号条带为相似菌为 *Bacillus cereus* GQ254741, 属于厚壁菌门, 相似性为 99%。10、11 号条带相似菌为

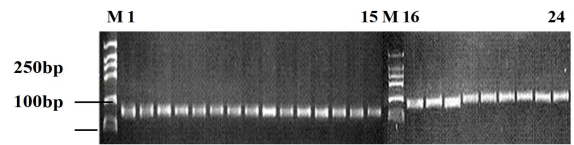


Figure 3. Results of different DGGE bands in retting samples by PCR (M: DL2000Marker; 1 - 24: DGGE bands)
图 3. 沤麻样品 DGGE 条带 PCR 扩增结果(M:DL2000Marker; 泳道 1~24: DGGE 条带)

Table 1. Sequencing results of selected DGGE bands from the bacterial DGGE fingerprint
表 1. DGGE 条带序列的 BLAST 结果

DGGE band	Accession number	Closest relatives and accession number	Similarity (%)	Alignment
1	HQ717358	<i>Aquitalea magnusonii</i> GU195189	98	195/197
2	HQ717359	<i>Uncultured bacterium</i> DQ221335	98	188/191
3	HQ717360	<i>Uncultured Pseudomonas sp.</i> FN868373	98	195/197
4	HQ717361	<i>Uncultured bacterium</i> DQ221335	98	194/197
5	HQ717362	<i>Uncultured bacterium</i> HM240936	100	192/192
6	HQ717363	<i>Bacillus cereus</i> GQ254741	99	191/192
7	HQ717364	<i>Uncultured Pseudomonas sp.</i> HQ264095	98	196/198
8	HQ717365	<i>Uncultured Pseudomonas sp.</i> AY881656	99	192/192
10	HQ717366	<i>Pseudomonas putida</i> HQ259593	99	197/198
11	HQ717367	<i>Pseudomonas putida</i> HQ324912	98	196/198
12	HQ717368	<i>Uncultured bacterium</i> GU980230	100	167/167
13	HQ717369	<i>Uncultured bacterium</i> GQ011730	97	173/178
14	HQ717370	<i>Pseudomonas putida</i> FM886858	99	196/197
15-1	HQ717371	<i>Acinetobacter sp.</i> HQ246231	99	196/198
15-2	HQ717372	<i>Uncultured bacterium</i> GU172183	97	193/198
16-1	HQ717373	<i>Pseudomonas putida</i> HQ259593	99	196/197
16-2	HQ717374	<i>Bacillus sp.</i> GQ144410	99	192/193
17	HQ717375	<i>Massilia sp.</i> HQ219299	100	197/197
18	HQ717376	<i>Flavobacterium sp.</i> FJ984614	99	191/192
19	HQ717377	<i>Pseudomonas putida</i> HQ259593	98	194/197
20	HQ717378	<i>Uncultured bacterium</i> HM340323	98	190/192
21	HQ717379	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. HM638430	100	198/198
22	HQ717380	<i>Pseudomonas putida</i> HQ259593	99	196/197
23	HQ717381	<i>Pseudomonas putida</i> HQ259593	99	196/197
24	HQ717382	<i>Pseudomonas sp.</i> FM992404	96	191/198

Pseudomonas putida, 属于 γ -变形菌亚门, 相似性为 99%。

在酶法沤麻样品中, 13、15-2、20 号条带相似菌为 Uncultured bacterium, 相似性分别为 97%、97%、98%; 14 号条带的相似菌为 *Pseudomonas putida* FM886858, 属于 γ -变形菌亚门, 相似性为 99%; 15-1 号条带相似菌为 *Acinetobacter sp.* HQ246231, 属于 γ -变形菌亚门, 相似性为 99%; 16-1 号条带为 *Pseudomonas putida* HQ259593, 属于 γ -变形菌亚门, 相似性为 99%; 16-2 号条带为 *Bacillus sp.* GQ144410, 属于厚壁菌门, 相似性为 99%; 17 号条带相似菌为 *Massilia sp.* HQ219299, 属于 β -变形菌亚门, 相似性高达 100%; 18 号条带为 *Flavobacterium sp.* FJ984614, 属于拟杆菌门, 相似性为 99%; 19、22、23 号条带相似菌均为 *Pseudomonas putida*, 属于 γ -变形菌亚门, 相似性分别为 98%、99%、99%; 21 号条带为 *Lactococcus lactis sub sp.* HM638430, 属于厚壁菌门, 相似性高达 100%。24 号条带相似菌为 *Pseudomonas sp.* FM992404, 属于 γ -变形菌亚门, 相似性 96%。

一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 可视为属于不同的种, 同源性小于 93%~95%, 可以认为属于不同的属^[14]。本课题测序的所有条带序列与 NCBI 数据库中的已知菌的同源性都超过了 95%, 因此这些菌的菌属是可以确定的。所测定的细菌除条带 13、15-2、24 号条带外, 其余条带序列与最相似菌的同源性均大于 98%, 因此这些条带可以认为与相似菌是属于同一种。

在测序结果中出现了多个条带为同一菌属的现象, 如 10、14、16-1、19、22、23 号条带为 *Pseudomonas putida*, 其中 10、14、16-1、22、23 号条带相似性为 99%, 19 号条带相似性为 98%。同时也出现相同条带属不同菌属的现象, 如条带 15-1、15-2 号条带和 16-1、16-2 号条带。

5.5. 系统发育分析

图 4 所示为 DGGE 序列与其他近缘种的系统发育树。将目的序列与每条序列亲缘关系最近的已鉴定出来的微生物进行多序列比对后, 使用 MEGA 软件构建系统发育树, 以显示目的条带与已知菌种直接的亲缘关系及其系统地位。从系统发育树中我们

可以看出, 此文库代表的细菌类群在 β -和 γ -变形菌亚门、厚壁菌门及拟杆菌门中皆有分布, 具有丰富的多样性。

在温水沤麻序列结果中, γ -变形菌亚门与不可培养菌分别占所测序列的 45.5%和 36.4%, γ -变形菌亚门中的假单胞菌与不可培养菌为温水沤麻的主要优势菌。而在酶法沤麻序列中, γ -变形菌亚门占所测序列的 50%, 酶法沤麻的主要优势菌为 γ -变形菌亚门中的假单胞菌与恶臭假单胞菌。这与魏薇^[11]在黑龙江沤麻体系的研究所得出的假单胞菌属为沤麻中的优势菌属结论相同。

芽孢杆菌属的出现伴随着整个温水沤麻和酶法沤麻的过程中。在温水沤麻序列中也出现了厚壁菌门与 β -变形菌亚门细菌, 但所占百分比很小。在酶法沤麻序列中, 除 γ -变形菌亚门外也出现了 β -变形菌亚门、厚壁菌门及拟杆菌门的细菌, 分别在所测序列中占有一定比例, 这说明酶法沤麻中菌群的多样性较丰富。

芽孢杆菌属是一种经常被用于产果胶酶的菌属, 近年来在筛选及鉴定脱胶菌的文献中, 我们发现芽孢杆菌属为主要的脱胶菌属。本文在温水沤麻及酶法沤麻样品中分别发现了 *Bacillus cereus* 和 *Bacillus sp.*, 并且是伴随在整个沤麻过程中的, 可见芽孢杆菌属在沤麻过程中的作用是非常大的。另外在酶法沤麻样品中发现的乳酸乳球菌属(*Lactococcus lactis sub sp.*), 属兼性厌氧菌, 具有将不同的糖转化为 L-(+)-乳酸的发酵能力, 经常被用于工业发酵; 不动杆菌属(*Acinetobacter sp.*)在酶法沤麻样品中也有发现, 有些不动杆菌也被用于果胶酶的生产; 黄杆菌可诱导产生几丁质酶^[15], 另外彭霞薇^[16]等将果胶酶粗提液喷雾诱导黄瓜, 经激发子处理后, 黄瓜叶片中几丁质酶活性诱导升高。

在温水沤麻中没有发现乳酸乳球菌属、不动杆菌属及黄杆菌属, 可见酶法沤麻的群落多样性较温水沤麻丰富, 酶法沤麻样品中出现的菌属或与果胶酶的加入起了一定的诱导作用有关, 或果胶酶的加入促进了一些菌属的相互作用而丰富了细菌群落结构的多样性。另外细菌群落结构的多样性与地域有着一定的关系, 因此不同地区的群落结构有着一定的差别, 但我们发现沤麻优势菌属均相同。同时, 不同的沤麻方法群落结构存在着一定的差异性。

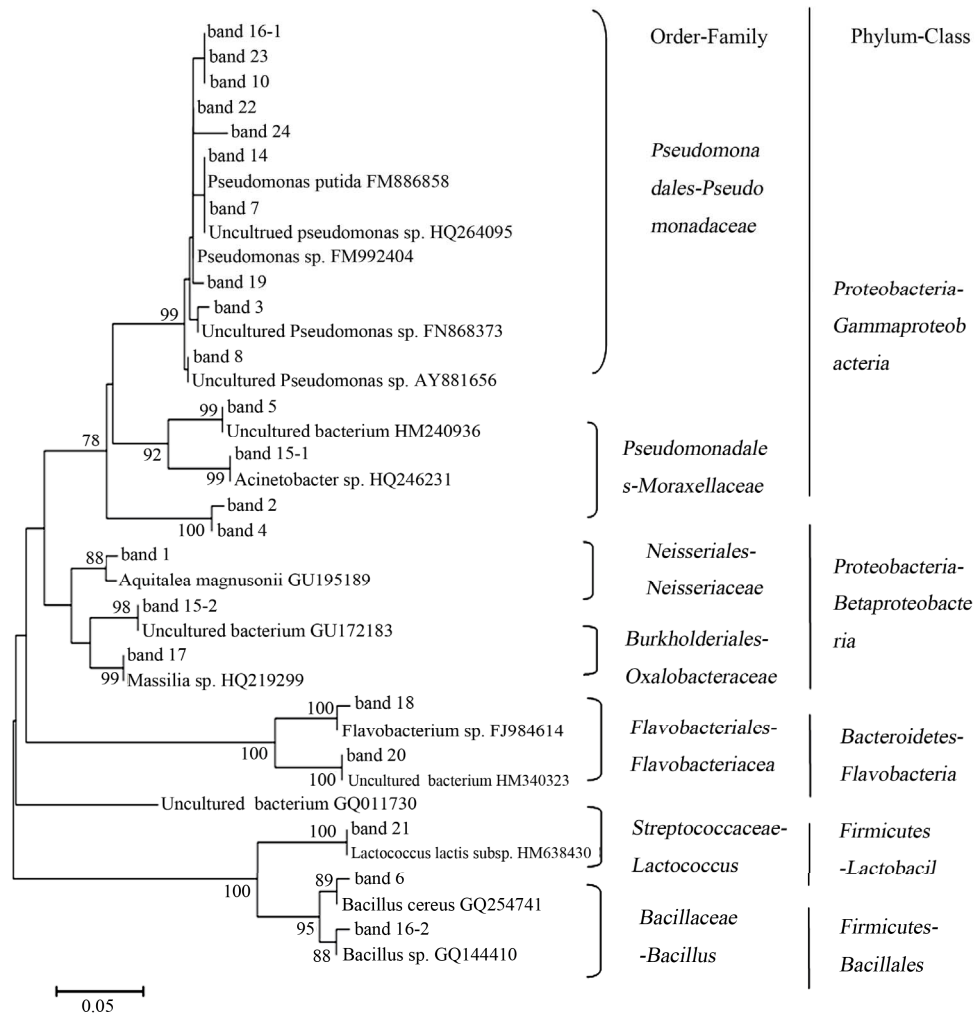


Figure 4. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the sequence of the V3 region of 16S rDNA, included the strain of the phylogenetically related bacteria (Bootstrap values $\geq 70\%$ are shown. Scale bars indicate 0.05 nucleotide substitutions per site)
 图 4. DGGE 序列与其他近缘种的系统发育树(系统发育树的建立采用邻近法, 图中显示了 $\geq 70\%$ 的模块, 图中坐标长度为 0.05)

6. 结论

综上所述, 本课题采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术分析温水沤麻与酶法沤麻样品中群落结构及其多样性。采用 DGGE 法分析细菌多样性时, 凝胶浓度为 8%, 变性剂梯度范围为 25%~65%, 恒温 60℃, 150 V 电泳约 7 小时左右, DGGE 条带分离效果较好。在亚沤麻过程中, 采用酶法沤麻可以减少沤麻时间, 通过测序结果发现在温水沤麻序列结果中, β -变形菌亚门与不可培养菌分别占所测序列的 45.5%和 36.4%, β -变形菌亚门中的假单胞菌与不可培养菌为温水沤麻的主要优势菌。而在酶法沤麻序列中, γ -变形菌亚门占所测序列的 50%, 酶法沤麻的主要优势菌为 γ -变形菌亚门中的假单胞菌与恶臭假单胞菌。在温水沤麻序

列中也出现了厚壁菌门与 γ -变形菌亚门细菌, 但所占百分比很小。在酶法沤麻序列中, 除 γ -变形菌亚门外也出现了 β -变形菌亚门、厚壁菌门及拟杆菌门的细菌, 分别在所测序列中占有一定比例。芽孢杆菌属的出现伴随着整个温水沤麻和酶法沤麻过程。另外, 温水沤麻与酶法沤麻样品群落结构多样性也表现了一定的差异性。如在酶法沤麻过程中出现了乳球菌属、黄杆菌属等在温水沤麻样品均未发现的菌属。这些均属或将成为生物技术沤麻方法及其进一步发展的高效沤麻群落的重要组成部分。

参考文献 (References)

- [1] 高莲欣. 谈亚麻纤维[J]. 中国纤维, 2003, 8: 34-35.

- [2] 王启祥. 亚麻纤维开发利用初探[J]. 北京纺织, 2003, 24(4): 28-29.
- [3] 江浩, 刘晓兰, 郑喜群. 化学助剂在亚麻脱胶工艺中的应用[J]. 齐齐哈尔轻工学院学报, 1997, 13(3): 1-4.
- [4] H. S. S. Sharma. Enzymatic degradation of residual non-cellulose polysaccharides present on dew retted flax fiber. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 26(4): 358.
- [5] 彭源德, 杨喜爱, 严理译. 加速亚麻酶脱胶的加工技术[J]. 中国麻业, 2005, 5(27): 269-274.
- [6] 田英华, 刘晓兰, 邓永平. 果胶酶高产菌 *Aspergillus niger* HYA4 的选育[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2005, 21(1): 12-14.
- [7] G. Muyzer, E. C. Waal and A. G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [8] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 845-848.
- [9] 田英华, 刘晓兰, 郑喜群. 果胶复合酶的生产及其在亚麻脱胶中的应用[J]. 纺织导报, 2009, 8: 91-93.
- [10] 于翠英, 夏敬义主编. 亚麻纺纱工艺学[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1997: 1-69.
- [11] 魏薇. 利用 DGGE 技术研究黑龙江省各地沤麻系统中细菌多样性[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2007.
- [12] 邢德峰, 任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 331-335.
- [13] Y. Yang, R. S. Dungan, A. M. Ibekwe, et al. Effect of organic mulches on soil bacterial communities one year after application. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 38: 273-281.
- [14] 张海艳. 东太平洋金属结核区微生物多样性分析[D]. 厦门: 厦门大学, 2006.
- [15] 陈三凤, 李季伦. 黄杆菌(*Flavobacterium sp.*)几丁质酶的纯化和性质[J]. 微生物学报, 1994, 34(1): 14-19.
- [16] 彭霞薇, 赵哀梅, 白志辉, 张洪勋. 果胶酶激发子对黄瓜叶片病程相关蛋白及细胞壁物质的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 325-328.