

大麻沤麻液细菌种群多样性

蔡柏岩^{1,2,*}, 江云飞¹, 葛菁萍¹, 接伟光²

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高等学校微生物学重点实验室, 哈尔滨 150080;

2. 黑龙江东方学院食品与环境工程学部, 哈尔滨 150086)

摘要:从分子水平分析大麻沤麻液中细菌种类及其优势菌群,为筛选出大麻微生物脱胶的生产菌种奠定基础。采用 PCR-DGGE 技术研究大麻沤麻液中细菌种群的多样性及动态变化,使用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析 DGGE 指纹图谱,并对优势条带进行分析。结果表明:从发酵初期过渡到主发酵期细菌种群多样性上升,群落演替迅速,从主发酵期进入到发酵末期,细菌种群多样性下降,群落演替缓慢;在整个发酵过程中,细菌种群多样性指数在发酵中期(72h)达到高峰,说明发酵中期细菌种群数量、优势菌群种类达到了最高值,发酵初期和末期以不可培养细菌为主,主发酵期以成团泛菌属为主。

关键词:大麻;沤麻液;细菌种群;多样性;动态变化

Diversity analysis of bacterial populations in the fermentation liquid of hemp retting

CAI Baiyan^{1,2,*}, JIANG Yunfei¹, GE Jingping¹, JIE Weiguang²

1 Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang, China

2 Department of Food and Environmental Engineering, Heilongjiang Oriental College, Harbin 150086, Heilongjiang, China

Abstract: In this study, the bacterial species and the dominant population in the fermentation liquid of hemp retting were analyzed using molecular methods. The results will facilitate the screening of functional strains of degumming cannabis. The PCR-DGGE technology was employed to investigate the diversity of bacterial populations and the dynamic changes of the fermentation liquid of hemp retting. DGGE profiles were studied using Gel-Pro Analyzer 4.5. In addition, the dominant straps were analyzed. The results indicated that the diversity of bacterial populations increased from initial stage to primary stage of fermentation. The succession of bacterial community was rapid. But the diversity of populations decreased from primary stage to the final stage of fermentation and the succession of community was slow. In the entire fermentation process, the diversity index of bacterial populations peaked at the intermediate stage (72h). It indicated that the size of the bacterial populations and the variety of the dominant population reached the highest value. At the initial and final stages of fermentation, unculturable bacteria were dominant, and *Pantoea agglomerans* became dominant at the primary stage of fermentation.

Key Words: cannabis; fermentation liquid of hemp retting; bacterial populations; diversity; dynamic changes

大麻是一种重要的韧皮纤维作物,其纤维具有耐用、卫生和附加值高等特点,是一种环保型的纤维原料,在许多方面有着巨大的应用潜力^[1-2]。大麻脱胶是大麻纤维生产中的重要环节,其脱胶是利用麻茎与自然环境中微生物的协同作用对韧皮部的胶质进行分解从而分离大麻纤维。由于在脱胶过程中积累有机酸盐类、蛋白质和无机磷,所以一些利用这些物质的微生物在沤麻液中大量繁殖,因此,在大麻沤麻液中就构成了特有的

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2007AA6CN032);黑龙江省教育厅面上资助项目(11531271)

收稿日期:2009-08-24; **修订日期:**2009-12-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: caibaiyan@126.com

脱胶微生物的系统环境。了解大麻沤麻液中存在的菌群及其在脱胶过程中的动态变化,为选育优势菌种对大麻进行微生物脱胶奠定重要的基础。长期以来主要通过传统的纯培养方法对于麻类脱胶微生物多样性进行研究^[3-5],传统的培养方法不足以获得丰富的微生物信息。目前,PCR-DGGE 技术具有可靠性强、重复性好、快速等优点被广泛应用于微生物群落结构的研究中^[6-12]。近年来,国内学者已逐步应用和建立了 PCR-DGGE 检测技术和方法在亚麻的沤麻过程中研究细菌的多样性^[13]。虽然这项技术在分析自然环境中的微生物多样性方面逐步成熟,但将其用来研究大麻沤麻液中细菌种群的多样性还少见报道。本项研究拟将 PCR-DGGE 技术与大麻沤麻过程中细菌种群多样性研究结合起来,系统研究不同时间段大麻沤麻液中细菌种群数量关系、种群之间的功能关系及种群动态变化规律,开拓 PCR-DGGE 技术在大麻沤麻液中细菌多样性的研究领域,填补这方面的空白。通过此项研究,从分子水平寻找大麻沤麻过程中的优势菌群,筛选出大麻微生物脱胶的生产菌种,以期提高大麻脱胶效率和纤维的生产质量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大麻沤麻液于 2007 年 9 月采自黑龙江省延寿县延寿亚麻有限公司 35—37 号沤麻池。采用温水沤麻,温度始终保持在 30℃,pH6.5—7.5,沤麻时间为 5d。自沤麻后的 12,24,36,48,60,72,84,96,108,120h 共计 10 个时间段分别取样,并将同一时间段同一深度(液面下约 1m 左右)3 个沤麻池中的发酵液进行混合作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 沤麻液中菌种分离与鉴定

采用传统微生物培养方法对各取样时间的沤麻液中优势菌种进行分离并进行显微形态和生理生化鉴定。

1.2.2 样品总 DNA 的提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化)抽提沤麻系统中的总基因组,并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 扩增

采用细菌通用引物对^[6]扩增总基因组 16S rDNA V3 区,其引物序列分别为:

F338GC 5'-CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CCGGG CGGGG GCACG GGGGG ACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3'。

R518 5'-ATTAC CGCGG CTGCT GG-3'。

反应体系(50μL) 10 × Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Free) 5μL,2.5mmol/L dNTP Mixture 4μL, 25mmol/L MgCl₂ 4μL,5U Taq 酶,引物各 5μL。

反应程序 95℃ 5min;95℃ 30s,55℃ 1min,72℃ 40s,共 35 个循环;72℃ 7min。

1.2.4 DGGE 分析

采用 DGGE-2401 电泳系统进行样品分析。胶浓度为 8.0% 的丙稀酰胺(丙稀酰胺:双丙稀酰胺 = 37.5:1),变性剂范围为 40%—70%(100% 的变性剂为 40% 甲酰胺,7mol/L 尿素),60℃、150 V 条件下电泳 8 h,银染法染色,DGGE 指纹图谱用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析。回收 DGGE 条带并测序。测序结果提交至 GenBank 核酸序列数据库,在 GenBank 中进行同源序列比对,采用 DNAMAN (Version5.1) 对扩增序列和 GenBank 中近缘种的序列进行缺省参数的对位排列,并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 沤麻液中优势菌种的鉴定

从不同时段沤麻液中共分离得到 9 株细菌,经显微形态和生理生化特征鉴定分别为金黄杆菌属的细菌(*Chryseobacterium* sp.), 格氏李斯特氏菌(*Listeria grayi*), 成团泛菌(*Pantoea agglomerans*), 乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp.), 粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*), 肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 肠

杆菌属的细菌(*Enterobacter* sp.),嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)和戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)。

2.2 不同时段大麻沤麻液细菌总 DNA 提取及 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

以不同时段采集的大麻沤麻液为样本,采用基因组提取试剂盒提取的总基因组为模板,用细菌 16S rDNA V3 区通用引物进行 PCR 扩增,所得产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到的目的片段长度大约在 230bp 左右。

2.3 DGGE 条带测序及系统发育分析

采用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对 DGGE 图谱进行分析,10 个时段的大麻沤麻液样品细菌 16S rDNA V3 区产物经 DGGE 检测后,共检测到 99 个条带(图 1),每个样品条带的位置与数量均有一定差异,回收其中 16 条条带进行测序,测序结果见表 1。除 D8,D12,D13,D14 为不可培养的细菌,其余 12 条带分为 10 属。

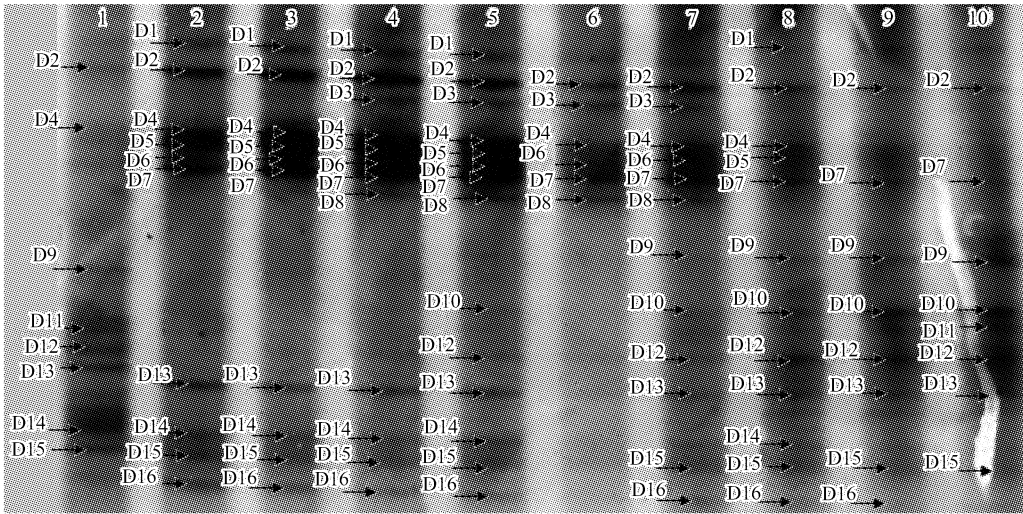


图 1 大麻沤麻液不同时段样品 DGGE 图谱

Fig.1 DGGE profile of the hemp retting water samples in different periods

1: 12h; 2: 24h; 3: 36h; 4: 48h; 5: 60h; 6: 72h; 7: 84h; 8: 96h; 9: 108h; 10: 120h; D1—D16: DGGE 条带编号

表 1 16 条序列的 Blast 结果

Table 1 Blast results of the sequenced 16 sequences

克隆编号 Clone number	序列长度 Sequence size(bp)	接受号 Accession	NCBI 数据库中最相似菌种(登录号) The strains which have the highest identity from NCBI(Accession)	相似性/% Similarity
D1	239	FJ609984	Chryseobacterium sp. (DQ847444)	100
D2	235	FJ609985	Listeria grayi (EU545979)	99
D3	241	FJ609986	Pantoea agglomerans(FJ357816)	100
D4	236	FJ609987	Lactococcus lactis subsp. (EU091399)	100
D5	239	FJ609988	Lactococcus lactis subsp. (EU091399)	98
D6	243	FJ609989	Serratia marcescens(EU221361)	100
D7	244	FJ609990	Klebsiella pneumoniae(FJ222552)	98
D8	218	FJ609999	Uncultured bacterium(FJ430267)	100
D9	238	FJ609991	Enterobacter sp. (EU693574)	100
D10	240	FJ609992	Stenotrophomonas maltophilia(EU239195)	98
D11	237	FJ609993	Pediococcus pentosaceus(EU082195)	96
D12	240	FJ609995	Uncultured bacterium(EU540601)	98
D13	217	FJ609994	Uncultured bacterium(FJ430267)	100
D14	211	FJ609996	Uncultured bacterium(FJ430267)	99
D15	227	FJ609997	Clostridium sp. (AY883111)	100
D16	216	FJ609998	Clostridium sp. (DQ193916)	94

测序结果表明,测出的片段大小一部分在 235bp 左右,一部分在 220bp 左右,且测得的结果与数据库中已知菌种均具有较高的相似性,除 D16 为 94%,D11 为 96%,其余均在 98% 以上。DGGE 条带比对结果显示,D1 与金黄杆菌属的细菌 *Chryseobacterium* sp. (DQ847444) 相似性为 100%;D2 与格氏李斯特氏菌 *Listeria grayi* (EU545979) 的相似性为 99%;D3 与成团泛菌 *Pantoea agglomerans* (FJ357816) 的相似性为 100%;D4 和 D5 与乳酸乳球菌乳脂亚种 *Lactococcus lactis* subsp. (EU091399) 相似性最高,二者之间相差 3 个碱基,与 *Lactococcus lactis* subsp. (EU091399) 相似性分别为 100% 和 98%;D6 与粘性沙雷氏菌 *Serratia marcescens* (EU221361) 的相似性为 100%;D7 与肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* (FJ222552) 的相似性为 98%;D8,D12,D13,D14 为不可培养的细菌;D9 与肠杆菌属的细菌 *Enterobacter* sp. (EU693574) 的相似性为 100%;D10 与嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (EU239195) 相似性为 98%;D11 与戊糖片球菌 *Pediococcus pentosaceus* (EU082195) 相似性为 96%;D15 和 D16 为梭菌属 *Clostridium*,二者相差 9 个碱基,相似性分别为 100% 和 94%。

为更好地显示目的序列与已知细菌之间的亲缘关系及其系统地位,利用 GenBank 数据库中与每条序列亲缘关系最近的细菌以及与之亲缘关系最近的已鉴定出来的细菌构建系统发育树(图 2)。

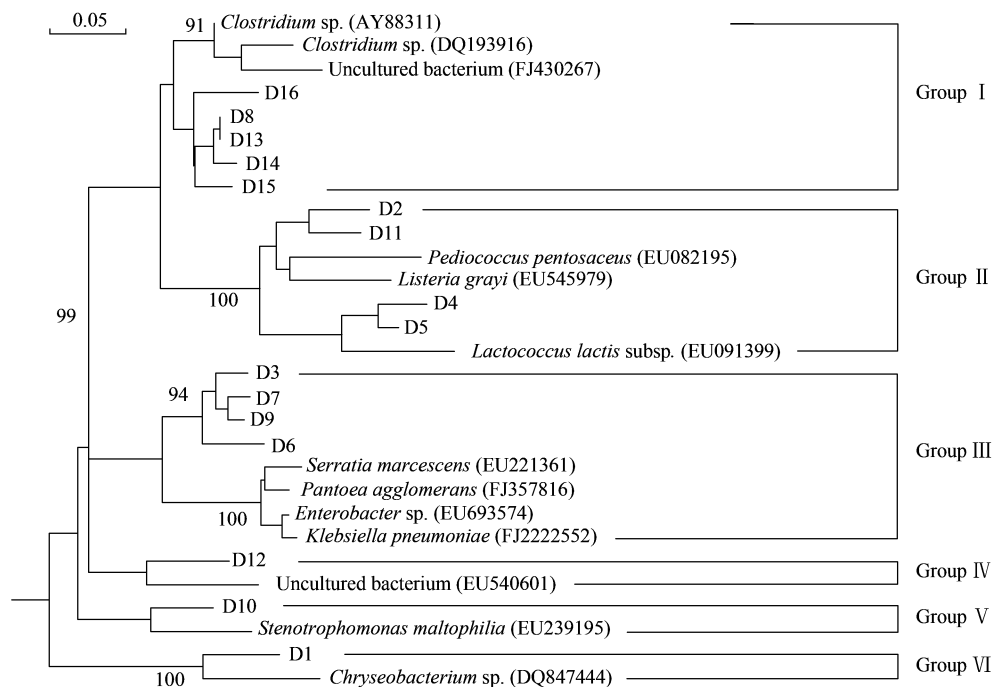


图 2 16 条 DGGE 序列与其他近缘种的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic positions of the 16 sequences and representatives of some other related taxa

注:节点上的数字表示 1000 自展后的数值

图 2 显示了它们在系统发育上的亲缘关系,从树图可以看出:DGGE 图谱中的 16 条带(图 1)主要含有 6 类菌群。序列 D8、D13—D16 与数据库中的 *Clostridium* sp. (AY883111)、*Clostridium* sp. (DQ193916) 和 Uncultured bacterium(FJ430267) 序列形成一个分支,归为 Group I,其中序列 D8 和 D13 亲缘关系最近,相似性较高,达 99%。序列 D2、D4、D5 和 D11 与数据库中的 *Pediococcus pentosaceus* (EU082195)、*Listeria grayi* (EU545979) 和 *Lactococcus lactis* subsp. (EU091399) 序列形成一个分支,归为 Group II。序列 D3、D7、D9 和 D16 的相似性较高,达 94%,它们与 *Serratia marcescens* (EU221361)、*Pantoea agglomerans* (FJ357816)、*Enterobacter* sp. (EU693574) 和 *Klebsiella pneumoniae* (FJ222552) 序列形成一个分支,归为 Group III。序列 D12 与数据库中的 Uncultured bacterium(EU540601)、D10 与数据库中的 *Stenotrophomonas maltophilia* (EU239195)、D1 与数据库中的 *Chryseobacterium* sp. (DQ847444) 各形成一个分支,分别归为 Group IV, Group V 和 Group VI。

2.4 DGGE 图谱分析

2.4.1 DGGE 图谱的丰度

每个时间段的样品的丰度值(即条带数量,图3)不等,10个样品在发酵初期(样品1)的丰度值为8(即条带数量为8条),之后丰度值维持在12左右,在发酵末期(样品9,10)丰度值又降为8,可见在主发酵期由于脱胶产生的代谢物质会对新的菌种的生长有一定的影响。在主发酵期(样品2—8)时的样品6丰度值只有6,与平行期的其它丰度值比较出现较大的偏差,这是由于处在主发酵期中,各个菌群的生长达到旺盛阶段,利用脱胶产生的物质进行生长的细菌数量急剧增长,而菌群类型则比较集中,同时也可能会有弱势菌存在,但不在 DGGE 所能检测的范围内,所以在该时期,菌群类型即条带数较少,丰度值较低。

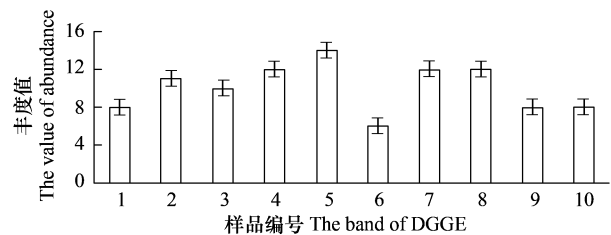


图3 大麻沤麻液不同时段样品的丰度值

Fig.3 Richness value (Rs) of bacterial community from hemp retting water in different periods

从大麻沤麻的整个过程来看,在发酵初期过渡到主发酵期时,DGGE 图谱丰度上升,优势菌群增加,群落演替迅速;主发酵期过程的细菌多样性变化不大,除了在72h(样品6)出现较大偏差外,整个菌群结构变化稳定;从主发酵期进入到发酵末期,DGGE 图谱丰度下降,优势菌群(如 *Pantoea agglomerans*, *Lactococcus lactis* subsp., *Serratia marcescens* 等)减少,群落演替缓慢。整个过程既存在原有种属消亡,也有新种属的增长。可见细菌群落经历了明显的演替过程,群落结构和优势种群数量具有时序动态性,微生物多样性呈现出协同变化的特征。

2.4.2 DGGE 图谱条带的吸光度

在 DGGE 指纹图谱中,DGGE 条带颜色的深浅与该生态系统中种群的数量有关。应用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对10个样品各自条带吸光度进行统计分析。

泳道1中D12条带的吸光度最强,为22.42%,D2的吸光度最低,仅为4.15%;泳道2中D2条带所显示的吸光度值最强,达24.99%,D1的吸光度最低,仅为0.99%;泳道3中D7吸光度最强,为29.91%,D16的吸光度最低,为0.31%;泳道4中D7条带吸光度最强,为32.08%,D16吸光度最低,为0.03%;泳道5中D7吸光度最高,为26.73%,D16吸光度最低,为0.80%;泳道6中D7条带的吸光度最强,为25.30%,D4吸光度最低,为3.97%;泳道7中D7吸光度最强,为23.09%,D16吸光度最低,为0.14%;泳道8中D7吸光度最强,为12.91%,D15吸光度最低,为3.86%;泳道9中D12吸光度最强,为23.03%,D16吸光度最低,为2.89%;泳道10中D11吸光度最强,为22.98%,D15吸光度最低,为1.68%。总的来看,在发酵初期,D12,D13,D14菌群数量相对来说较多;进入主发酵期,D7的菌群数量较多,而作为发酵初期的菌群数量占优势的菌种,数量相对较少;在发酵末期,D7菌种数量所占的比例有所下降,D12,D13菌群数量有所上升。

2.4.3 DGGE 图谱条带的优势度

优势度是指某一特定条带的峰面积占样品总体峰面积的百分数。优势度反映的是物种种群数量的变化情况^[13-14]。

各样品经分析,泳道1中D12条带的优势度最强,为15.61%,D2的优势度最低,为10.06%;泳道2中D2的优势度最强,为13.18%,D1的优势度最低,为6.82%;泳道3中D7的优势度最强,为14.68%,D16的优势度最低,为5.59%;泳道4中D7的优势度最强,为12.57%,D16的优势度最低,为4.49%;泳道5中D7的优势度最强,为12.59%,D16的优势度最低,为4.67%;泳道6中D7的优势度最强,为19.83%,D4的优势度最低,为14.65%;泳道7中D7的优势度最强,为11.54%,D16的优势度最低,为5.72%;泳道8中D7的优势度最强,为9.88%,D15的优势度最低,为5.54%;泳道9中D12的优势度最强,为14.44%,D16的优势度最低,为9.71%;泳道10中D11的优势度最强,为15.06%,D15的优势度最低,为8.62%。优势度强,表明同

泳道中该条带相比于其他条带的菌群数量要多;优势度低则说明条带所代表的菌群数量少。在沤麻过程中,随着时间的变化,沤麻液中的优势菌也随之变化。与吸光度值测定结果相比较,优势度的结果有明显的偏差,尽管两个指标都是衡量种群间数量的单位,但是优势度值主要与峰面积有关,所以吸光度值大的条带不一定是该样品中的最优势的条带。

2.4.4 多样性指数及动态分析

多样性指数综合表示环境中的生物多样性情况。多样性指数的高低反映优势菌群种类的多少、种群数量的多寡和种群个体分配均匀度的高低情况。由表 2 可知,发酵初期的多样性指数为 2.55,在整个主发酵期中,多样性指数一直维持在 2.7—2.9 之间,在发酵开始 36h 和 72h 时,多样性指数出现 2 个高峰,分别为 3.11 和 4.07,在发酵 96h 时多样性指数回到 2.61,在发酵末期,多样性指数又升为 3.34 和 3.42,说明有新的菌种大量产生。

表 2 大麻沤麻液 10 个不同时段样品的 Shannon-Weiner 指数
Table 2 Shannon-Weiner indexes of 10 hemp retting water samples

泳道编号 Lane numbers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Shannon-Weiner 指数	2.55	2.79	3.11	2.92	2.78	4.07	2.75	2.61	3.34	3.42

通过 DGGE 带谱的丰度及多样性指数,结合图谱的聚类分析显示,在大麻沤麻过程中,发酵初期(12h),主发酵期(72h)及发酵末期(108h 和 120h)4 个时段的细菌菌群较多,优势种群明显。其多样性指数相对于其他沤麻时间有较大差异,分别为 2.55,4.07,3.34 和 3.42。结合 DGGE 条带测序结果可知沤麻初期的主要优势菌为 *Clostridium* sp. (AY883111) 和不可培养的细菌;而在其他优势菌群明显的沤麻时段,起主要作用的也是不可培养的细菌。

3 讨论

对于环境样品的微生物分析,传统的分离培养等微生物学方法工作量大,并且因其受到微生物可培养性的限制,难于真实地反映实际环境中微生物的种类和数量^[12]。本研究从不同时段沤麻液中仅分离得到 9 株细菌,比采用 PCR-DDGE 方法鉴定的细菌少了 7 种,其主要原因是沤麻液中含有厌氧菌和不可培养的细菌。可见,传统的微生物分离鉴定方法虽然也能对细菌进行鉴定,但主观性比较强。传统的培养条件和培养方法容易造成选择性偏差,富集回收在环境中可能并不起主要作用或者不在数量上占优势的菌群。

PCR-DGGE 技术可以对成分复杂的环境样品在不需菌种培养分离的情况下直接取样进行分析。在 DGGE 图谱中,每个样品所分出的若干条带代表的 PCR 产物的产量和迁移率不同,进而表现出样品中不同的优势菌群的分布^[15]。由于处于不同位置的每条 DNA 带都是不同种属微生物的 16S rDNA V3 区的核酸片断,其相对浓度(亮度)代表微生物群落中某一特定微生物种及其在群落中的相对丰度^[16]。在 PCR-DGGE 方法中,由于 PCR 模板为大麻沤麻液中微生物总 DNA,其中既含可培养微生物的 DNA,也含不可培养微生物的 DNA。此外,DGGE 技术也具有自身的缺陷。DGGE 技术过分的依赖于 PCR 技术,由于 PCR 反应是一个随机性较强的过程,因此它极易受干扰,如样品微生物多样性高,可能导致 PCR 产物中某一种微生物的 PCR 产物量过少,而 DGGE 技术只能反映自然生境中数量达 1% 以上的微生物,若数量过低,经 PCR 扩增后的 DNA 产量亦低,在 DGGE 图谱中就不能被分辨出来,而不能形成明显的条带,将直接影响菌群结构的分析^[17]。因此,在考虑扩增特异性时,既要保证扩增效率,使所有模板以均等的几率被扩增,也要避免异源双链和单链 DNA 等人工产物的形成。否则,这些 DNA 分子会导致过高的评估生物多样性,影响最终的分析结果。

本项研究中 DGGE 指纹图谱显示,沤麻液中存在的微生物种类除少数为不可培养的细菌,其他多为好氧菌或兼性厌氧菌。而沤麻本身是一个天然脱胶菌种纯化过程,在此过程中,厌氧菌起主导作用,而好氧菌只是起到辅助作用^[18]。造成这一差异的原因是由于麻液的取样只是在沤麻池液面下较浅处,深度较浅的麻液里对于天然沤麻来说存在的好氧菌居多,同时在培养过程中不可能做到完全的厌氧条件。但从这一结果可以看

出大麻沤麻液与其他麻类脱胶的沤麻液的微生物种类丰富程度是相似的^[13]。

Shannon 指数可以迅速反映一个系统的多样性,而不能直接反映多样性的差异或群落组成的差异。对沤麻液中细菌多样性进行分析,具有重要意义^[19]。本项研究通过 Shannon 多样性指数可以看出大麻在脱胶过程中细菌菌群呈现波浪状的动态变化:即细菌种群多样性在发酵初期迅速增加,之后有所平缓,在发酵中期多样性指数增加至最大值,在发酵末期趋于平缓。这一结果与其它亚麻浸麻过程中细菌的数量变化相一致^[13]。研究大麻沤麻过程中的细菌菌群多样性及动态变化规律有助于选育优势脱胶菌种,为大麻微生物脱胶技术上的革新奠定基础。

本项研究通过 PCR-DGGE 方法分析了大麻沤麻过程中其沤麻液中细菌的种群变化规律,即发酵初期和末期细菌种群多样性相对较少,发酵中期细菌种群多样性较多。究其原因主要是发酵初期大麻沤麻液中微生物生长所需营养物质较少,随着沤麻时间的增多,大麻韧皮组织膨胀,还原糖、可溶性蛋白等一些可溶性物质溶解出来,为沤麻液中的细菌提供了丰富的营养源而大量繁殖,种群数量增多,并且随着脱胶细菌的繁殖并进入大麻体内,其作用方式逐渐从好氧作用转化为厌氧作用,在脱胶菌所产生脱胶酶的作用下,韧皮中的果胶质、半纤维素等物质降解脱落而溶出,又产生了大量的还原糖,细菌种群数量又有所增加,随着脱胶时间的延长,至脱胶后期时,沤麻液中大量的营养物质被消耗,细菌种群数有所降低,种群数量趋于减少。纵观大麻沤麻液中细菌种群多样性变化机制是与其沤麻液中成分变化密切相关的。

References:

- [1] Keller A. Compounding and mechanical properties of biodegradable hemp fibre composites. *Composites Science and Technology*, 2003, 63(9): 1307-1316.
- [2] Bhuwan M Prasad, Mohini M Sain. Mechanical properties of thermally treated hemp fibers in inert atmosphere for potential composite reinforcement. *Materials Research Innovations*, 2003, 7(4):231-238.
- [3] Liu D W. A study of micro-organism population of recycled waste water produced by water retting flax. *Heilongjiang Textile*, 2008, (3):9-11.
- [4] Wu L Y, Duan J Q, Fan Z X, Du W, Liang X N, Liu F H. Isolation, screening and identification of bacterium strains for accelerating flax degumming. *Journal of Yunnan University(Natural Sciences Edition)*, 2007, 29(4):419-423.
- [5] Feng Y G. A study of the microbiology diversity in retting flax water of different area of HeiLongjiang province. Harbin: HeiLongjiang University, 2006.
- [6] Gu Y F, Yun X, Zhang X P, Tu S H, Sun X F, Lindström K. Effect of different fertilizer treatments on quantity of soil microbes and structure of ammonium oxidizing bacterial community in a calcareous purple paddy soil. *Agricultural Sciences in China*, 2008,7(12):1481-1489.
- [7] Hesham A, Khan S, Liu X, Zhang Y, Wang Z, Yang M. Application of PCR-DGGE to analyse the yeast Populations dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, 2006, 23(12):879-887.
- [8] Zhou J Z, Dong M S, Jiang H H. Screen of dominating microbial species isolated from Tibetan kefir using an integrated approach of PCR-DGGE and culture-dependent methods. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(8):1632-1638.
- [9] Veljo K, Johan W. Combining culture-dependent and-independent methodologies for estimation of richness of estuarine bacterioplankton consuming riverine dissolved organic matter. *Applied and Environment Microbiology*, 2003, 69(6):3607-3616.
- [10] Pang X, Ding D, Wei G, Zhang M, Wang L, Zhao L. Molecular profiling of *Bacteroides* spp. in human feces by PCR-temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61(3): 413-417.
- [11] Zhang Z D, Wang S F, Cao Y F. DGGE technique and its application in study on microbial diversity in marine environment. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(3):297-300.
- [12] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environment Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.
- [13] Wei W. A study of the bacterial diversities in flax retting systems in HeiLongjiang province by DGGE technology. Harbin: HeiLongjiang University, 2007.
- [14] Luo H B, Huang Z G, Li H, Zhang Q, Wei C H. PCR-SSCP analysis of the pronucleus microbial communities in luzhou-flavor daqu. *Microbiology*, 2009, 36(9):1363-1367.
- [15] Mahmood S, Freitag T E, Prosser J I. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(3):482-493.

- [16] Vallaeys T, Topp E, Muyzer G, Macheret V, Laguerre G, Rigaud A, Soulas G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24(3):279-285.
- [17] Omar N B, Ampe F. Microbial Community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66(9):3664-3673.
- [18] Huang X L. Study on techniques and mechanism of microbial of retting of flax in south China. Changsha: Hunan Agricultural University, 2004.
- [19] Yang X, Cao J, Dong M X. Effects of exotic *Larix kaempferi* forest soil quality and bacterial diversity. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(10):2109-2116.

参考文献:

- [3] 刘大威. 温水沤麻废水再生的微生物种群研究. *黑龙江纺织*, 2008, (3):9-11.
- [4] 吴丽艳, 段继强, 范志祥, 杜威, 梁雪妮, 刘飞虎. 亚麻脱胶菌的分离筛选和鉴定. *云南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(4):419-423.
- [5] 冯永刚. 黑龙江省不同地区亚麻沤麻液中功能菌生物多样性的研究. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2006.
- [8] 周剑忠, 董明盛, 江汉湖. PCR-DGGE 指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇奶发酵过程的优势菌. *中国农业科学*, 2006, 39(8):1632-1638.
- [11] 张振冬, 王淑芬, 曹宇峰. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用. *海洋环境科学*, 2008, 27(3):297-300.
- [13] 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. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2007.
- [14] 罗惠波, 黄治国, 李浩, 张强, 卫春会. 浓香型大曲原核微生物群落的 PCR-SSCP 解析. *微生物学通报*, 2009, 36(9):1363-1367.
- [18] 黄小龙. 南方亚麻微生物脱胶技术及其机理研究. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [19] 杨鑫, 曹靖, 董茂星. 外来树种日本落叶松对森林土壤质量及细菌多样性的影响. *应用生态学报*, 2008, 19(10):2109-2116.