

马 放,常玉广,远立江,等. 2006 高效絮凝菌的细胞融合及产絮特性研究 [J]. 环境科学学报, 26 (12): 1994 - 1999

Ma F, Chang Y G, Yuan L J, et al 2006 Cell-fusion and examined for flocculation of highly efficient flocculation producing strain [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 26 (12): 1994 - 1999

[免审稿件] 责任编辑提示:本刊欢迎广大读者针对免审稿件提出各种意见

高效絮凝菌的细胞融合及产絮特性研究

马 放*,常玉广,远立江,任南琪

哈尔滨工业大学,市政环境工程学院,哈尔滨 150090

收稿日期: 2006-03-28 录用日期: 2006-09-28

摘要:从含油废水处理曝气池活性污泥中分离到具有絮凝特性的絮凝菌株 F2、F6,絮凝率在 80%以上. 对絮凝菌 F2、F6 的絮凝基因进行基因定位. 首先对菌株 F2、F6 进行药物抗性遗传标记选择,然后提取质粒,其中 F6 无质粒,则絮凝基因在染色体上; F2 有质粒,将具有絮凝特性的菌株 F2 的质粒转化到无絮凝特性的受体菌 DH5 α 细胞中,最后对转化菌进行絮凝特性检测. 结果表明,转化菌株的絮凝效果明显低于原始亲株 F2. 初步判断 F2、F6 絮凝基因定位于染色体 DNA 上,不在质粒上. 因此,为了提高絮凝菌的絮凝效果,利用高效产絮菌株 F2、F6 作为亲本菌株,进行原生质体融合,对融合条件进行优化,并对融合子进行絮凝测定. 实验结果确定了青霉素 GK 的最适浓度, F2 为 0.6 U $\cdot$ mL $^{-1}$ 、F6 为 0.1 U $\cdot$ mL $^{-1}$,得到了相应的原生质体及融合子;经絮凝试验对融合子的验证,结果表明,数株融合子表现出产絮特性,融合子絮凝效果与亲本菌株 F2、F6 相当.

关键词:絮凝菌;基因定位;原生质体;融合子

文章编号: 0253-2468 (2006) 12-1994-06

中图分类号: Q78, X703

文献标识码: A

Cell-fusion and examined for flocculation of highly efficient flocculation producing strain

MA Fang*, CHANG Yuguang, YUAN Lijiang, REN Nanqi

School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090

Received 28 March 2006;

accepted 28 September 2006

Abstract: The strain F2, F6 with high flocculating activity was isolated from activated sludge of oil wastewater treatment system. The flocculation efficiency is more than 80%. The flocculating gene of strain F2, F6 was located and then antimicrobial tolerance genetic marker was selected. The plasmid extracted from F2 was transformed to recipient DH5 α without flocculating activity. The flocculation characteristics of transformants were detected. The results showed that the flocculating activity of the transmitted isolates was obviously lower than that of parental strains F2. It could be concluded preliminarily that flocculant gene located on chromosomes DNA and not on plasmid. In order to improve their flocculation efficiency, cell-fusion technique is adopted to investigate the capacity of flocculation producing bacteria. Protoplast of the bacteria is the selection fusion target. The optimal operating conditions for cell-fusion are investigated, as well as the detection of syncytized cell. The experiments results showed that the best concentration of penicillin GK for strain F2 is 0.6 U $\cdot$ mL $^{-1}$ and for strain F6 is 0.1 U $\cdot$ mL $^{-1}$. Correspondingly protoplast and fusant are obtained. The syncytized cells has the characteristics of flocculation production and their flocculation capacities are similar to strain F2, F6.

Keywords: flocculation; gene location; protoplast; fusant

1 引言 (Introduction)

微生物絮凝剂具有安全无毒、高效、可降解和无二次污染等特点 (马放等, 2003), 对一些工业废水、河水、泥浆废水等具有良好的絮凝效果, 且易于

实现产业化, 因而微生物絮凝剂的开发应用前景广阔 (杨延梅等, 2001).

目前, 我国微生物絮凝剂的开发大多数处于菌种筛选阶段, 本实验室马放教授率先提出了复合型生物絮凝剂的概念 (马放等, 2003). 该絮凝剂是以

基金项目: 国家重点基础研究计划项目 (973) (No. 2004CB418505)

Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2004CB418505)

作者简介: 马 放 (1963—), 男, 教授 (博士), E-mail: mafang@hit.edu.cn; *通讯作者 (责任作者)

Biography: MA Fang (1963—), male, professor (Ph. D.), E-mail: mafang@hit.edu.cn; *Corresponding author

稻草、秸秆等廉价生物质材料为底物,利用纤维素降解菌群和絮凝菌群组成的复合型微生物絮凝剂产生菌菌群,进行两段式发酵后分离提取而获得的,该技术实现了微生物絮凝剂产絮能力的高效和稳定,同时降低了生产成本.基于上述研究成果,培育出高效的优良絮凝菌种,是今后的一个发展方向,也是本研究的一个主要内容.

原生质体融合技术作为高频重组的有效方法和遗传学研究工具,打破了不同物种间(属间、甚至门间)进行基因重组的天然障碍.原生质体融合重组由于其基因重组频率较高,并有可能导致异源DNA间的重组,而为遗传分析提供了一个有利手段(王洪洲等,1982).微生物原生质体可以经过溶菌酶处理而制备,在高渗条件下通过PEG促融,使具有不同优良性状的2株菌通过破壁、促融,将2个优良性状集中于一种微生物内(韦革宏等,2001).

原生质体融合技术作为一种育种技术,不仅可以大幅度提高产絮菌株的产絮产量,还可以获得新的遗传特性.并且能通过基因定位来确定絮凝的遗传基因在质粒上还是在染色体DNA上,从而可以有效确定絮凝菌的代谢途径,为合成新的有经济价值的代谢产物及分析代谢产物成分、研究絮凝机理提供理论基础.

本实验以原生质体融合技术为手段,以复合型微生物絮凝剂产生菌F2和F6为材料,进行原生质体的融合研究.以期对微生物絮凝菌进行改良,获得更好的絮凝效果.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 菌株

黑龙江省环境生物技术重点实验室开发的高效絮凝菌F2和F6为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),菌种生理及生化特征参见文献(马放等,2003).

2.2 培养基及试剂

LB培养基:蛋白胨 10g,酵母膏 5g,NaCl 5g,(固体培养基加琼脂 15g),pH值 7.0~7.2,定容至 1L,121℃条件下灭菌 20min

完全培养基(1L):蛋白胨 10g,酵母粉 5g,牛肉浸膏 5g,葡萄糖 5g,NaCl 5g,琼脂 15g,pH值 7.0~7.2,121℃条件下灭菌 20min

基本培养基(1L):葡萄糖 5g, K_2HPO_4 14g, KH_2PO_4 6g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g,柠檬酸钠 1g,琼脂 15g,pH值 7.0~7.2,115℃条件下灭

菌 15min

再生培养基(1L):在完全培养基中加入甘露醇($0.02mol \cdot L^{-1}$)、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0.02mol \cdot L^{-1}$).

高渗培养基(1L):在 1L 基本培养基中加入蔗糖($0.5mol \cdot L^{-1}$),顺丁烯二酸($0.02mol \cdot L^{-1}$)、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0.02mol \cdot L^{-1}$),pH值 7.0,115℃条件下高压灭菌 15min(刘伊强等,1994).

SMM高渗溶液: $0.5mol \cdot L^{-1}$ 蔗糖, $0.02mol \cdot L^{-1}$ 顺丁烯二酸, $0.02mol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,pH值 7.0,121℃高压灭菌(张克旭等,1991).

聚乙二醇(促融合剂PEG):SMM高渗溶液中加入30%的聚乙二醇,pH值 7.0,121℃条件下高压灭菌.溶菌酶(购于Amresco公司):用SMM高渗溶液配制 $20mg \cdot mL^{-1}$,过滤除菌,20℃保存.青霉素GK:青霉素GK的单位为 $1600U \cdot mg^{-1}$, -20℃保存.新生磷酸钙溶液: KH_2PO_4 0.54g, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 29.4g分别溶于100mL水中,灭菌后等体积混合. $0.1mol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH值 7.0): K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 按体积比 61.5:38.5混合,0.1MPa灭菌.

2.3 方法

2.3.1 发酵条件 取5g高岭土加至1000mL的烧杯中,然后依次加入自来水1000mL,10%的 $CaCl_2$ 溶液1.0mL和10mL发酵液,并且调节溶液pH至7.2;之后将烧杯放在搅拌仪上搅拌(快搅,慢搅)使之充分混合,静置20min后于波长550nm处测定吸光度(B).以蒸馏水代替培养液作对照空白,于波长550nm处测定吸光度(A).通过絮凝率F来表示絮凝活性,公式如下(Nakamura *et al.*, 1976):

$$F = (B - A) / B \times 100\% \quad (1)$$

2.3.2 絮凝菌质粒提取 挑取1个单菌落于液体完全培养基中,30℃培养至对数晚期(即OD值为0.6),从培养液中取1~2mL于干净的离心管中,12000 $r \cdot min^{-1}$ 离心30s收集菌体,弃上清.然后将菌体重悬于100 μL 冰预冷的裂解液I中,剧烈振荡;再加200 μL 新鲜配制的裂解液II于细菌悬浮液中,盖紧管口,快速颠倒离心管5次以混合内容物(切勿振荡),将离心管放置于冰上;最后加150 μL 用冰预冷的裂解液III,盖紧管口反复颠倒数次,使溶液II在黏稠的细菌裂解物中分散均匀,将管置于冰上3~5min后12000 $r \cdot min^{-1}$ 离心5min.将上清转移至另一个离心管中,加等体积的酚、氯仿振荡混合有机相,然后12000 $r \cdot min^{-1}$ 离心2min;将上清液转移至另一个离心管中,用2倍体积的乙醇于室温沉淀

质粒 DNA,振荡混合,于室温放置 2min,用 $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min,收集沉淀的质粒 DNA,加 70%乙醇于沉淀中并将盖紧的试管颠倒数次,用 $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2min回收质粒 DNA.用 50 μL 含有 RNA 酶 A 的 TE 缓冲液溶解质粒 DNA,温和振荡几秒钟,于 -20°C 保存.参照文献(J 萨姆布鲁克等,2002).

2.3.3 抗性遗传标记选择 为了筛选转化菌,选取 2 种抗生素(氨苄青霉素和卡那霉素),分别向 LB 培养剂中加入 20、30、40、50、60、70、80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗生素,制成不同抗生素、不同浓度的培养基平板,将转化菌接种于加入抗生素的培养基平板上,观察菌株在平板上的生长情况,以确定其药物抗性遗传选择标记.

2.3.4 絮凝菌质粒 DNA 转化大肠杆菌 取感受态细胞 DH5 α 100mL 于 1.5mL 预冷的无菌离心管中,加入 10 μL 待转化的质粒 DNA 混匀,冰浴 30min 后用无菌水代替质粒 DNA 作阴性对照.将离心管置于 42°C 恒温水浴中热激 90s,然后放回冰上 3~5min,加入 800 μL 无抗生素的 LB 液体培养基至 37°C 震荡培养,预表达 45~60min;最后将预表达菌液涂布在含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上,同时涂无抗生素平板作为对照, 37°C 培养, 12~16h 长出单菌落.

2.3.5 青霉素 GK 预处理对菌液活性的影响 在 F2、F6 生长到对数生长中期时,向菌液中分别加入最终浓度为 0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、8、80、800 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素 GK, 0 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为不加青霉素 GK 的对照,测定青霉素 GK 处理对菌液活性的影响.

2.3.6 原生质体的形成 挑取单菌落于 10mL 液体完全培养基中, 30°C 、 $130\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 14~15h 后,从其中取 1mL 菌液转接到 20mL 新鲜的液体完全培养基中, 30°C 、 $130\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡再培养 1~2h,然后按所需的最终浓度加入青霉素 GK 预处理,继续培养至所需要的时间.取预处理过的菌液于 $4500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min,弃上清液,收集菌体.菌体用磷酸缓冲液洗涤 2 次,再用 SMM 高渗溶液洗 1 次,将菌体悬浮于 SMM 高渗溶液中,在菌体悬浮液中加入溶菌酶使终浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,混匀, 37°C 保温 30min;镜检,至 95% 以上的细胞变成球状原生质体后终止反应.在 $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 10min,收集原生质体,用 SMM 高渗溶液洗涤、悬浮(林红雨等,1999).

2.3.7 原生质体的融合 取等体积 F2 和 F6 的原

生质体悬浮液混合均匀, $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min 弃上清液,加少许 SMM 高渗溶液悬浮.加入 30% PEG 溶液 4.8mL 和新生磷酸钙溶液 0.2mL 轻轻混匀, 30°C 恒温箱中保温处理 10min 形成融合子.当 PEG 溶液处理之后, $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min 收集融合子.用 SMM 高渗溶液将融合子表面残存的 PEG 溶液洗去,并稀释融合子.稀释液于 SMM 高渗培养基平板上培养, 30°C 恒温箱保温培养 48h 培养融合子细胞,利用透射电镜观察确定所培养的细胞为融合细胞.最后挑选稳定的融合子,在再生培养基上保存融合子细胞.

3 结果 (Results)

3.1 质粒提取结果

提取絮凝菌 F2、F6 的质粒,将具有絮凝特性的絮凝菌的质粒转化到无絮凝特性的受体菌 DH5 α 中.如果仍然产生絮凝现象,说明絮凝基因在质粒 DNA 上,若不产生絮凝现象,则初步说明絮凝基因在染色体 DNA 上.

因此,本实验提取了絮凝菌 F2、F6 的质粒 DNA,并进行琼脂糖凝胶电泳,如图 1 所示. 1 泳道为 DNA Marker, 3 泳道为絮凝菌 F6 的电泳结果,从结果来看 F6 不含质粒,则认为 F6 的絮凝基因不在质粒上,而在染色体 DNA 上. 2 泳道为絮凝菌 F2 含有的质粒 DNA,其结果无法证明絮凝基因的位置,因此,需做质粒转化实验来验证.所以,在 F2 的絮凝基因定位实验中,将絮凝菌 F2 的质粒转化到无絮凝特性的受体菌 DH5 α 中,通过絮凝试验判断转化菌是否具有絮凝特性,从而判断絮凝特性是否表现在质粒上,以确定 F2 的絮凝基因是由染色体 DNA 控制还是由质粒 DNA 控制.

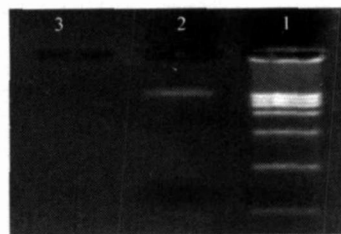


图 1 质粒 DNA 电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis profile of Plasmid DNA

3.2 抗生素抗性遗传选择标记的测定

确定抗生素抗性遗传选择标记,可以作为转化菌筛选的选择标记.在选择过程中,由于受体菌

DH5 α 无选择标记,而 F2的质粒对抗生素具有抗性,所以,只有携带抗生素抗性遗传选择标记的转化菌,才能在含有抗生素的培养基上生长,并以此确定质粒转入到受体菌中.结果见表 1.

表 1 絮凝菌株对抗生素的抗性测定
Table 1 Test of resistance of the flocculation producing strain to the antibiotics

抗生素	絮凝菌浓度 / (mg·L ⁻¹)						
	20	30	40	50	60	70	80
氨苄青霉素	+	+	+	+	+	+	+
氯霉素	-	-	-	-	-	-	-

注: + 表示具有抗生素抗性; - 表示不具有抗生素抗性

由表 1可知,含有质粒的絮凝菌对氨苄青霉素具有抗性,对氯霉素无抗性.因此,在质粒转化实验中,利用氨苄青霉素作为抗性遗传选择标记.

3.3 质粒转化大肠杆菌

将絮凝菌 F2的质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中,由于该质粒具有氨苄青霉素抗性遗传选择标记,而大肠杆菌 DH5 α 无氨苄青霉素抗性遗传选择标记.所以,在含有氨苄青霉素、IPTG、X-gal的平板培养皿上筛选得到的菌落,通过提取转化菌的质粒确定为转化菌.

3.4 转化子絮凝测定

以转化菌作待测样,作 2组平行试验,每组选取 19个转化菌,另外将絮凝菌 F2作对照待测样,测絮凝率.如图 2所示,1为絮凝菌 F2,测定其絮凝率为 84%; 2~20分别为不同菌落的转化菌.由图可见,转化菌的絮凝效果明显低于原菌 F2,且没有絮凝沉淀产生.说明转化菌不具有絮凝特性,即絮凝性状不受质粒控制或主要遗传性状不受质粒控制,初步可以判断絮凝基因在染色体 DNA上.因此,下一步对絮凝菌作细胞融合,期望融合子实现絮凝基因高效重组.

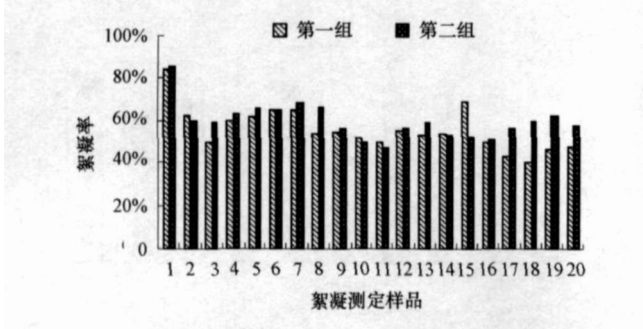


图 2 絮凝菌和转化子的絮凝率比较示意图
Fig 2 Fusant for flocculation producing strain and transformants

3.5 青霉素 GK处理对菌液活性的影响

由于 F2为革兰氏阴性细菌, F6为革兰氏阳性细菌,且革兰氏阳性细菌的细胞壁比较厚,由肽聚糖和磷壁酸组成,因此,细胞壁的酶解难度大,单用溶菌酶处理细胞难以形成原生质体.青霉素会抑制肽聚糖的合成,当其作用于细胞壁的某些部位能提高细胞壁对溶菌酶的敏感性,溶菌酶容易发生作用.虽然革兰氏阴性菌细胞壁中的肽聚糖层远比革兰氏阳性菌薄,但是革兰氏阴性菌的细胞壁结构复杂,细胞壁有一层较厚的由脂类、多糖和蛋白质组成的复杂外层,一般溶菌酶对它没有作用.因此,用溶菌酶直接处理制备的细胞不称为原生质体,而称其为原生质球,其上面还残留部分细胞壁.所以,利用青霉素 GK作预处理,再用溶菌酶处理,可以在较短的时间内得到原生质体.而在青霉素 GK预处理时,加入不同剂量的青霉素以及青霉素不同的作用时间都对细胞形成原生质体有很大的影响.因此,需要确定青霉素 GK最适浓度及最佳作用时间.结果见图 3.

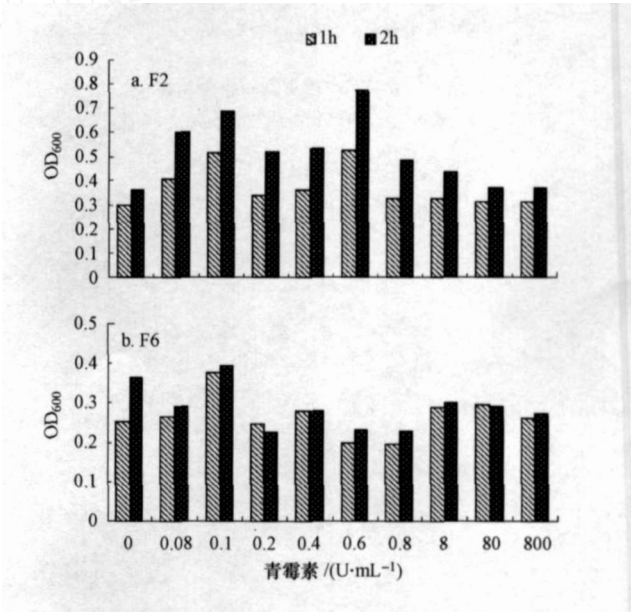


图 3 各种浓度的青霉素在不同时间对菌体生长的影响
Fig 3 Effect of different concentration of penicillin on the growth

由图 3可知,随着青霉素 GK浓度的增大和作用时间的延长,青霉素对菌液活性的抑制作用由逐渐减小到逐渐增强,成一个峰值.在 1h、2h处吸光度变化一致,选最短时间作用为佳.由图 3a所示,青霉素 GK浓度在 0.6U·mL⁻¹时, F2的菌液活性最强,也就是青霉素 GK对菌液生长抑制作用最小,随着青霉素浓度的增大,开始出现抑制作用,且抑制作

用明显增强. 同样, 由图 3b所示, 青霉素 GK浓度在 $0.1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, F6的菌液活性最强, 即此时菌液细胞浓度最大, 随着青霉素浓度的增大, 开始出现抑制菌株生长的趋势. 因此, 确定了青霉素 GK对 F2、F6作用的最佳浓度为 $0.6\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最佳作用时间为 1h

3.6 原生质体的形成

经过青霉素 GK的预处理以及溶菌酶处理, F2和 F6逐渐形成原生质体 (见图 4). 原菌株细胞为杆状菌 (见图 5), 当细胞完全破壁形成原生质体后, 利用光学显微镜观察, 观察结果: 原生质体为球形, 无细胞壁存在. 又利用透射电镜观察 (见图 6), 其观

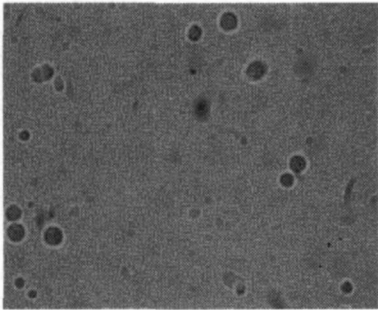


图 4 光学显微镜下细胞原生质体
Fig 4 Cell protoplast under optical microscope

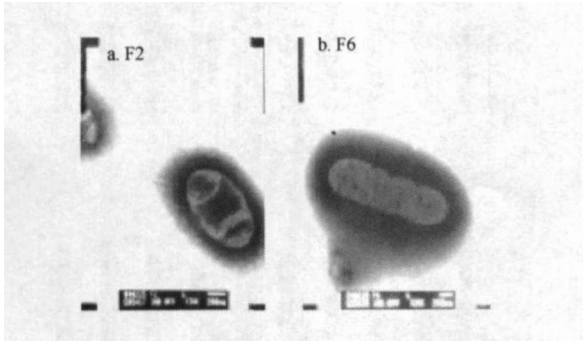


图 5 菌株照片

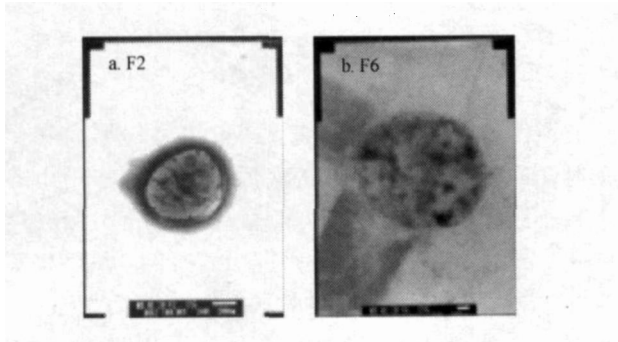


图 6 菌株原生质体照片
Fig 6 Picture of protoplast for strains

察结果与光学显微镜观察的一致, 并且由图 6b中可知, F6细胞带有鞭毛, 尽管细胞脱壁, 鞭毛仍然存在细胞体上, 因此, 会致使 2个原生质体难于靠近, 为细胞融合带来了难度.

3.7 原生质体融合

菌株 F2、F6被制成原生质体后, 利用促融剂聚乙二醇促融合, 最后将融合处理后的菌液涂布在 SMM高渗培养基平板上, 得到的融合菌通过透射电镜观察 (见图 7)可初步认为是融合株.

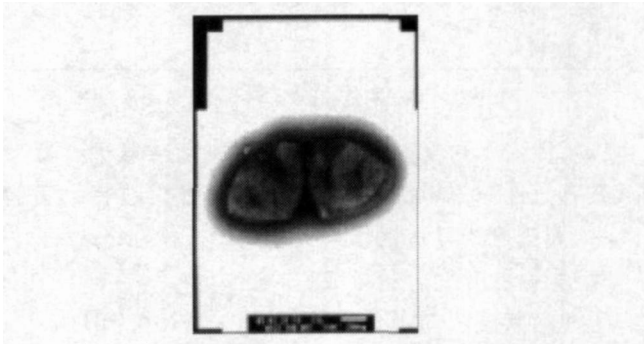


图 7 F2、F6原生质体融合
Fig 7 Picture of protoplast fusant for strains of F6 and F2

3.8 融合子的絮凝测定

F2、F6为原絮凝菌, R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7为不同菌落的融合子. 絮凝测定结果如图 8所示, 原菌 F2的絮凝率为 84%, 原菌 F6絮凝率为 83%, 融合子絮凝率也都在 80%以上, 有的絮凝率高达 87.8%. 从产絮情况来看, 融合子与 F2、F6都产生较大的矾花. 结果表明, 融合子仍具备絮凝菌的絮凝效果, 而且融合子絮凝效果与亲本菌株 F2、F6相当, 可以推测融合子遗传了絮凝菌的絮凝基因. 因此, 原生质体融合技术不仅能使遗传基因高效重组, 而且可以集双亲优良遗传性状为一体. 影响融合子絮凝效果的因素及条件将在后续的文章中报道, 并对融合子的遗传多样性作进一步的研究.

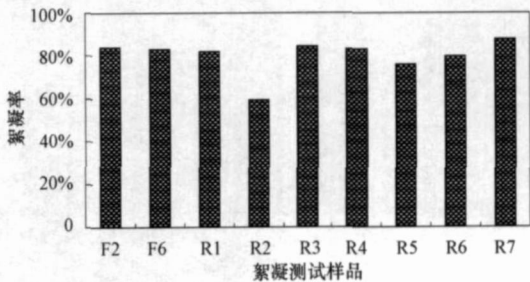


图 8 F2、F6和融合细胞的絮凝率比较示意图
Fig 8 Fusant for F6、F2 and fusion Cell

4 结论 (Conclusions)

1)利用质粒转化技术对絮凝菌 F2、F6做基因定位研究,确定了絮凝菌的絮凝基因在染色体DNA上。

2)测定菌株 F2、F6对青霉素的敏感反应,确定了青霉素对 F2、F6作用的最佳浓度为 $0.6\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,最佳作用时间为 1h

3)利用透射电镜观察,絮凝菌 F2、F6 已经融合,通过絮凝测定验证融合子絮凝效果很好,絮凝率高达 87.8%。

4)融合子仍具备絮凝菌的絮凝效果,而且絮凝效果与原菌相当,可以推测融合子遗传了絮凝菌的絮凝基因。

References:

- Lin H Y, Chen C S, Yin G L, *et al* 1999. Intergeneric cell fusion of *oryneba cterium* and *erwina* [J]. *Microbiology*, 26 (1): 3—6 (in Chinese)
- Liu Y Q, Wang Y P, Pan N S, *et al* 1994. Studies on Formation, Regeneration and Interspecific Fusion of Protoplasts from *Bacillus Subtilis* and *Bacillus Thuringiensis* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 34 (1): 76—80 (in Chinese)
- Ma F, Liu J L, Li S G, *et al* 2003. Development of Compounded Biofloculant [J]. *China Water and Waste Water*, 19 (4): 1—4 (in Chinese)
- Nakamura J, Miyashiro S 1976. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants [J]. *Agric Biol Chem*, 46 (2): 377—383
- Sambrook J, Russell D W. 2002. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Science publishing company [M]. Beijing: Science Press (in Chinese)
- Wang H Z, Zheng Y X. 1982. Studies on the protoplast of *streptomyces qingfengmyceticus* in regeneration, fusion and regroup [J]. *Acta Genetica Sinica*, 9 (3): 172—179 (in Chinese)
- Wei G H, He X L, Guo J, *et al* 2001. Studies on Intergenera Fusion of Protoplasts from *Rhizobium leguminosorum* and *Sinorhizobium xinjiangensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 17 (5): 534—358 (in Chinese)
- Yang Y M. 2001. Screening of Microbial Flocculant - producing Bacteria and Examination of Floccular Effect for Related Waste Water [J]. *Journal of Chongqing Architecture University*, 23 (5): 104—109 (in Chinese)
- Zhang K X, Chen N, Zhang Y Z, *et al* 1991. Breeding the high - yield strain of glutamic acid by the Fusion of protoplast [J] *Acta Microbiologica Sinica*, 31 (2): 180—186 (in Chinese)

中文参考文献:

- J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 黄培堂, 等译. 2002. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社
- 林红雨, 陈策实, 尹光琳. 1999. 欧文氏杆菌和棒杆菌的属间融合研究 [J]. *微生物学通报*, 26 (1): 3—6
- 刘伊强, 王雅萍, 潘乃棣, 等. 1994. 芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究 [J]. *微生物学报*, 34 (1): 76—80
- 马放, 刘俊良, 李淑更, 等. 2003. 复合型微生物絮凝剂的开发 [J]. *中国给水排水*, 4 (19): 1—4
- 王洪洲, 郑幼霞. 1982. 庆丰链霉菌原生质体的形成、再生及融合重组的研究 [J]. *遗传学报*, 9 (3): 172—179
- 韦革宏, 贺学礼, 郭杰, 等. 2001. 豌豆根瘤菌与新疆中华根瘤菌原生质体的属间融合研究 [J]. *生物工程学报*, 17 (5): 534—538
- 杨延梅. 2001. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及相关废水絮凝效果验证 [J]. *重庆建筑大学学报*, 23 (5): 104—109
- 张克旭, 陈宁, 张永志, 等. 1991. 用原生质体融合选育谷氨酸高产菌 [J]. *微生物学报*, 31 (2): 180—186