

文章编号: 1000-0615(2002)01-0035-07

诺卡氏菌与假丝酵母的跨界融合 及对退化养殖生态的修复

吴伟¹, 余晓丽², 李咏梅², 瞿建宏¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心环境保护研究室, 江苏 无锡 214081;

2. 广西壮族自治区水产研究所, 广西 南宁 530021)

摘要: 运用溶菌酶和蜗牛酶破细胞壁, PEG 和 Ca^{2+} 促融的方法完成了诺卡氏菌和假丝酵母的跨界融合, 得到具有亲本优势的融合细胞二株: GW01 和 GW02。通过菌落形态比较、抗生素抗性鉴定、耐热性和耐酸性比较、生长速率对比的分析, 可确定其为真正的融合细胞。融合细胞较亲本细胞对水体和水质的适应范围更广, 降解速率更快, 能大幅去除养殖水体环境中的 COD 、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 PO_4^{3-} 等, 稳定 pH, 提高水中 DO 及水体生态环境中微生物和浮游生物的生物多样性, 减少换水量, 从而改善养殖生态环境, 促进养殖生产。

关键词: 诺卡氏菌; 假丝酵母; 原生质体融合; 养殖生态; 生物修复

中图分类号: Q813 文献标识码: A

Inter-kingdom protoplast fusants between *Nocardia* sp. and *Candida* sp. used to bioremediation for the degeneration fishery ecology

WU Wei¹, YU Xiao-li², LI Yong-mei², QU Jian-hong¹

(1. Environ Prot Res Dep., Freshwater Fisheries Research Center, Wuxi 214081, China;

2. Fisheries Research Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

Abstract: GW01 and GW02 were the fusants between *Nocardia* sp. and *Candida* sp. through inter-kingdom protoplast fusion using PEG, Ca^{2+} , lysozyme and snailase. After analyzing the comparisons of form, resistance to antibiotics, heat resistance, acid resistance and the growth rate, GW01 and GW02 could be confirmed to be the true fusants. The fusants were more widely suitable to the fishery water quality than the parental strains. They could rapidly degrade the harmful composition of the water, such as COD, NH_4^+ , NO_2^- , PO_4^{3-} , improve the concentration of DO and the biodiversity of the microorganisms in the water. The results suggested that the technique of inter-kingdom protoplast fusion might offer ideally new strains for bioremediation for the degeneration fishery ecology.

Key words: *Nocardia* sp.; *Candida* sp.; protoplast fusion; fishery ecology; bioremediation

近年来,我国名特优海淡水产品的养殖中所存在的主要问题是养殖水体的自身污染日趋严重,养殖

收稿日期: 2001-04-09

基金项目: 广西壮族自治区科研基金资助项目(桂科金 9916028)

作者简介: 吴伟(1967-),男,江苏无锡人,副研究员,主要从事环境生物学的研究。Tel: 0510-5551443, E-mail: fep@public1.wx.js.

水域的环境质量日益下降。水体中大量耗氧有机物和有害无机物的累积,不仅可直接对养殖生物造成危害,而且可使得病原微生物滋生繁衍,导致养殖品种暴发性疾病的发生。因此,养殖水体生态环境的控制已成为发展名特优水产品养殖的关键,也是实现我国水产养殖业可持续发展的基本保障。

微生物由于具有增殖速度快,对污染物降解转化能力强而日益受到重视。在水产养殖上已有诸如应用光合细菌、复合微生物菌群控制水质因子的报道^[1-2]。随着现代生物技术的快速发展,将传统微生物学与现代技术有机结合,可大大提高微生物的降解效力,扩大降解范围^[3]。近年来,应用原生质体融合,通过基因体内重组构建具有多种优势的基因工程菌的生物技术便得到世人的关注^[4-8]。最近十年,美国科学引文索引(SCI)共录用有关原生质体融合技术的研究报导1000余篇,但其中缺乏应用该项技术构建特效菌株控制养殖水体环境质量的报导。为此本项研究首次进行原核生物诺卡氏菌与真核生物假丝酵母的跨界融合,利用其融合细胞的优势来对退化养殖生态进行恢复与重建,为水产养殖环境的生态调控开辟一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验菌株为诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)和假丝酵母(*Candida* sp.),由淡水渔业研究中心环境保护研究室从水环境中分离,并经南京大学环境微生物教研室鉴定到属,两菌株均不含有抗性质粒。

1.2 培养基

培养诺卡氏菌和假丝酵母所用的基础培养基成份见文献[9],固体培养基中加入2.0%的琼脂;细胞融合所用的高渗培养基、选择性培养基和缓冲液见文献[10,11]。

1.3 试剂

溶菌酶为上海华美公司产品;蜗牛酶为Sigma公司产品;聚乙二醇(PEG, MW=6000)为日本进口,国内分装;其余试剂均为国产分析纯化学试剂。

1.4 方法

1.4.1 诺卡氏菌与假丝酵母原生质体的形成与再生

将斜面菌种接入液体培养基中,30℃恒温振荡培养到对数生长期,再转入一定量的液体培养基中培养24h。取10mL于无菌离心管中,在 $2500r \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心10min。去除上清液,用缓冲液洗涤3次,转入原生质体稳定液中,加入一定浓度的脱壁酶液(诺卡氏菌用溶菌酶,假丝酵母用蜗牛酶),30℃水浴保温30~40min,得到原生质体。然后在 $3000r \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心10min,并用稳定液反复洗涤几次,得到纯原生质体,以便融合试验所用。同时将原生质体接种于再生培养基上可得原生质体的再生率^[4,11]。

$$\text{原生质体的再生率} = [(D - B) \times 100\%] \div (A - B)$$

其中,A:未经酶处理的总菌数(取一定量的菌体样品,稀释、涂平板,长出菌落后统计其总数);B:经酶处理的总菌数(取上述同样量的菌体,加酶处理后,用水稀释使原生质体破裂后涂平板,统计其菌落数);C:酶解反应中未脱壁的细胞菌落数;D:再生培养基上的总菌落数。

1.4.2 诺卡氏菌与假丝酵母原生质体的跨界融合

将两亲株的原生质体等量混合后,加入经30℃温浴的40%的PEG(MW:6000)(因PEG是用稳定液配制,稳定液中已含一定量的 Ca^{2+} ,故不需再加 Ca^{2+}),30℃温浴25~30min,然后离心,用稳定液洗涤悬浮后在选择性培养基上涂布,30℃恒温培养3~4d后观察融合子菌落的出现情况。并将不同的菌落转接于斜面上,以便进行生理生化及遗传背景的研究。

1.4.3 诺卡氏菌与假丝酵母融合细胞的鉴定

融合细胞与双亲细胞菌落形态的比较:包括大小、色泽、表面形态等。

融合细胞与双亲细胞对抗菌素的抗性比较:分别在平板培养基中加入一定量的链霉素

(*streptomycin*, Sm 100U·mL⁻¹)、制霉菌素(*nystatin*, Nt 100U·mL⁻¹) 以及两者的混合物(Sm 100U·mL⁻¹+ Nt 100U·mL⁻¹), 观察融合细胞与双亲细胞在平板上的生长情况。

融合细胞与双亲细胞的生长速率和对 COD 的去除率比较: 将融合细胞与等量的双亲细胞分别接种于装有 200mL 无菌葡萄糖液(COD 为 100mg·L⁻¹) 的 250mL 三角瓶中, 30℃振荡培养, 分别在 12h 和 24h 后测定菌体细胞的生长速率和对水质 COD 的去除率。水质 COD 的测定采用酸性高锰酸盐法^[12]。

融合细胞与双亲细胞耐热性与耐酸性的比较: 将融合细胞与双亲细胞分别接种于液体培养基中, 培养基的 pH 值分别为 5.6、6.0 和 7.2, 分别同时置于 30℃、35℃和 40℃恒温培养 24 h, 测定反应起始和终了时的菌体密度(cell·mL⁻¹)。以各反应温度和 pH 条件下菌体密度比生长率表示各菌株的耐热和耐酸性。

1.4.4 双亲细胞和融合细胞对退化养殖生态的生物修复作用

修复试验在广西某河蟹育苗水体中进行, 水体有效面积为 80m², 水深 0.4m。该水体因长期进行人工育苗试验, 水质恶化, 生态失衡。试验周期为一个月, 试验期间水温在 25℃之上, 同时设置相同规模和水质条件的对照组。双亲细胞和融合细胞采用培养到对数生长期的菌液, 使用方法和浓度为: 每一个周期第一次使用 20mg·L⁻¹, 以后每三天添加 15mg·L⁻¹, 菌液采用全池泼洒。菌液每一个使用周期末(第 3 天)进行水质和生物的测定, 以了解融合细胞和双亲细胞对水质的净化功能。所选用的主要监测指标为 NH₄⁺-N(纳氏试剂比色法)、NO₂⁻-N(盐酸奈乙二胺比色法)、COD(高锰酸盐法)、pH(玻璃电极法)、DO(碘量法)、PO₄³⁻-P(钼蓝比色法)、微生物数量(多管发酵法)及浮游生物^[12]。试验重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 诺卡氏菌与假丝酵母原生质体的形成与再生

诺卡氏菌和假丝酵母原生质体的形成率和再生率的试验结果见表 1。

从表 1 的结果可以看出, 诺卡氏菌和假丝酵母的细胞原生质体形成率较高, 分别达到 88.64% 和 90.57%, 说明诺卡氏菌在溶菌酶中和假丝酵母在蜗牛酶中细胞的脱壁效果相当明显。与此同时, 诺卡氏菌和假丝酵母的细胞原生质体的再生率则较低, 分别只有 14.08% 和 12.78%, 表明在

酶解脱壁过程中, 大部分的细胞原生质的质膜受到破坏, 导致丧失再生的能力。这也是假丝酵母的原生质体的形成率较放线菌高而再生率反而低的原因所在。显微镜下可见两亲株的原生质体在高渗溶液中的形状为圆球形, 而非亲本细胞的杆形和长圆形。

原生质体的形成率与再生率和酶处理的温度、时间有一定的关系。诺卡氏菌和假丝酵母的细胞原生质体形成率与再生率和酶处理的时间、温度的关系详见图 1~ 图 4。从上述 4 图可以看出, 随着酶作用时间的延长, 细胞壁被逐渐分解, 原生质体形成率也不断提高, 而与此同时原生质体的再生率却随之下降。而温度同样也起着影响作用, 温度太高或太低效果均不佳。因此, 诺卡氏菌原生质体形成和再生的最佳酶处理时间与温度分别为 40min 和 30℃, 假丝酵母原生质体形成和再生的最佳酶处理时间与温度分别为 30min 和 30℃。

2.2 诺卡氏菌和假丝酵母原生质体的跨界融合

根据基础培养基和选择性培养基上的菌落类型, 将其在平板上培养后可得到异于亲本菌株的融合菌株两株, 并经多次传代培养, 发现其具有一定的稳定性。两菌株分别编号为: GW01, GW02。

表 1 诺卡氏菌和假丝酵母原生质体的形成率和再生率

Tab.1 The rate of protoplast formation and regeneration in *Nocardia* sp. and *Candida* sp.

菌株 strains	原生质体形成率 the rate of protoplast formation(%)	原生质体再生率 the rate of protoplast regeneration(%)
诺卡氏菌 <i>Nocardiasp.</i>	88.64	14.08
假丝酵母 <i>Candida sp.</i>	90.57	12.78

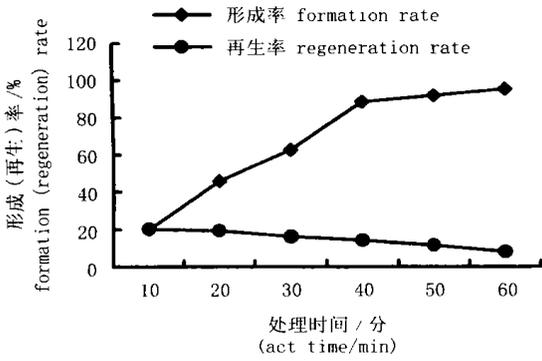


图1 诺卡氏菌原生质体形成率、再生率与酶处理时间的关系

Fig.1 The relationship between the action time and the rate of protoplast formation or regeneration in *Nocardia* sp.

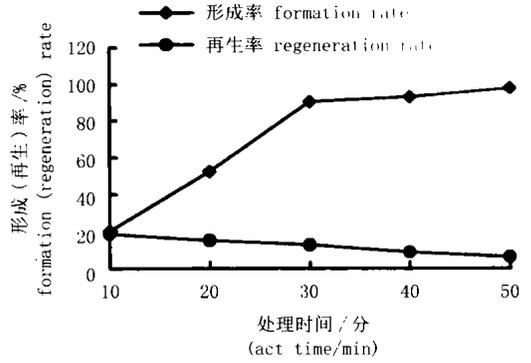


图2 假丝酵母原生质体形成率、再生率与酶处理时间的关系

Fig.2 The relationship between the action time and the rate of protoplast formation or regeneration in *Candida* sp.

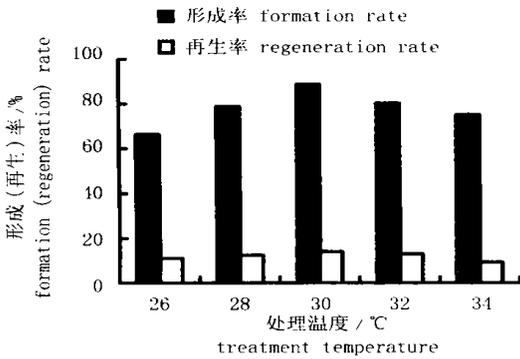


图3 诺卡氏菌原生质体形成率、再生率与酶处理温度关系

Fig.3 The relationship between the action temperature and the rate of protoplast formation or regeneration in *Nocardia* sp.

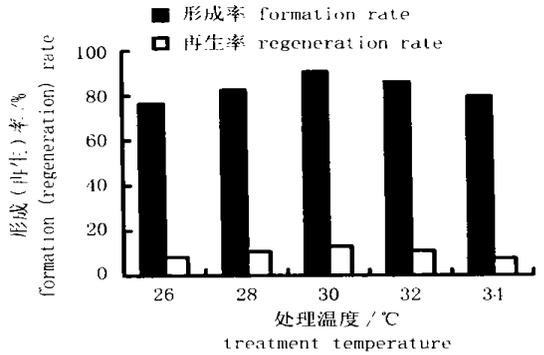


图4 假丝酵母原生质体形成率、再生率与酶处理温度关系

Fig.4 The relationship between the action temperature and the rate of protoplast formation or regeneration in *Candida* sp.

2.3 诺卡氏菌和假丝酵母融合细胞的鉴定

2.3.1 融合细胞与双亲细胞菌落形态的比较

融合细胞在平板上的菌落呈圆形,直径较之亲本细胞要大一些;GW01株表面有一些皱褶,呈淡粉红色,表型接近诺卡氏菌;而GW02株的边缘整齐,表面隆起,有粘液状,呈乳黄色,表型又靠近假丝酵母。从菌落的表型来看,融合细胞除了稍大一些外,其它方面是介于两亲本细胞之间的。

2.3.2 融合细胞与双亲细胞对抗菌素的抗性比较

融合细胞菌株与二亲本细胞的抗性比较详见表2。从表2可以看出,诺卡氏菌只能在含制霉菌素的培养基上生长,假丝酵母只能在含链霉素的培养基上生长,而GW01和GW02两株杂合细胞则可同时在三种选择性培养基上生长。说明通过原生质体的融合,融合子同时继承了来自两类不同亲株的抗性因子,体现了融合子遗传的稳定性。

2.3.3 融合细胞与双亲细胞生长速率和对COD的去除率的比较

在培养12h和24h后测定的菌体细胞生长率和对水质COD的去除率分别见图5、图6。从图5可以看出,培养24h,两融合细胞的生长率要高于双亲细胞,分别为亲株的1.2~1.9倍;图6则显示出在振荡处理24h后,两融合细胞去除COD的效率也均高于双亲细胞。另通过计算比增长率 $U [U = (\ln X_n -$

$\ln X_0 / \Delta t$, 式中 X_0 为反应初始生物量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), X_n 为反应终止生物量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Δt 为反应时间得出 U 值由高到低的顺序为: GW02(0.093468), GW01(0.093016), 假丝酵母(0.089377), 诺卡氏菌(0.076723); 从比降解率 $q\{q = U(S_0 - S_n) / [X_0(e^{Ut} - 1)]\}$, 式中 S_0 为起始污染物浓度($\text{COD}, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), S_n 为反应终止时污染物浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), r 的由高到低的顺序同样为: GW02(2.6×10^{-8}), GW01(2.5×10^{-8}), 假丝酵母(2.2×10^{-8}), 诺卡氏菌(2.0×10^{-8})。表明两融合细胞在菌体繁殖能力和降解 COD 的两个方面均比亲本有明显的优势。从水质处理角度来说, 能得到菌体生长率高, 去除 COD 能力强的菌株是十分理想的。

表 2 融合细胞菌株与二亲本细胞的抗性比较

Tab. 2 The comparisons of resistance to antibiotics between fusants and parental strains

项 目 item	亲本细胞 parental strains		融合细胞 fusants	
	诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> sp.	假丝酵母 <i>Candida</i> sp.	GW01	GW02
链霉素 <i>streptomycin</i>	-	+	+	+
制霉菌素 <i>nystatin</i>	+	-	+	+
链霉素 <i>streptomycin</i> + 制霉菌素 <i>nystatin</i>	-	-	+	+

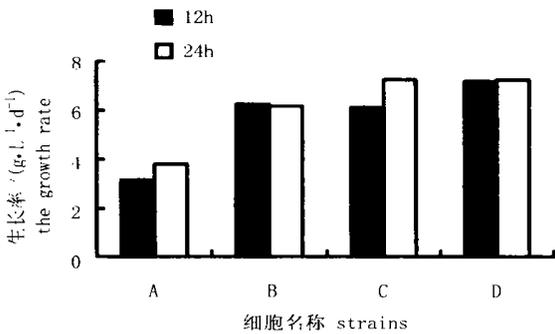


图 5 菌体细胞生长率

Fig. 5 The growth rate of fusants and parental strains

A: 诺卡氏菌 B: 假丝酵母 C: GW01 株 D: GW02 株
A: *Nocardia* sp. B: *Candida* sp. C: GW01 strain D: GW02 strain

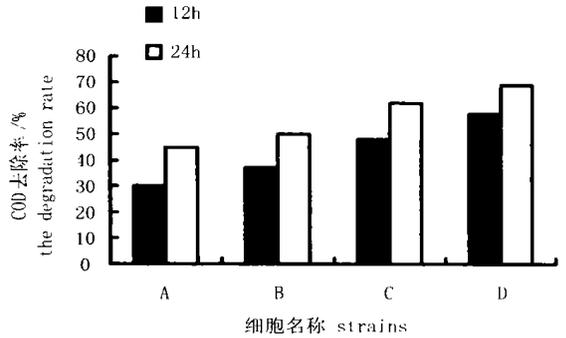


图 6 菌体细胞去除 COD 效率

Fig. 6 The degradation rate of COD by fusants and parental strains

A: 诺卡氏菌 B: 假丝酵母 C: GW01 株 D: GW02 株
A: *Nocardia* sp. B: *Candida* sp. C: GW01 strain D: GW02 strain

2.3.4 融合细胞与双亲细胞耐热性与耐酸性的比较

融合细胞与双亲细胞的耐热性比较见表 3; 融合细胞与双亲细胞的耐酸性比较见表 4。从表 3 和表 4 可以发现, 双亲细胞中诺卡氏菌的耐热性和耐酸性均远远低于假丝酵母, 但通过原生质体融合之后, GW01 和 GW02 菌株由于具有双亲的遗传优势, 因此, 其耐热性和耐酸性都介于两亲本细胞之间, 对各种环境条件的适应性显得更强了, 更有利于水质的净化。

表 3 融合细胞与双亲细胞的耐热性比较

Tab. 3 The comparisons of heat resistance between fusants and parental strains

菌株 strains	起始菌浓度* mc. at first	30°C		35°C		40°C	
		菌浓度* mc.	增长率(%) growth rate	菌浓度* mc.	增长率(%) growth rate	菌浓度* mc.	增长率(%) growth rate
诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> sp.	2.95	18.6	530.5	12.24	314.9	5.78	95.9
假丝酵母 <i>Candida</i> sp.	2.95	25.2	754.2	22.8	672.9	15.03	409.5
GW01	2.95	27.5	832.2	18.7	533.9	10.86	268.1
GW02	2.95	27.8	842.3	20.5	594.9	12.36	319.0

* 菌浓度为 $\times 10^7 \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ (mc. is $\times 10^7 \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$) "mc." means "microorganism concentration".

表4 融合细胞与双亲细胞的耐酸性比较

Tab. 4 The comparisons of acid resistance between fusants and parental strains

菌株 strains	起始菌浓度* mc. at first	pH 5.6		pH 6.0		pH 7.2	
		菌浓度* mc.	增长率(%) growth rate	菌浓度* mc.	增长率(%) growth rate	菌浓度* mc.	增长率(%) growth rate
诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> sp.	2.95	2.84	-3.7	4.20	42.8	18.6	530.5
假丝酵母 <i>Candida</i> sp.	2.95	25.2	754.2	22.5	662.7	15.03	409.5
GW01	2.95	17.25	484.7	27.5	832.2	18.25	516.9
GW02	2.95	23.5	696.6	27.8	842.3	17.6	496.6

* 菌浓度为 $\times 10^7 \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ (mc. is $\times 10^7 \text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$) "mc." Means "microorganism concentration".

综上所述,可以得出:GW01和GW02菌株是放线菌~诺卡氏菌和酵母菌~假丝酵母实现原生质体跨界融合后所得的融合细胞株。

2.4 诺卡氏菌与假丝酵母双亲细胞和融合细胞对退化养殖生态的修复作用

为了验证融合细胞对退化养殖生态修复的功效,在广西某河蟹育苗场进行了生产性应用试验。试验周期为25d,试验中不换水。每三天测定水质一次,试验结果见表5(表中结果为平均值)。从表5可以看出,融合菌株与双亲菌株相比,由于其对水体中的有机物有较大的降解作用,因此能减少水中溶氧的消耗,从而间接地增加水中的溶氧。溶氧的增加量可比双亲菌株高出2%,比对照组高15%。同时溶氧的增加可使底部的还原反应受阻,直接的结果是有害成份硫化物(S^{2-})的减少。双亲细胞中放线菌转化氨氮的能力较酵母菌要高得多,同时酵母菌又比放线菌更能降解亚硝基氮。因此,承接了双亲优势的GW01和GW02菌株兼具了同时降低水中氨氮与亚硝基氮的功效。另一方面,由于其能大量分解各种有害物质,减少了水体的酸化程度,pH则略有上升,并为各种微型生物的生长繁殖提供了有机碎屑,水中微生物数量和种类略有增加。但因其同时竞争了水中的无机营养盐,藻类数量略有下降,藻类种类则有所增加。水中微型生物的增加使四菌株在悬浮物去除的这一项上没有什么区别。

表5 双亲细胞和融合细胞对退化养殖生态的修复作用

Tab. 5 The bioremediation for the degeneration fishery ecology by fusants and parental strains (%)

项目 item	诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> sp.	假丝酵母 <i>Candida</i> sp.	GW01	GW02	对照 contrast
pH	0	0	+1.2	+1.8	0
DO	+3.5	+3.8	+5.2	+5.5	-12
NH_4^+ -N	-32	-8	-28	-25	+42
NO_2^- -N	-6	-48	-42	-45	+15.8
PO_4^{3-} -P	-54	-52	-58	-60	+11.3
S^{2-}	-0.6	-1.1	-2.5	-3.1	+23.6
SS	+8.0	+7.8	+12.3	+14.0	+13.6
COD	-28	-30	-36	-38	+140
藻类数量 number of algae	-0.5	-1.2	-1.9	-1.7	+2.5
微生物总数 number of microorganisms	+2.3	+2.7	+5.8	+6.4	+1.8

3 小结

试验所用的诺卡氏菌和假丝酵母,它们虽然来自淡水环境,但在海水的盐度范围内其生长情况良好,因此,可适用于海淡水环境。这两菌株本身对水中有机物有较高的降解作用,同时又各具特色。诺卡氏菌主要生活在中性环境中,有一定的硝化功能,而假丝酵母能耐酸和耐高温,可大幅去除亚硝基氮。

这些均为两菌株的原生质体融合提供了基本保证。

本研究运用溶菌酶和蜗牛酶破细胞壁, PEG 和 Ca^{2+} 促融的方法完成了诺卡氏菌和假丝酵母的跨界融合, 得到具有亲本优势的融合子二株: GW01 和 GW02。通过菌落形态比较、抗生素抗性鉴定、耐热性和耐酸性比较、生长速率对比的分析, 可确定其为真正的融合细胞。

融合细胞较亲本细胞对水体和水质的适应范围更广, 降解速率更快, 能大幅度去除养殖水体环境中的 COD 、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 等, 稳定 pH 值, 提高水中 DO 及水体生态环境中微生物和浮游生物的生物多样性, 减少换水量, 从而提高水产品的养殖数量和质量。

无论是双亲细胞还是融合细胞均是活的生命体, 其对水域环境的净化功能主要是通过对养殖生态的影响而起作用的。因此, 其效果所能发挥的程度, 不仅与养殖生态的本身有关, 还与养殖管理(如投饵、换水)、微生物的使用方法和使用剂量有关。其效果并不是万能的和立竿见影的。只有正确和酌情使用, 才有良好的净水效果。

参考文献:

- [1] Liu S J, Sun Y, Chen Y H, et al. Biological control of Nitrite in fish farming ponds by photosynthetic nonsulfur bacteria[J]. Environ Sci, 1995, 16(6): 21- 23. [刘双江, 孙燕, 岑运华, 等. 采用光合细菌控制水体中亚硝酸盐的研究[J]. 环境科学, 1995, 16(6): 21- 23.]
- [2] Wu W. Study on controlling the water quality in fish pond by using the compound microbiological preparations[J]. J Zhanjiang Ocean Univ, 1997, 17(3): 16- 20. [吴伟. 应用复合微生物制剂控制养殖水体水质因子初探[J]. 湛江海洋大学学报, 1997, 17(3): 16- 20.]
- [3] Ma W Y, Yang L Y. Environmental Microbiological Engineering[M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1998. 250- 266. [马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998. 250- 266.]
- [4] Cheng S P. Environmental Biotechnology[M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1994. 73- 106. [程树培. 环境生物技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994. 73- 106.]
- [5] Cheng S P, Cui Y B, Tong Z H, et al. On the multi-functions of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Candidatropicalis* fused protoplasm[J]. Environ Pollution Control, 1995, 17(1): 9- 12. [程树培, 崔益斌, 童中华, 等. 酿酒酵母与热带假丝酵母融合子多功能性研究[J]. 环境污染与防治, 1995, 17(1): 9- 12.]
- [6] Zhong Z H, Lu P, Cheng S P, et al. Characteristics of inter-kingdom fusant from three strains in degradation of pure terephthalic acid wastewater[J]. J Nanjing Univ(Natural Sciences), 2000, 36(3): 312- 316. [钟治晖, 鲁鹏, 程树培, 等. 降解精对苯二甲酸生产废水特化菌株性能测定[J]. 南京大学学报(自然科学版), 2000, 36(3): 312- 316.]
- [7] Wen T Q, Zhao X H. Construction of thermotolerant ethanol-producing Y east by protoplast fusion[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(2): 141- 147. [文铁桥, 赵学慧. 酵母菌属间原生质体融合构建高温酵母菌株[J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 141- 147.]
- [8] Cheng S P, Cui Y B, Wang Y S. Inter-kingdom protoplast fusion and cytoplasmic integration[J]. Biomed Lett, 1995, 52: 101.
- [9] Qiu W F. Manual of Environmental Microbiotechnology[M]. Beijing: Xueyuan Press, 1990. 108- 118. [邱文芳. 环境微生物学技术手册[M]. 北京: 学苑出版社, 1990. 108- 118.]
- [10] Cheng S P. A Laboratory Manual of Environmental Biotechnology[M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1995. 31- 42. [程树培. 环境生物技术实验指南[M]. 南京: 南京大学出版社, 1995. 31- 42.]
- [11] Zhu G J, Wang Z X. Laboratory Manual of Industry Microbiology[M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1994. 460- 514. [诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 460- 514.]
- [12] EPA. Methods for the Monitoring and Analysis of Water and Wastewater. 3rd, Editic. Beijing: Chinese Environmental Science Press, 1989. 246- 360. [国家环保局. 水和废水监测分析方法(第三版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 246- 360.]