

文章编号:1000-8551(2012)05-0740-06

高压电晕电场对黄霉素产生菌诱变效应

谷卓那 日石薇 徐淑银

(内蒙古大学物理科学与技术学院,内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要:利用高压电晕电场诱变技术对黄霉素产生菌 08-28 进行微生物代谢产量和活性的研究。结果表明:链霉素对黄霉素产生菌的最低抑制浓度为 0.75U/ml;随着电场处理剂量的增大菌种致死率也随之增大,诱变电压为 21kV,针尖距离为 8mm,诱变时间为 4min 时是最佳诱变条件,此时致死率在 68%,菌落形态呈放射状褶皱。通过筛选,获得 8 株突变高产菌株,其中产黄霉素能力最高的是原始菌株的 1.92 倍。

关键词:黄霉素产生菌;电晕电场;诱变

EFFECT OF CORONA DISCHARGE ON Flavomycin PRODUCING STRAIN

GU Zhuo NA Ri SHI Wei XU Shu-yin

(School of Physical Science and Technology, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021)

Abstract: Mutagenic effect of corona discharge on the flavomycin producing strain 08-28 was carried out, and the yield and activity of flavomycin were studied. The results showed that the minimum inhibiting concentration of streptomycin for flavomycin producing strain was 0.75U/ml. The lethal rate was increased with the increasing strength of electric field treatment. The optimum condition for mutation was that the mutagenesis voltage 21kV, the tip distance 8mm, the mutagenesis time 4min. On this condition the strain lethal rate was 68% and the typical colony of the mutant was radial and drape. As a result, 8 high-yielding strains were obtained, and the highest ability to produce flavomycin was increased by 1.92 times than original strain.

Key words: flavomycin producing strain; Corona discharge; mutation

黄霉素 (flavomycin) 又名默诺霉素 (moenomycin)、黄磷酯素 (flavophospholipl)、斑伯霉素 (bambermycin), 是德国赫斯特公司在 20 世纪 70 年代初期开发的一种新型抗生素类促生长剂。黄霉素主要由 5 个微生物活性物质组成, 其中默诺霉素 A 为主要成分^[1,2], 此种抗生素通过真菌的厌氧发酵形成, 存在于菌丝体中, 可通过提取分离^[3]。对纯化后的抗生素进行理化分析表明, 黄雷素是一种含磷的糖酯, 不同于现有的任何一种抗生素^[4], 它具有用量小、促生长效果

显著、性能稳定、不与其他添加剂产生拮抗作用、不易产生耐药性、无污染、无残留、安全性高等特点。黄霉素在国外畜牧水产养殖业已得到普遍应用, 而在我国的应用刚刚起步。为提高微生物菌种生产黄霉素能力, 应用合理的筛选程序及适当的筛选办法选育优良的菌种, 开发新的诱变方法是一个有益的尝试。科技工作者已将紫外线 (UV)^[5]、微波^[6]、离子注入剂^[7,8]和化学^[9]诱变技术引进了诱变育种领域, 本研究则采用高压电晕电场作为诱变源对黄霉素产生菌进行了研

收稿日期:2011-09-28 接受日期:2012-01-10

基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(20091502), 国家大学生创新性实验计划项目(091012611)

作者简介:谷卓(1989-), 女, 内蒙古海拉尔人, 本科生, 研究方向为凝聚态物理学。E-mail: guzhuo0121@163.com

通讯作者:那日(1955-), 男, 内蒙古鄂尔多斯人, 教授, 主要从事生物物理研究。Tel:0471-4993139-6707; E-mail: nari6363@tom.com

究。

自人们发现电场生物效应后,电场对生物体的影响成为研究的热点,并且在许多领域得到应用。电子束辐照可以对食物进行保鲜^[10,11];电场处理能明显提高植物愈伤组织诱导率和分化率^[12];而利用高压电晕电场对微生物进行诱变的方法尚未见报道。本试验用本课题组研究设计的针-板高压电晕电场处理装置,对出发菌 08-28 菌种进行电场诱变处理,以期得到性能稳定、优良高产的黄霉素生产菌种,从而证实高压电晕电场装置可以对微生物进行诱变。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 出发菌种 08-28 (斑驳链霉菌 *S. bambbergiensis*) 由内蒙古中牧生物药业有限公司提供。

1.1.2 试剂 黄霉素标准品(1mg 相当于 1395 黄霉素单位)来自中国兽医药品监察所;硫酸链霉素(650 μ g/mg),购自日本 Ager;糊精、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、葡萄糖和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为天津市四通化工厂产品;甲酰胺和蛋白胨均为天津市光复精细化工研究所产品;酵母浸粉购自北京奥博星生物技术责任有限公司;抗坏血酸为天津市化学试剂三厂产品;牛肉浸膏购自天津市英博生化试剂有限公司;淀粉酶为北京双旋微生物培养基制品厂产品;Tris-Base 购自 Sigma。以上试剂均为分析纯。甲醇(色谱纯)购自天津市光复精细化工研究所;乙腈(色谱纯)购自天津市永大化学试剂有限公司;大豆粉、玉米浆、玉米淀粉为市售。

1.1.3 仪器 色谱柱选用 Agilent HC-C18 色谱柱(250 \times 4.6mm)。AKTA Purifier 10 蛋白纯化仪,通用电气中国医疗集团;JY92-II 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;数显恒温水浴锅,苏州威尔实验用品有限公司;KQ-100DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;pH 计,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;GI54DWS 型高温灭菌锅,美国独资致微厦门仪器有限公司;BS110S 型电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;高速冷冻离心机,BECKMAN COULTER;恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;低温冰箱,青岛海尔股份有限公司;生化培养箱,湖北省黄石市恒丰医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 斜面及平板分离培养基(g/100ml)^[13]:糊精 1.5g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.05g, 蔗糖

0.3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04g, 酵母浸粉 0.3g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, 大豆蛋白胨 0.5g, NaCl 0.05g, 牛肉浸膏 0.1g, 琼脂粉 1.2g。使用超纯水配制,定容至配制体积,用 1mol/L 的 NaOH 和 1mol/L 的 HCl 调节 pH 至 6.8~7.0。121 $^{\circ}C$ 灭菌 30min。37 $^{\circ}C$ 恒温培养 72~96h,单菌落直径在 3~5mm。

种子摇瓶培养基(g/100ml)^[13]:玉米浆 0.3g, K_2HPO_4 0.1g, 大豆粉 3.0g, 轻质 $CaCO_3$ 0.25g, 葡萄糖 4.0g。超纯水配制,配制时,先将玉米浆和 大豆粉加水混合,在 100 $^{\circ}C$ 下加热糊化 30min;再加入其他成分,定容至配制体积调节 pH 至 6.8~7.0, $CaCO_3$ 单独称量且分装到每个摇瓶中。121 $^{\circ}C$ 灭菌 30min。37 $^{\circ}C$ 恒温培养 170h,摇床转速 250~260r/min。

发酵摇瓶培养基(g/100ml)^[13]:玉米浆 0.9g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.00004g, 大豆粉 3.4g, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001g, 玉米淀粉 3.2g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0002g, 大豆色拉油 4.0g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0005g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3g, $CaCO_3$ 0.5g, K_2HPO_4 0.01g, 淀粉酶 0.000064g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, 消泡剂 0.02ml/100ml。121 $^{\circ}C$ 灭菌 30min。37 $^{\circ}C$ 恒温培养 24h,摇床转速 250~260r/min。

1.2.2 菌悬液制备 取平板分离培养基上生产良好的单菌落,无菌状态下接入种子摇瓶中。待培养完成后,将已灭菌的玻璃珠和碎玻璃片倒入三角瓶中,包扎好,置于摇床(250~260r/min)振荡 30min,梯度稀释平板计数,菌丝段浓度约为 8×10^7 个/ml,封口待用。

1.2.3 平板分离 取一定量出发菌液 08-28 进行梯度稀释并涂布在平板分离培养基上,37 $^{\circ}C$ 恒温培养 3~4d,以去除杂菌。

1.2.4 抗性菌株的筛选 挑选单菌落制成菌悬液并分别涂布于含有链霉素(浓度为 0~1.0u/ml)的平板培养基上 37 $^{\circ}C$ 恒温培养 3~4d。观察不同平板上的菌落生长情况,记录链霉素的最低作用浓度,即为菌株对链霉素的最小抑制浓度,此浓度下生长的菌株即为抗性菌株。

1.2.5 高压电晕电场的设计 实验装置如图 1 所示。直流高压电源(分正、负)电压从 0 到 30kV 连续可调,针尖间距 $a = 20mm$,针-板间距 $d = 25mm$,用分辨率为 10 μ A、精度为 0.8% 的 μ A 表检测放电电流, Q-3V 型电压表用来检测外加电压。放电介质为常压空气,相对湿度为 30%,温度为 20 $^{\circ}C$ ~25 $^{\circ}C$ 。

1.2.6 诱变处理 将筛选出的链霉素抗性菌株接入种子摇瓶培养基中,37 $^{\circ}C$ 、260r/min 下培养 24h。培养完成后,加适量灭菌后的玻璃珠于种子摇瓶中,摇床中

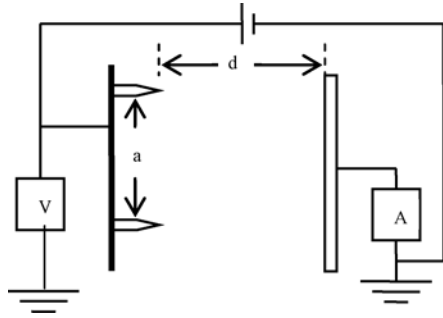


图1 高压电晕电场实验装置

Fig. 1 Equipment for corona discharge

a: 针尖间距; d: 针板间距; A: 电流表; V: 电压表

a: tip spacing; d: needle - plate spacing;

A: ammeter; V: voltmeter

振荡 30min, 在无菌工作台中向半径为 3.5cm 且已灭菌的培养皿中加入 3ml 振荡好的菌液。将菌液置于电场针尖下, 调节电压使针尖放电。取相同量的原始菌液与诱变后的菌液按梯度涂布于平板分离培养基中, 记录菌落个数。在同一梯度下计算致死率:

$$\text{致死率} = (\text{原始菌落数} - \text{诱变后菌落数}) \times 100\% / \text{原始菌落数}。$$

诱变后进行培养并测定效价。

1.2.7 效价检测

(1) 样品处理 取黄霉素标准品^[14]适量, 用 50% 的甲醇溶液, 以每 50U/ml 为 1 个间隔, 稀释至 50 ~ 800U/ml, 0.22 μ m 有机滤膜过滤, 超声脱气 10min。

取适量原始菌及诱变菌发酵液, 用 50% 甲醇溶液稀释 3 倍, 加抗坏血酸和三羟甲基氨基甲烷调节 pH 至 8.1 \pm 0.1, 用细胞粉碎机超声萃取 15min, 室温放置约 30min, 用离心机以 12000r/min 高速离心 20min, 取上清液用 0.22 μ m 有机滤膜过滤并收集样品。

(2) BufferA 的配制 制备 0.2% 的甲酸铵溶液 (10% 的磷酸调节 pH 至 4.9) - 乙腈 (体积比 55:45), 用 0.22 μ m 有机滤膜过滤, 低频超声脱气约 10min。

(3) 检测^[14] 平衡分析柱后, 设置流速为 0.5ml/min, 检测波长为 258nm。取样品适量 (大于 2 倍样品环体积) 注入至 100 μ l 的样品环中, 用蛋白纯化仪记录色谱图至黄霉素 A 组分峰保留时间的 2 倍。

2 结果与分析

2.1 高压电晕电场的特性

试验结果表明, 当针尖间距为 20mm、针 - 板间距为 25mm 时不影响放电的稳定性, 此时放电能量密度

较高^[15], 所以选择针尖间距为 20mm, 针 - 板间距 25mm, 针尖直径 $d < 0.01$ mm。

外加电压为 0 到 30kV 连续可调, 试验测得正负电晕放电伏安特性分别如图 2 和图 3 所示。从图中可以看出: 无论是正电晕还是负电晕, 针对板电晕放电的电流随外加电压升高而增加, 正电晕放电的电压范围较窄, 负电晕放电的电压范围较宽, 在相同外加电压下负电晕的放电电流大, 曲线平滑, 且负电晕放电的稳定性好。

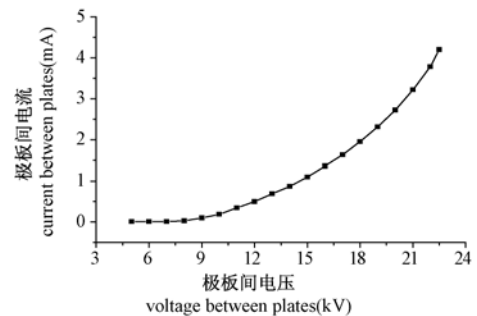


图2 负电晕放电的伏安特性

Fig. 2 Current-voltage characteristics of negative corona discharge

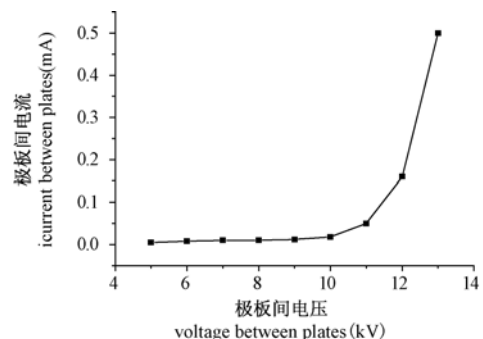


图3 正电晕放电的伏安特性

Fig. 3 Current-voltage characteristics of positive corona discharge

由于极板间存在微小电流, 会使极板间空气温度逐渐上升。为确定极板间空气的温度, 本研究使用 DALI 700B 红外热像仪进行了测量。用 22 $^{\circ}$ C 室温进行调零, 每隔 1kV 测量 1 次温度, 每次调整好电压后, 等待 1min, 以使极板间达到热平衡, 拍照并储存照片。根据软件测出图像上所选区域的中值温度, 其电压与温度的曲线如图 4 所示。电压在 20kV 之前温度随电压的增加而线性升高, 电压在 20kV 后温度基本趋于稳定, 此时温度大约比室温高 10 $^{\circ}$ C 左右。

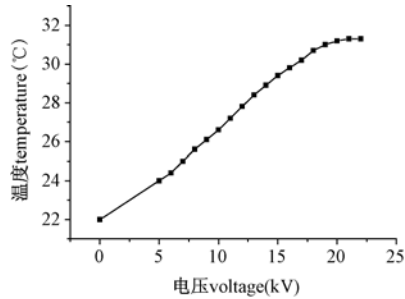


图4 极板间温度与电压的关系

Fig. 4 V - T curve of fields radiated from corona discharge

2.2 菌株对链霉素的耐受性

将出发菌种的菌液涂布在含不同浓度链霉素的平板培养基上,观察其在不同平板上的生长情况,结果如表1所示。

表1结果表明,在链霉素浓度为0~0.60U/ml的范围内,与不加链霉素的平板相比,菌株生长基本不受影响。随着浓度增加,菌株数量逐渐减少,且菌落相对较小,当链霉素浓度达到0.75U/ml时,平板上基本无菌落生长。由此表明,0.75U/ml是黄霉素产生菌08-28对链霉素的最小抑制浓度。在此浓度下生长出的菌落,具有抗性高,生产代谢能力强等特点。因此确定选用此浓度下生长的菌株进行诱变处理。

表1 出发菌株在不同浓度链霉素平板培养基上的生长情况

Table 1 The original strain growth in solid medium with different concentrations of streptomycin

链霉素浓度 streptomycin concentrations (U/ml)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
生长情况 growth	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
链霉素浓度 streptomycin concentrations (U/ml)	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00	
生长情况 growth	++++	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	

注: + 生长良好, ± 微弱生长, - 不生长。

Note: + good growth, ± weak growth, - no growth.

2.3 诱变处理的致死率及最佳诱变条件的确定

不同电场处理剂量下的致死率如图5所示。

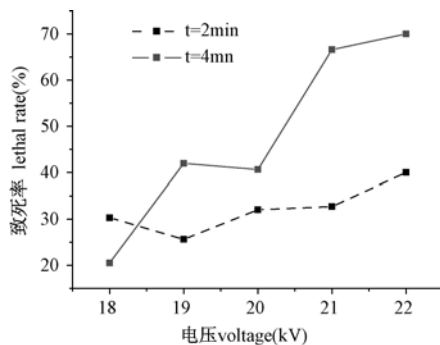


图5 诱变致死率曲线

Fig. 5 Lethal rate curve of mutagenesis

已有研究表明通过致死率曲线可以找到诱变剂量-致死率-突变率三者最佳结合点,致死率达到75%~85%时为较合适的诱变剂量^[16]。据此,本研究确定

电场处理条件为电压21kV处理4min。

2.4 黄霉素产量检测结果

2.4.1 标准品色谱图及标准曲线 将黄霉素标准品经过处理后注入到蛋白纯化仪中,得到色谱图。由于不同质量浓度的黄霉素,其色谱图峰面积大小不同,且在一定范围内,峰面积(x)随黄霉素浓度(y)的增减而增减。由此,可以得到一条直线,拟合直线方程为 $y = 0.5113x + 73.678$ 。

2.4.2 发酵筛选和高产菌株的稳定性试验 将原始菌株和诱变菌株发酵培养后,用蛋白纯化仪进行黄霉素色谱检测,效价计算结果显示,诱变菌株中正突变8株,负突变18株。部分结果如表2所示。

从表2的筛选结果可以看出,诱变菌株诱变3号的平均效价提高最多,为原始菌的1.92倍,即产黄霉素能力为原始菌的1.92倍,所以选用高产的诱变3号作为后续试验的菌种。由此也可说明黄霉素产生菌对

高压电晕电场是敏感的,而且高压电晕电场对黄霉素产生菌有较好的诱变效果。

表2 筛选结果
Table 2 The screening results

编号 number	峰面积 peak area (mAU * min)	平均效价 average titer (U/ml)	提高倍数 increase
原始菌 original bacteria	396.09	276.20	—
诱变1号 variation 1	272.58	213.05	↓
诱变2号 variation 2	502.62	330.67	1.20
诱变3号 variation 3	891.37	529.43	1.92
诱变4号 variation 4	492.62	325.56	1.18
诱变5号 variation 5	352.16	253.74	↓
诱变6号 variation 6	397.91	277.13	1.01
诱变7号 variation 7	305.50	229.88	↓
诱变8号 variation 8	320.98	237.79	↓
诱变9号 variation 9	583.16	371.85	1.35
诱变10号 variation 10	193.57	172.65	↓
诱变11号 variation 11	51.66	100.09	↓

注: ↓代表负突变。

Note: ↓ means negative mutation.

用群体传代法考察诱变3号的斜面稳定性。将其在斜面上连续培养5代,对各代菌株进行发酵培养,结果如表3所示,可见菌株诱变3号具有较好的遗传稳定性。

表3 高产突变株遗传稳定性试验

Table 3 Hereditary stability of mutant overproducing

遗传稳定性 hereditary stability	代数 generations				
	1	2	3	4	5
相对生产能力 relative ability of producing(%)	100	98	102	99	98

3 讨论

电场引起生物学效应的机理是电场使细胞两侧出现附加电荷,细胞膜带电荷脂质分子呈不对称性分布,

因此产生一个跨膜电压,跨膜电压的大小取决于膜上带电荷脂质分子的解离状态,并且受到环境中氢离子浓度的调制,由于膜内存在电场,所以膜的每一部分都可以看作是一个小电容器。外加静电场使膜两侧出现附加电荷,膜两侧电荷密度的改变引起脂质极性端基侧向移动,引起烃链倾斜弯曲,即产生相变,膜的功能得到修复。对微生物的类似研究同样证明了上述结果^[17]。

我们用电晕放电的方法对微生物诱变进行了研究,根据静电学的研究,带电导体所携带的电荷集中在导体的表面,而表面电荷的分布即面电荷密度与导体的曲率半径有关,针尖表面的面电荷密度远大于其他部位,因此它附近的电场强度很强。如果用导电的针尖作为电极,电位升高到一定程度,针尖处积累的大量电荷所产生的强电场使针尖周围的空气电离^[18,19],从而产生局部放电,出现晕光。通过对正负电晕放电的电压范围、放电电流及放电曲线平滑度等的比较及试验总结,建议诱变时采用负电晕放电。

致死率是电场导致生物细胞损伤的临界条件。陈家森^[20]用紫外透光方法、质子核磁纵向弛豫时间的测定法和鲁米诺化学发光的光子数测定法相结合,研究了电场对水结构的影响,发现电场能使水中部分水分子分解成 OH^- 和 H^+ ,其中 OH^- 中的电子在电场催化下被水中氧分子俘获后生成超氧阴离子自由基。生命体内适量的超氧阴自由基具有代谢贮能转化排废及防御消毒的作用。但由于场强和时间的累积效应,活体内会产生过量的超氧阴自由基,过量会破坏脂质、损害核酸、破坏碳水化合物及蛋白质,所以确定电场致死率是很重要的。一般试验用细胞存活率曲线模型^[21]来确定电场对细胞的平均致死剂量,以确定电场极限值。Danil Dobrynin^[22]在研究直流电晕放电对细菌灭活的影响中发现,DC电晕放电会产生活性氧、臭氧、过氧化氢等,肉眼没有观察到因电晕放电形成的臭氧而导致细菌失活的现象。而潮湿空气中的混合物(如 $\text{Ar}/\text{H}_2\text{O}$ 混合物)在电晕放电时形成羟基自由基,它可以与附近的有机物发生反应,导致链氧化,从而破坏细胞膜和其他细胞成分。带电粒子运送过氧化物簇离子 $\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_n$ 和 $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 这些自由基的效率比氧自由基和离子(包括 O_2^- , O_4^+ 和臭氧),氮和氙离子高得多,所以电晕放电所产生的 $\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_n$ 和 $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 可使细菌灭活。因此诱变时一定要选择合适的处理条件。

热在微生物诱变育种中具有热诱变效应和热筛选效应,热诱变效应通过热引起DNA中G-C碱基对的

置换实现,可以从其他诱变剂诱变的菌体中获得更高的正向突变率^[23]。试验过程中对样品温度进行了检测,发现电晕放电作用的热效应很小,说明电场处理时样品产生的生物效应并非热效应所致,是否由于电晕电流或者电场作用使微生物产生诱变还有待进一步探讨。

本研究用电晕放电的方法对微生物诱变进行了初步的研究,结果表明电晕放电对黄霉素产生菌有较好的诱变效果。试验中未将该方法与其他诱变方法的效果进行直接比较,但作为一种新的物理诱变手段,它对今后微生物优良菌种的选育具有重要的实践意义。由于各种诱变因子的作用机制不一样,新诱变方法的使用可能得到更多的突变类型,从而改善传统诱变技术的多次使用而导致的菌种退化,生长周期延长,孢子量减少,代谢缓慢等诱变剂“疲劳效应”的出现。

4 结论

利用高压电晕电场诱变,黄霉素产生菌 08-28 对电场很敏感,随着电场处理剂量的增大菌种致死率也随之增大,诱变电压为 21kV,针尖距离为 8mm,诱变时间为 4min 时是最佳诱变剂量。经过电场诱变处理、筛选及传代培养得到了诱变 3 号菌株,其产黄霉素的能力相对原始菌株最高提高了 1.92 倍。说明高压电晕电场对黄霉素产生菌有较好的诱变效果。

参考文献:

[1] 李蕴玉. 黄霉素的应用效果[J]. 中国饲料,1999,11:18-19
[2] 徐小艳. 专用抗生素饲料添加剂—黄霉素[J]. 兽药与饲料添加剂,2003,3:14-16
[3] Hitoshi Komatsuzawa, Kouji Ohta, Sakuo Yamada, et al. Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant staphylococcus aureus mutant [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2002,46:75-81
[4] Hiromi Nishi, Hitoshi Komatsuzawa, et al. Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in staphylococcus aureus [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2004,48:4800-4807
[5] 王惠,吴兆亮,胡金刚,童应凯. 紫外诱变选育黄霉素高产菌[J]. 中国饲料,2006,14:27-34

[6] 童应凯,王惠,吴兆亮,胡金刚. 黄霉素产生菌微波诱变育种的研究[J]. 华北农学报,2006,21(增刊):70-72
[7] 于广成,姚广华,付林. 氮离子注入灰黄霉素产生菌的诱变育种[J]. 中国抗生素杂志,2003,2,28(2):119-120
[8] 高艳红,吕加平,刘鹭,李淑英. N⁺离子注入法选育高产葡萄糖耐量因子(GTF)酵母菌株[J]. 核农学报,2009,23(2):235-238
[9] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 福州:福建科学技术出版社,1991:113
[10] 王秋芳,陈召亮,乔勇进,王海宏. 高能电子束辐照对巨峰葡萄保鲜效果的研究[J]. 核农学报,2010,24(2):319-324
[11] 雷庆,黄敏,康菊,伍玲,莫燕,杜晓颖,谢艳,王艳,高鹏. 电子束辐照草莓保鲜效果研究[J]. 核农学报,2011,25(3):0510-0513
[12] 那日,杨生,邢万金,杨体强. 电晕电场对细枝岩黄芪种子愈伤组织诱导与分化的影响[J]. 核农学报,2010,24(4):748-751
[13] 柳伟力. 低能离子束诱变选育黄霉素产生菌的研究[D]. 内蒙古大学,2009:23-24
[14] 杨秀玉,吴好庭,张秀英. 高效液相色谱法检查不同厂家黄霉素中黄霉素A的相对量[J]. 中国兽药杂志,2003,37(12):22-24
[15] 许潇,那日,杨军,刘俊杰. 高压电晕电场放电特性的研究[J]. 内蒙古大学学报,2009,40(5):600-605
[16] 宋安东,苏丽娟,谢慧,曲音波,杨铭. γ 射线对斜卧青霉的诱变筛选及产酶条件优化[J]. 核农学报,2008,22(3):280-285
[17] 黎先栋,王淑惠. 高压静电场对微生物和作物的影响及其在农业中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展,1986,3:34
[18] Nelson D A, Zia S, Whipple R L. Corona discharge effects on heat transfer and pressure drop in tube flows [J]. Journal of Enhanced Heat Transfer,2000,7(2):81-95
[19] 白敏,孙建,白希尧. 电晕电离层离子输运的实验研究[J]. 北京理工大学学报,2005,(25):28-31
[20] 陈家森,叶士璨,陈树德,叶永青,吕凤俊. 电场对水结构的影响[J]. 物理,1995,7:424-428
[21] 张志鸿,刘文龙. 生物物理学实验[M]. 上海:复旦大学出版社,1991:192
[22] Danil Dobrynin, Gary Friedman, Alexander Fridman, Andrey Starikovskiy. Inactivation of bacteria using dc corona discharge: role of ions and humidity[J]. New J Phys, <http://iopscience.iop.org/1367-2630/13/10/103033>, 2011
[23] 高兴强,黄运红,戴菲,付学琴,龙中儿. 热效应在微生物诱变育种中的应用[J]. 微生物学通报,2009,36(10):1592-1595

(责任编辑 王媛媛)