

凡纳滨对虾肠道益生菌的分离·筛选·鉴定

邵迎春¹, 左志晗^{1*}, 尚碧娇¹, 耿绪云², 董学旺²

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387; 2. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

摘要 [目的] 获得具有拮抗常见病原菌活性、消化酶活性且具有安全性的凡纳滨对虾肠道内源性益生菌。[方法] 从健康凡纳滨对虾肠道中经过初步分离与纯化得到 1 220 株细菌, 对分离的菌株进行拮抗试验, 并对产蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶能力进行定量和定性研究。对筛选的 13 株细菌进行了溶血试验和药敏试验, 以评价其生物安全性。[结果] 共筛选出 13 株抑菌活性强、产酶能力强且产酶种类多的菌株, 最终确定了 2 株候选益生菌。菌株的 16 S rDNA 分子鉴定及 Biolog 系统鉴定结果表明, 细菌 3 号与霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei* strain WW2, JN993998.1) 相似性达到 98%, 细菌 6 号与乳酸菌 (*Lactic acid bacterium* ZJGS0109, KC748440.1) 相似性达 100%。

[结论] 研究结果为今后益生菌制剂的开发和应用奠定了基础。

关键词 凡纳滨对虾; 益生菌; 肠道; 抑菌活性; 消化酶活性; 鉴定

中图分类号 S968.22 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)12-0094-04

Isolation, Screening and Identification of Intestinal Probiotics of *Litopenaeus vannamei*

SHAO Ying-chun, ZUO Zhi-han, SHANG Bi-jiao et al (Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract [Objective] To obtain endogenous probiotics in the intestine of *Litopenaeus vannamei* with antagonistic activity to common pathogenic bacteria, digestive enzyme activity and safety. [Method] 1 220 strains of bacteria were preliminarily separated and purified from the intestine of healthy *L. vannamei* to make an antagonistic test. The quantitative and qualitative experiments were made on the abilities of producing protease, amylase and lipase of the separated strains. The hemolysis test and drug susceptibility test were made on 13 screened strains and its biosecurity was evaluated. [Result] 13 strains with strong antibacterial activity, high enzyme-producing activity and many kinds of enzyme were screened out, and finally 2 strains of candidate probiotics were determined. The results of 16S rDNA molecular identification and Biolog system identification showed that the similarity between No. 3 strain and *Enterobacter hormaechei* strain WW2 (JN993998.1) was 98%, and the similarity between No. 6 strain and *Lactic acid bacterium* ZJGS0109 (KC748440.1) was 100%. [Conclusion] The research results laid the foundation for the development and application of probiotic preparations in future.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Probiotics; Intestinal tract; Antibacterial activity; Digestive enzyme activity; Identification

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 由于适应盐度广泛, 在我国水产养殖业中占有很大的比例。随着凡纳滨对虾养殖业的迅猛发展, 凡纳滨对虾病害日益严重, 抗生素成为传统的首选解决途径^[1]。然而, 使用过量的抗生素不仅会对对虾肠道的正常菌群结构产生破坏作用, 而且容易导致病原菌产生耐药性, 耐药菌株经过水体或对虾进入人体, 最终危害人体健康, 这些现象已引起人们的高度关注^[2]。基于细菌在生物种群中的重要作用及地位^[3], 许多学者将有活性的益生菌作为添加剂添加到饲料中, 通过维持肠道菌群平衡来提高动物免疫力, 进而起到防病抗病的效果^[4]。由于益生菌在水生生物体内既不会出现耐药性也不会产生残留, 所以益生菌替代抗生素已成为众多学者的研究热点^[5]。研究表明, 在饲料中添加益生菌不仅可以促进水生动物快速生长, 提高存活率, 而且可以通过增强水生动物的免疫力来降低疾病的发生率^[6-9]。

益生菌的作用机理是建立有机体肠道内微生物群系, 保护有机体免疫系统, 进而提高有机体免疫力, 增强有机体消化吸收能力。基于益生菌的上述作用机理, 笔者将益生菌的初步筛选主要集中在对对虾常见致病菌的拮抗能力和产消化酶特性上, 即从健康的凡纳滨对虾肠道内分离并筛选出具

有抑菌活性且能分泌消化酶活性的菌株^[10-11]。通过对筛选出的活性候选菌株进行药敏试验和溶血试验, 确定其生物安全性, 并对最终筛选出的菌株进行分类与鉴定, 以期对对虾益生菌制剂的研发及应用奠定基础, 促进对虾养殖业的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料 健康凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 由天津市兴盛水产公司提供, 试验中使用的 2216E 培养基参考 Furniss 等^[12]的方法进行配制, 芽孢杆菌分离培养基、芽孢杆菌富集培养基、脂肪培养基、脱脂牛乳琼脂培养基的制备参考试验技术手册上的制备方法^[13], 淀粉培养基的制备参考 Castro 等^[14]的方法, 九盐溶液 (NSS) 的配制参照 Olsson 等^[15]的方法, MRS、LBS、YPD、高氏一号培养基购自北京陆桥技术有限公司, Biolog Gen III 鉴定板购自华粤企业集团有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 凡纳滨对虾肠道细菌的分离。 凡纳滨对虾肠道细菌的分离参考 Kongnum 等^[16]的方法并稍做改良。试验于无菌条件下进行, 取对虾肠道置于灭菌匀浆器中, 冰浴研磨, 用九盐溶液将研磨液进行 10^{-1} 至 10^{-8} 的梯度稀释。分别取梯度 10^{-3} 至 10^{-7} 的稀释液 100 μ L 涂布于 LBS 培养基、2216E 培养基、MRS 培养基上, 每组设置 3 个平行; 分离芽孢杆菌前, 首先应将研磨液在芽孢杆菌的富集培养基中 28 $^{\circ}$ C 下培养 18 ~ 24 h, 然后置于 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min, 分别用加热后的 10^{-7} ~ 10^{-3} 的梯度稀释液 100 μ L 涂在芽孢杆菌固体分离

基金项目 国家高技术研究发展计划项目 (2012AA092205, 2012AA10A401); 国家重点基础研究项目 (2012CB114405)。

作者简介 邵迎春 (1991—), 女, 山东枣庄人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物学对虾免疫。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事水产动物病害防治研究。

收稿日期 2018-02-22

培养基上,28 ℃ 恒温培养 24~48 h;多次划线纯化。

1.2.2 抑菌活性菌株的筛选。采用滤纸片法^[17]进行抑菌活性菌株的筛选并稍做改良。使用相应的液体培养基将“1.2.1”中纯化的菌株接种,在振荡培养箱中 28 ℃ 180 r/min 培养 24 h;同时,取实验室保存的 6 种常见水产致病菌[大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)]的甘油保存菌液 100 μL 接种到 1 mL TSB 液体培养基中,37 ℃ 下 180 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 左右;取活化培养的致病菌 100 μL 均匀涂布在 TSB 固体培养基上,静置 30 min 后,用无菌镊子将灭菌的滤纸片贴在 TSB 固体培养基上;用移液器取待测菌液各 5 μL 滴加到滤纸片上,于 28 ℃ 培养箱中恒温培养 24 h;测量待测菌株产生的抑菌圈直径,将筛选出的菌株进行重复试验,确保筛选出的菌株具有稳定的拮抗特性。

1.2.3 产消化酶活性菌株的筛选。将“1.2.2”中筛选到的具有拮抗特性的各菌株活化培养为固体菌后分别点种于脱脂牛乳琼脂培养基、淀粉培养基和脂肪培养基上,于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后,根据菌落能否产生蛋白水解圈、淀粉水解圈和红斑筛选出能分泌体外消化酶的菌株。

1.2.4 菌株溶血活性的测定。参照 Orsod 等^[18]和 Santos 等^[19]的方法,以金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分别为阳性对照和阴性对照,用无菌竹签挑取测试菌株点种在含 5% 鲫鱼血的 2216E 琼脂平板上,28 ℃ 恒温培养 24~48 h,观测有无溶血环产生并记录溶血环的直径。

1.2.5 药敏试验。采用纸片琼脂扩散法^[20]进行药敏试验。每种抗生素纸片均设置 3 个重复,用 2 株已知抗生素耐药性的标准菌株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)和大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)作为阳性对照菌。培养结束后,依据透明圈直径的大小判定抗生素

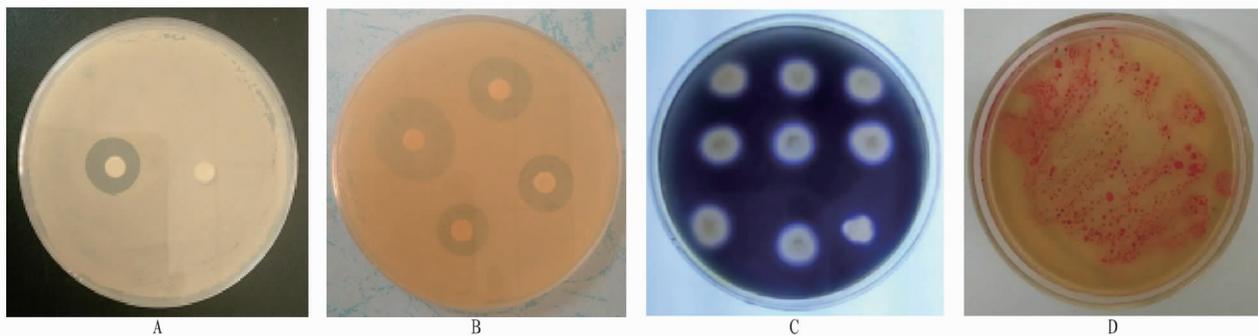
的药敏性,参照 WHO 提供的 NCCLS 标准^[13]。

1.2.6 候选益生菌的鉴定。首先对最终筛选出的候选益生菌菌株进行 16S rDNA 分子生物学鉴定。分别提取候选益生菌菌株总 DNA,采用通用引物 27F(5′ - AGAGTTTGATCTG-GCTCAG - 3′)和 1492R(5′ - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3′)扩增其 16S rDNA 片段。PCR 反应程序如下:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s,50 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保温。将扩增产物(1.5 kb 左右)交由北京金维智科技有限公司进行测序,将测序后的序列在 GenBank 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行 Blast 比对鉴定。

此外,为确保分子生物学鉴定结果的准确性和可靠性,还进行了 Biolog 系统鉴定。在相应的固体培养基上按照常规方法划线,培养出需要鉴定的纯种候选益生菌,再用灭菌的一次性棉签将分离纯化的菌株接到接种液中,配制成指定浑浊度的菌悬液。将菌悬液(每孔 100 μL)加入 Gen III 鉴定板中培养。培养后,培养板呈现不同程度的紫色,代表表型指纹,将表型指纹与 Biolog 系统中的数据进行比对,进而使所分离的微生物在生化水平上得到鉴定。

2 结果与分析

2.1 菌株的初步筛选 采用九盐溶液配制的 MRS 培养基、LBS 培养基、高氏一号培养基、YPD 培养基、2216E 培养基、芽孢杆菌分离培养基分离菌株。其中,从 MRS 培养基上分离纯化到 157 株,从 LBS 培养基上分离纯化到 140 株,从高氏一号培养基上分离纯化到 135 株,从 YPD 培养基分离纯化到 263 株,从 2216E 培养基上分离纯化到 259 株,从芽孢杆菌分离培养基上分离纯化到 266 株,共分离出 1 220 株菌株。利用常见的 6 种致病菌、脱脂牛乳琼脂培养基、淀粉培养基、脂肪培养基对这些分离纯化的菌株进行初步筛选,经筛选后得到 13 株兼具抑菌活性、分解蛋白质、淀粉和脂肪活性的候选益生菌,其分解结果产生的现象,如图 1 所示。



注:A. 拮抗斑;B. 蛋白酶阳性;C. 淀粉酶阳性;D. 脂肪酶阳性

Note: A. The antagonistic spot were seen; B. Protease detection results were positive; C. Amylase detection results were positive; D. Lipase detection results were positive

图 1 菌株的抑菌活性及消化酶活性

Fig. 1 Antimicrobial activity and digestive enzyme activity of strains

2.2 菌株的溶血性 对获得的 13 株兼具抑菌活性及产消化酶活性的菌株进行溶血活性的测定,结果发现 12 号和 13 号菌株具有溶血现象,表明其具有潜在的致病性,因此不考

虑作为候选菌株,其余菌株均不具有溶血现象。

2.3 菌株的药敏试验结果 对分离到的 13 株兼具抑菌活性及产消化酶活性的菌株进行抗生素的药敏试验,依照

WHO 提供的 NCCLS 最新版本,对被测菌株的敏感性进行判定,得到各菌株对常用抗生素的敏感性结果。由表 1 可知,1、2、4、5、7、8、9、10、11 号菌株对抗生素具有较强的抗性,不

考虑作为候选益生菌;3、6 号菌株对抗生素的敏感性强,抑菌活性及消化酶活性较高,因此初步确定为候选益生菌,用于进行后续试验。

表 1 各菌株的药敏试验结果
Table 1 The drug susceptibility results of strains

种类 Kinds	抗生素 Antibiotics	菌株编号 Strain number												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
青霉素 Penicillin	青霉素	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	I	R
	美洛西林	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
	阿洛西林	R	I	S	S	R	S	R	S	R	R	I	R	S
β -内酰胺 Inhibitoroflactam	氨苄西林	S	R	R	R	R	S	R	I	S	I	R	S	I
	杆菌肽	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
头孢类 Cefens	头孢噻肟	R	S	I	I	R	I	R	I	R	R	S	S	R
	庆大霉素	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
氨基糖苷类 Aminoglicosideos	卡那霉素	I	R	I	R	I	R	R	S	R	S	R	R	I
	链霉素	S	R	S	S	R	I	S	S	R	S	S	R	R
	阿米卡星	S	R	I	S	S	R	S	R	R	S	R	I	R
大环内酯类 Macrolideos	红霉素	R	I	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
	麦迪霉素	S	I	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	I
四环素类 Tetraciclins	四环素	R	S	S	I	R	S	I	I	R	S	I	R	S
	喹诺酮类 Fluoroquinolonas	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R
氯霉素类 Chloramphenicol	环丙沙星	S	R	S	R	R	S	I	S	R	R	S	I	R
	氯霉素	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	R	R
磺胺类 Sulfonamides	磺胺异恶唑	I	R	S	S	S	S	R	R	R	R	I	I	S
	其他 Others	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
	利福平	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	I

注:R. 耐药;I. 中度敏感;S. 敏感

Note:R. resistant; I. intermediate; S. sensitive

2.4 候选益生菌株的鉴定 比较抑菌试验、消化酶试验、溶血性试验、药敏试验结果,最终选取 3 号和 6 号菌株为候选益生菌,并对其进行 16S rDNA 分子鉴定以及 Biolog 鉴定。将测得菌 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行 Blast 序列比对,比对结果表明 3 号细菌与霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei* strain WW2, JN993998.1)相似性达到 98%,6 号细菌与乳酸菌(*Lactic acid bacterium* ZJGS0109, KC748440.1)相似性达到 100%。Biolog 系统鉴定结果与分子生物学鉴定结果相一致,说明该鉴定结果可靠。

3 讨论与结论

益生菌在畜牧业、人类、农业等方面的应用发展较迅速,但在水产业中的应用起步较晚。目前,应用较多的益生菌主要有硝化细菌、芽孢杆菌、假单胞菌、光合细菌、双歧杆菌等。农业部对何种微生物可以作为益生菌应用并没有明确规定。芽孢杆菌是水产养殖中应用最广泛的益生菌之一,其作用机理是通过抑制病原菌的生长来降低病原菌的致病性,从而提高水产动物的抗病力^[21]。益生菌产生的消化酶,能够显著提高养殖水产动物对饲料的利用率,促进水产动物的快速生长^[22]。当凡纳滨对虾受到病原菌或病毒侵害时,对虾会促使非特异性免疫系统启动,表达相关免疫物质(如超氧化物歧化酶、酚氧化酶、溶菌酶等)抵抗病原菌或病毒,但仅靠非特异性免疫系统,通常不能完全抑制病原菌或病毒,这是因为对虾没有特异性免疫。已有研究表明,当对虾受到外来病原菌或病毒侵害时,与未使用益生菌的对虾相比,使用添加益生菌的饲料饲喂对虾可以产生更多的免疫物质来保护对虾^[23]。因此,笔者从健康水生动物体内分离具有拮抗致病菌能力,产消化酶能力的菌株是筛选益生菌的有效参考

依据。

筛选益生菌以抑菌试验和消化酶试验为参考依据,还要考虑菌株的安全性,同时要顾及益生菌制剂的使用目的和作用对象^[24]。候选益生菌株是否具有较强的抗药性,能否产生溶血现象,是不可忽视的安全性问题。研究表明,被水生动物摄入到体内的抗生素,大多数会以母体化合物的形式释放到养殖水体中,致使水生生物体内和环境介质中出现抗药性菌株^[25]。据报道,从我国地表水中已检测出超过 60 种抗生素抗性基因^[26],在世界各水体、沉积物中被高频率地检测出 16 种抗生素抗性基因^[27-28]。抗生素的长期使用,造成环境中微生物产生选择性压力,诱导动物体内产生抗生素抗性基因。这种抗性基因可以通过多种方式(例如质粒交换等)进行传播,抗生素的过度使用使细菌的抗药性由单一性快速发展为多重性^[29]。因此,菌株的药敏试验是衡量其安全性的重要参考依据之一。该研究结合候选菌株的溶血试验和药敏试验结果评价了候选菌株的安全性,结果发现部分候选菌株具有很强的抗药性,抗生素在水产养殖业中的高频率使用是导致养殖动物体内菌株产生抗药性的主要原因,并将导致水环境中微生物产生抗药性以及食品安全等问题。此外,在进行溶血试验时部分菌株表现出较强的溶血活性,具有威胁人类健康的潜在致病性,因此也不考虑作为益生菌株。

笔者通过对凡纳滨对虾肠道中微生物进行分离,体外筛选具有拮抗常见病原菌能力、分解蛋白质、脂肪及淀粉能力的菌株,并通过拮抗能力、产酶能力比较和安全性评价,最终获得 2 株具有抑制多种水产病原菌活性及消化酶活性的候选益生菌。

该研究对最后筛选出的 2 株候选益生菌进行了分子生

生物学鉴定以及 Biolog 系统鉴定。16S rDNA 基因作为分子指标,运用于分子生物学鉴定中,可以对各类细菌和真菌等进行快速、微量分类与鉴定。但是,单一应用 16S rDNA 的方法对菌株进行鉴定可能无法得出准确结论,因此该研究结合 Biolog 系统鉴定法对候选益生菌进行了生理生化水平鉴定,结果发现 2 种方法鉴定结果一致,2 株候选益生菌经鉴定分别为霍氏肠杆菌和乳酸菌,说明鉴定结果准确、可靠。该研究为今后凡纳滨对虾益生菌制剂的开发和应用建立了一种有效的筛选及鉴定方法。

参考文献

- [1] KESARCODI-WATSON A, KASPAR H, LATEGAN M J, et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 1-14.
- [2] ESIÖBU N, ARMENTA L, IKE J. Antibiotic resistance in soil and water environments[J]. *International journal of environmental health research*, 2002, 12(2): 133-144.
- [3] WANG Y B, XU Z R, ZHOU X X, et al. Bacteria attached to suspended particles in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds[J]. *Aquaculture*, 2005, 249(12/3/4): 285-290.
- [4] FULLER R. Probiotics in man and animals[J]. *Journal of applied bacteriology*, 1989, 66(5): 365-378.
- [5] BALCÁZAR J L, DE BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, et al. The role of probiotics in aquaculture[J]. *Veterinary microbiology*, 2006, 114(3/4): 173-186.
- [6] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV)[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2010, 29(5): 868-874.
- [7] SOUNDARAPANDIAN P, RAMANAN V, DINAKARAN G K. Effect of probiotics on the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius)[J]. *Current research journal of social sciences*, 2010, 2(2): 51-57.
- [8] PETERSON B C, BOOTH N J, MANNING B B. Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived protein source: The effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Aquaculture nutrition*, 2012, 18(2): 132-137.
- [9] WANG Y B, GU Q. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response[J]. *Marine biology research*, 2010, 6(3): 327-332.
- [10] MACEY B M, COYNE V E. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment[J]. *Aquaculture*, 2005, 245(1/2/3/4): 249-261.
- [11] BAIRAGI A, GHOSH K S, SEN S K, et al. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings[J]. *Aquaculture research*, 2004, 35(5): 436-446.
- [12] FURNISS A L, LEE J V, DONOVAN T J. The *Vibrios*[M]//HOWELLS C H L, PATH F R C, MEERS P D, et al. Public health laboratory service: Monograph series No. 11. London: Her Majesty's Stationery Office, 1978: 4-5.
- [13] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data; proposed guideline, M39-P[M]. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- [14] CASTRO G R, FERRERO M A, MÉNDEZ B S, et al. Screening and selection of bacteria with high amylolytic activity[J]. *Acta biotechnologica*, 1993, 13(2): 197-201.
- [15] OLSSON J C, WESTERDAHL A, CONWAY P L, et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)-and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1992, 58(2): 551-556.
- [16] KONGNUM K, HONGPATTARAKERE T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2012, 32(1): 170-177.
- [17] 黎春萌, 左志略, 刘逸尘, 等. 凡纳滨对虾肠道内产消化酶益生菌的分离与筛选[J]. *水产学报*, 2016, 40(4): 537-546.
- [18] ORSOD M, JOSEPH M, HUYOP F. Characterization of exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. isolated from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*)[J]. *Malaysian journal of microbiology*, 2012, 8(3): 170-174.
- [19] SANTOS Y, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. *Infection and immunity*, 1988, 56(12): 3285-3293.
- [20] BAUER A W, KIRBY W M, SHERRIS J C, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method[J]. *American journal of clinical pathology*, 1966, 45(4): 493-496.
- [21] 雷质文, 黄捷, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒 (WSSV) 对虾相关免疫因子的研究[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 46-51.
- [22] ZOKAEIFAR H, BABAEI N, SAAD C R, et al. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2014, 36(1): 68-74.
- [23] 张玲, 谭北平, 麦康森, 等. 中国对虾体内 1 株益生菌的筛选与初步鉴定[J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(2): 225-231.
- [24] O'BRIEN J, CRITTENDEN R, OUWEHAND A C, et al. Safety evaluation of probiotics[J]. *Trends in food science & technology*, 1999, 10(12): 418-424.
- [25] 高盼盼, 罗义, 周启星, 等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因 (ARGs) 的研究及进展[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(6): 770-779.
- [26] 王丹, 隋倩, 赵文涛, 等. 中国地表水环境中药物和个人护理品的研究进展[J]. *科学通报*, 2014, 59(9): 743-751.
- [27] KÜMMERER K. Significance of antibiotics in the environment[J]. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2003, 52(1): 5-7.
- [28] TERNES T A, JOSS A, SIEGRIST H. Peer reviewed: Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment[J]. *Environmental science & technology*, 2004, 38(20): 392-399.
- [29] 王瑞旋, 冯娟, 耿玉静, 等. 水产细菌耐药性的最新研究概况[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(5): 770-776.
- [18] MULLER D, HOUPERT P, CAMBAR J, et al. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells[J]. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006, 214(2): 166-177.

(上接第 86 页)

- [16] 陈苗苗, 张桂银, 徐明岗, 等. 不同磷酸盐下红壤对镉离子的吸附-解吸特征[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(8): 1578-1584.
- [17] 谷兆萍. 复合污染下浮萍 (*Lemna minor* L.) 对重金属吸收、富集特征和机理[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2011.

科技论文写作规范——作者

论文署名一般不超过 5 个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写, 姓氏字母与名字的首字母分别大写; 外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。