

## 载锌凹凸棒石对 3 种猪常见致病菌的体外抑菌效果

孙文恺, 刘强, 刘洋, 庄苏\* (南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095)

**摘要** [目的]探究载锌凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌与金黄色葡萄球菌 3 种致病菌的体外抑菌效果。[方法]采用固相离子交换法制备载锌凹凸棒石,采用平皿二倍稀释法测定载锌凹凸棒石和热活化凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌与金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)。[结果]热活化凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均无抑菌作用,而载锌凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为 60.00、17.50 和 15.00 mg/mL,对应锌浓度分别为 1.21、0.35 和 0.30 mg/mL。[结论]载锌凹凸棒石是一种良好的抗菌剂。

**关键词** 载锌凹凸棒石;致病菌;最小抑菌浓度

**中图分类号** S859.79\*6 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2019)17-0085-04

**doi:**10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Inhibition Effect of Zinc-loaded Palygorskite on Three Species of Common Swine Pathogenic Bacteria *in vitro*

SUN Wen-kai, LIU Qiang, LIU Yang et al (College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

**Abstract** [Objective] To investigate the bacteriostatic effect of Zinc-loaded palygorskite (Zn-Pal) on *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus in vitro*. [Method] Zn-Pal was prepared by solid-state ion exchange method. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of Zn-Pal and heated palygorskite (Pal) to *E. coli*, *Salmonella* sp. and *staphylococcus aureus* were determined by plate double dilution method. [Result] Pal had no antibacterial effect, and the minimum inhibitory concentrations of Zn-Pal to *E. coli*, *S. sp.* and *S. aureus* were 60.00, 17.50 and 15.00 mg/mL respectively, corresponding zinc concentrations were 1.21, 0.35 and 0.30 mg/mL, respectively. [Conclusion] Zinc-loaded palygorskite was a good antibacterial agent.

**Key words** Zinc-loaded palygorskite; Pathogenic bacteria; Minimum inhibitory concentration (MIC)

抗生素在畜牧业中使用可以起到防治细菌性疾病、促进动物生产生长等作用,但长期使用会使动物产生细菌耐药性、免疫抑制、抗生素残留等问题,并对环境造成严重污染<sup>[1]</sup>,同时给食品带来安全问题。针对这些问题,有关国家及组织相继出台在饲料中禁用抗生素相关法规。我国农业农村部先后 2 次发布禁止在食品动物中使用硫酸黏菌素等 4 种兽药。2019 年 3 月 1 日农业农村部畜牧兽医局在关于征求《药物饲料添加剂退出计划(征求意见稿)》意见的函中指出:自 2020 年 1 月 1 日起,除中药外所有促生长药物饲料添加剂产品质量标准废止,2020 年 7 月 1 日起饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂的商品饲料。因此,寻找抗生素替代品已成为畜牧生产中的一个研究热点。抗生素替代品种类繁多,其中无机抗菌剂则是诸多抗生素替代品中的成员之一。无机抗菌剂是指具有抗菌能力的银、铜、锌等金属及其离子和化合物或上述物质与不同载体(沸石、黏土和磷酸盐等)结合而获得抗菌作用的抗菌剂<sup>[2]</sup>,具有抗菌谱广、活性持久、稳定性好与不产生抗药细菌等特点。凹凸棒石是一种以纤维状形式存在的天然水合硅酸镁铝矿物质<sup>[3]</sup>,因其具有吸附性好、化学性质稳定且持久缓释等优点而成为一种优良的抗菌剂载体<sup>[4]</sup>。锌是目前确认生理功能最多的微量元素,除具备生理功能之外,还可以通过影响细胞代谢达到抑制细菌生长的作用<sup>[5]</sup>。已有研究表明载锌蒙脱石对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有抑菌作用<sup>[6]</sup>,载铜凹

凸棒石对沙门氏菌具有抑菌作用<sup>[7]</sup>。笔者采用固相熔盐离子交换法的方法制备载锌凹凸棒石,研究其对猪致病性大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌效果,以期为载体凹凸棒石作为抗生素替代品在动物生产实践中的使用提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 菌种、材料与试剂** 试验用凹凸棒石由江苏金泰源生物科技有限公司提供;大肠杆菌由南京农业大学动物科技学院生物饲料实验室提供;金黄色葡萄球菌和沙门氏菌由南京农业大学国家肉品质量安全控制工程技术研究中心提供;LB 液体培养基、LB 固体培养基及麦康凯培养基均购于南京杰汶达生物科技有限公司。

**1.2 仪器** HZ-9211SB 型恒温振荡器(太仓市华利达实验设备有限公司);BS210S 型分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);YXQ-LS-30SII 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);PYX-DHS-40×50 隔水式恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);SW-CJ-1D 型超净工作台(上海苏净实业有限公司);UV-1200 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);TDZ4-WS 低速自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)

## 1.3 试验方法

**1.3.1 最小抑菌浓度(MIC)的测定。** MIC 的测定采用平皿二倍稀释法<sup>[8]</sup>。

**1.3.1.1 热活化凹凸棒石(Pal)和载锌凹凸棒石(Zn-Pal)的制备。** 参考颜瑞<sup>[9]</sup>的方法,将凹凸棒石置于 300 °C 马弗炉活化 3 h 后即得到热活化凹凸棒石。将热活化后的凹凸棒石与氯化锌按 4:1 的质量比混合均匀后,经处理制成载锌凹凸

**基金项目** 江苏省科技厅项目(SZ-HA2017032)。

**作者简介** 孙文恺(1994—),女,山东乳山人,硕士研究生,研究方向:动物营养与饲料科学。\*通信作者,教授,博士,博士生导师,从事动物营养与饲料科学研究。

**收稿日期** 2019-03-21

棒石,经测定其负载锌量为 20.19 mg/g。

### 1.3.1.2 菌液的制备。

(1) 大肠杆菌菌液的制备。用接种环取一环大肠杆菌菌液接种至含 LB 液体培养基试管中,置于 37 °C 恒温振荡器以 180 r/min 活化 12 h,活化后按 1:100 的比例将菌液接种置于 LB 液体培养基试管中,继续活化 3 h 至对数生长期,活化后的菌液浓度大约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL,用 LB 液体培养基稀释使菌液浓度为  $1 \times 10^5$  CFU/mL,置于 4 °C 冰箱备用。

(2) 金黄色葡萄球菌和沙门氏菌菌液的制备。将南京农业大学国家肉品质量安全控制工程技术研究中心提供的菌液浓度约  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的金葡萄球菌和沙门氏菌液用 LB 液体培养基稀释 1 000 倍后,置于 4 °C 冰箱中保存备用。

**1.3.1.3 热活化凹凸棒石和载锌凹凸棒石平皿的制备。**称取一定质量的载锌凹凸棒石置于含 100 mL 麦康凯培养基的锥形瓶中,配制质量浓度分别为 10.00、12.50、15.00、17.50、20.00、40.00、60.00、80.00 mg/mL 的培养基,对应含锌浓度分别为 0.21、0.25、0.30、0.35、0.40、0.81、1.21 和 1.62 mg/mL。同样称取一定质量的热活化凹凸棒石置于含 100 mL 麦康凯培养基的锥形瓶中,配制成质量浓度分别为 10.00、20.00、40.00 和 80.00 mg/mL 的培养基,混匀后置于高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 20 min,冷却后倒入 90 mm 的平皿中,每个浓度设 3 个重复,用于接种大肠杆菌。同样称取一定质量的载锌凹凸棒石置于含 100 mL LB 固体培养基的锥形瓶中,配制质量浓度分别为 3.12、6.25、12.50、15.00、17.50、19.00、21.50、23.00、25.00、50.00 mg/mL 的培养基,对应锌浓度分别为 0.06、0.13、0.25、0.30、0.35、0.38、0.43、0.46、0.50、1.01 mg/mL,然后称取一定质量的热活化凹凸棒石置于含 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中,配制成质量浓度分别为 3.12、6.25、12.50、25.00、50.00 mg/mL 的培养基,混匀后放于 121 °C 高压灭菌锅中灭菌 20 min,冷却后倒入直径 90 mm 的培养皿中,每个浓度设 3 个重复,用于沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的接种。

**1.3.1.4 接种与培养。**用移液器吸取 100  $\mu$ L“1.3.1.2”配制的菌液分别均匀接种到“1.3.1.3”制备的平皿中,同时以接种菌液且不含热活化凹凸棒石或载锌凹凸棒石的平皿作为阳性对照 I 或阳性对照 II,以不接种菌液且含热活化凹凸棒石或载锌凹凸棒石的平皿作为阴性对照 I 或阴性对照 II,倒置放于 37 °C 的恒温培养箱中培养 24 h,观察菌落生长状况,以无菌落生长为最小抑菌浓度。

**1.3.2 菌体生长曲线的测定。**采用比浊法测定 3 种致病菌的 OD 值,然后绘制其生长曲线。

**1.3.2.1 液体培养基的制备。**根据载锌凹凸棒石对 3 种致病菌的最小抑菌浓度,配制相应质量浓度的液体培养基,制备方法同“1.3.1.3”,以不加载锌凹凸棒石的液体培养基作为对照组,每个细菌设置 10 个培养时间点、每个时间点设 3 个重复,3 种细菌总计 60 个锥形瓶,置于 121 °C 高压灭菌锅中灭菌 20 min。

**1.3.2.2 接种及培养。**灭菌完毕的培养基冷却后与

“1.3.1.2”配制的菌液按 100:1 的比例均匀混合,置于 37 °C 恒温磁力搅拌器中,分别培养 0、1.5、3、4、6、8、10、12、14、16 h。

**1.3.2.3 OD 值的测定。**从相应培养时间点取 5 mL 菌液培养液置于灭菌的离心管中,1 000 r/min 离心 2 min,离心后取 3 mL 上清液置于比色皿中,在波长 600 nm 处测定其 OD 值,以未接种菌液的液体培养基作为空白对照。以 OD 值为纵坐标,以培养时间为横坐标,分别绘制大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的生长曲线。

## 2 结果与分析

**2.1 载锌凹凸棒石对大肠杆菌的 MIC** 由表 1 可知,培养 24 h 后阳性对照组菌落生长明显(+),阴性对照组无菌落生长(-)。热活化凹凸棒石处理组在所有质量浓度范围内均有菌落生长(+)。当载锌凹凸棒石的质量浓度  $\geq 60.00$  mg/mL 时,3 个重复组均无菌落生长(-)。结果表明,在该试验条件下,热活化凹凸棒石对大肠杆菌没有抑菌作用,载锌凹凸棒石在一定浓度下明显抑制大肠杆菌的生长,对大肠杆菌的 MIC 为 60.00 mg/mL,即锌浓度为 1.21 mg/mL。

表 1 载锌凹凸棒石对大肠杆菌的最小抑菌浓度

Table 1 MIC of Zn-Pal to *E. coli*

处理 Treatment	在培养基 中的浓度 Concentration in the medium mg/mL	锌浓度 Zn concentration mg/mL	抑菌效果 Antibacterial effect
载锌凹凸棒石 Zn-Pal	10.00	0.21	+/+/+
	12.50	0.25	+/+/+
	15.00	0.30	+/+/+
	17.50	0.35	+/+/+
	20.00	0.40	+/+/+
	40.00	0.81	+/+/+
	60.00	1.21	-/-/-
	80.00	1.62	-/-/-
热活化凹凸棒石 Pal	10.00	0.00	+/+/+
	20.00	0.00	+/+/+
	40.00	0.00	+/+/+
	80.00	0.00	+/+/+
对照组 Control group	阳性对照 I	—	+/+/+
	阳性对照 II	—	+/+/+
	阴性对照 I	—	-/-/-
	阴性对照 II	—	-/-/-

注:“+”表示重复有菌落,“-”表示重复无菌落

Note:“+” indicated that there was colonies in this repetition;“-” indicated that there was no colony in this repetition

**2.2 载锌凹凸棒石对沙门氏菌的 MIC** 由表 2 可知,培养 24 h 后,阳性对照组菌落生长呈阳性(+),阴性对照组无菌落生长(-)。所有热活化凹凸棒石组均观察到菌落生长点,表明热活化凹凸棒石不能抑制沙门氏菌的生长。当载锌凹凸棒石的质量浓度  $\geq 17.50$  mg/mL 时,试验各重复组均无菌落生长。结果表明,在该试验条件下,载锌凹凸棒石对沙门氏菌的 MIC 为 17.50 mg/mL,即锌浓度 0.35 mg/mL。

**2.3 载锌凹凸棒石对金黄色葡萄球菌的 MIC** 由表 3 可知,阳性对照组菌落生长正常(+),阴性对照组无菌落生长(-)。热活化凹凸棒石组菌落生长正常(+),表明热活化凹凸棒石对金黄色葡萄球菌没有抑制效果。载锌凹凸棒石的

质量浓度  $\geq 15.00$  mg/mL 时,金黄色葡萄球菌的生长受阻(-),载锌凹凸棒石对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 15.00 mg/mL,即锌浓度为 0.30 mg/mL。

表 2 载锌凹凸棒石对沙门氏菌的最小抑菌浓度

Table 2 MIC of Zn-Pal to *Salmonella* sp.

处理 Treatment	在培养基 中的浓度 Concentration in the medium mg/mL	锌浓度 Zn concentration mg/mL	抑菌效果 Antibacterial effect
载锌凹凸棒石 Zn-Pal	3.12	0.06	+/+/+
	6.25	0.13	+/+/+
	12.50	0.25	+/+/+
	15.00	0.30	+/+/+
	17.50	0.35	-/-/-
	19.00	0.38	-/-/-
	21.50	0.43	-/-/-
	23.00	0.46	-/-/-
	25.00	0.50	-/-/-
	50.00	1.01	-/-/-
热活化凹凸棒石 Pal	3.12	0.00	+/+/+
	6.25	0.00	+/+/+
	12.50	0.00	+/+/+
	25.00	0.00	+/+/+
	50.00	0.00	+/+/+
对照组 Control group	阳性对照 I	—	+/+/+
	阳性对照 II	—	+/+/+
	阴性对照 I	—	-/-/-
	阴性对照 II	—	-/-/-

注: +表示重复有菌落, -表示重复无菌落

Note: "+" indicated that there was colonies in this repetition; "-" indicated that there was no colony in this repetition

2.4 载锌凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌生长的影响 基于载锌凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 60.00、17.50 与 15.00 mg/mL,

进一步研究载锌凹凸棒石对 3 种致病菌生长的影响。由图 1 可知,在培养 1.5 h 后,对照组的大肠杆菌和沙门氏菌均进入快速生长期,而金黄色葡萄球菌在培养 4 h 后进入快速生长期。添加载锌凹凸棒石的各试验组 OD 值不再随培养时间的增加而变化,表明添加载锌凹凸棒石的各试验组菌体的生长均受到抑制。

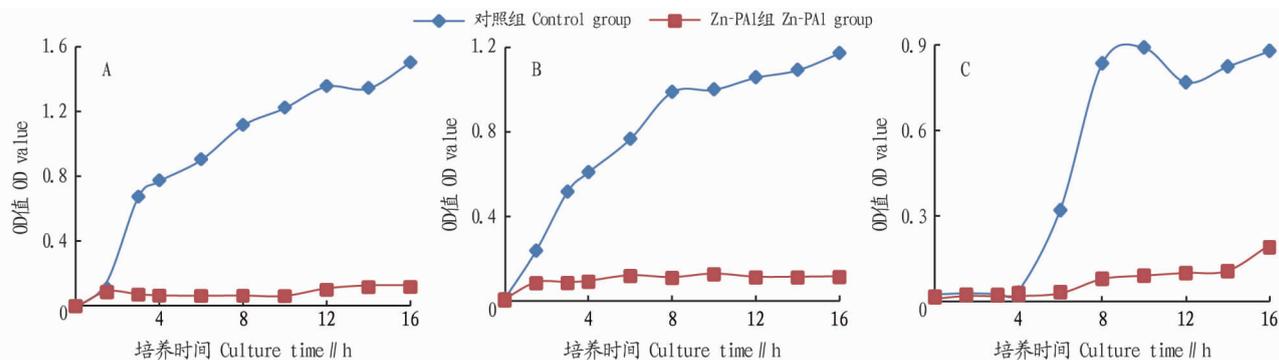
表 3 载锌凹凸棒石对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度

Table 3 MIC of Zn-Pal to *S. aureus*

处理 Treatment	在培养基 中的浓度 Concentration in the medium mg/mL	锌浓度 Zn concentration mg/mL	抑菌效果 Antibacterial effect
载锌凹凸棒石 Zn-Pal	3.12	0.06	+/+/+
	6.25	0.13	+/+/+
	12.50	0.25	+/+/+
	15.00	0.30	-/-/-
	17.50	0.35	-/-/-
	19.00	0.38	-/-/-
	21.50	0.43	-/-/-
	23.00	0.46	-/-/-
	25.00	0.50	-/-/-
	50.00	1.01	-/-/-
热活化凹凸棒石 Pal	3.12	0.00	+/+/+
	6.25	0.00	+/+/+
	12.50	0.00	+/+/+
	25.00	0.00	+/+/+
	50.00	0.00	+/+/+
对照组 Control group	阳性对照 I	—	+/+/+
	阳性对照 II	—	+/+/+
	阴性对照 I	—	-/-/-
	阴性对照 II	—	-/-/-

注: +表示重复有菌落, -表示重复无菌落

Note: "+" indicated that there was colonies in this repetition; "-" indicated that there was no colony in this repetition



注: A. 大肠杆菌; B. 沙门氏菌; C. 金黄色葡萄球菌

Note: A. *E. coli*; B. *Salmonella* sp.; C. *S. aureus*

图 1 载锌凹凸棒石对 3 种致病菌生长的影响

Fig. 1 The effects of Zn-Pal on the growth of three kinds of pathogenic bacteria

### 3 讨论与结论

无机抗菌剂通常是通过物理吸附或离子交换等方法将本身具有抗菌能力的银、铜、锌等金属或其离子固定在沸石、硅胶等多孔材料表面从而制得抗菌剂,具有广谱抗菌性、抗菌时效长、安全性高、稳定性高等优点,被广泛应用到各领域<sup>[10]</sup>。国内外研究表明,金属无机抗菌剂对大肠杆菌、沙门

氏菌和金黄色葡萄球菌等病原菌具有高效的抗菌性能<sup>[6,9,11-12]</sup>。该试验结果表明,载锌凹凸棒石对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌效果, MIC 分别为 60.00、17.50 和 15.00 mg/mL, 锌浓度分别为 1.21、0.35 和 0.30 mg/mL。颜瑞<sup>[9]</sup>研究表明,载锌凹凸棒石对大肠杆菌的 MIC 为 17.50 mg/mL(锌浓度为 0.83 mg/mL),该试验 MIC

高于颜瑞<sup>[9]</sup>的测定结果,究其原因可能与试验条件、菌株来源有关。该试验结果还表明热活化凹凸棒石对3种致病菌均无抑菌作用,与Maryan等<sup>[13]</sup>研究发现天然蒙脱石仅对细菌有吸附作用并无抑制效果或者杀菌作用相似,说明试验抑菌作用来自锌元素。该试验还发现,3种致病菌在进入快速生长对数期后存在差异,添加载锌凹凸棒石试验组菌体生长曲线不再随时间的变化而变化,证明载锌凹凸棒石能抑制菌体生长,且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑菌效果。

金属无机抗菌剂发挥抑菌作用主要是由金属离子的杀菌能力,而载体主要是对细菌有吸附作用,吸附效果取决于硅铝酸盐矿物质较大的比表面积、多孔道结构、阳离子交换能力和表面功能基团,经过热处理后的凹凸棒石可以通过移除其表面水以及部分配位水来增大比表面积,从而提高其吸附性能<sup>[14-15]</sup>。天然硅铝酸盐矿物质本身带有负电荷,对细菌的吸附能力相对较弱,但经过金属离子改性后带正电荷并改善表面的亲疏水性,通过氢键和静电作用吸附病原菌至载体表面<sup>[16-18]</sup>。该试验通过固相熔盐离子交换法制得载锌凹凸棒产品,使得带正电的锌离子可以与呈负电性的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞膜通过库仑引力牢固的吸附在一起,致使细胞壁破裂,导致细胞质外流,抑制细菌繁殖,从而导致细菌死亡起到杀菌作用<sup>[19-21]</sup>,从而增强锌的抑菌效果。该试验结果表明,热活化凹凸棒石对3种致病菌无抑菌作用,载锌凹凸棒石具有较强的抑菌作用,对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为60.00、17.50和15.00 mg/mL,对应锌浓度分别为1.21、0.35和0.30 mg/mL。

#### 参考文献

- [1] 周岩民,唐志刚.无机抗菌剂在饲料中的应用研究进展[J].饲料工业,2014,35(14):1-5.
- [2] 戎仁仁,赵斌,古宏晨,等.无机抗菌剂概述[J].化学世界,2000,41(7):339-342.
- [3] HUANG J H,LIU Y F,JIN Q Z,et al. Adsorption studies of a water soluble dye, Reactive Red MF-3B, using sonication-surfactant-modified attapulgite clay[J]. Journal of hazardous materials,2007,143(1/2):541-548.
- [4] 麻晓霞,裴阳阳,雷云,等.负载型无机抗菌材料的研究进展[J].功能

材料,2017,48(9):9038-9042.

- [5] 罗有文.载Zn<sup>2+</sup>凹凸棒石黏土对肉鸡的抗菌性和免疫功能的调节作用及相关机理研究[D].南京:南京农业大学,2007:9.
- [6] SHI Q S,TAN S Z,YANG Q H,et al. Preparation and characterization of antibacterial Zn<sup>2+</sup>-exchanged montmorillonites[J]. Journal of Wuhan University of technology,2010,25(5):725-729.
- [7] 侯羽浓.载铜凹凸棒黏土对犬源致病性沙门氏菌抑菌性能的研究[D].南京:南京农业大学,2014:61.
- [8] 丁月云,余大华,孟云,等.中草药复方对猪常见致病菌的体外抑菌试验[J].江苏农业科学,2013,41(11):236-238.
- [9] 颜瑞.固相载锌凹凸棒石黏土对肉鸡锌生物利用率及免疫调节机制的研究[D].南京:南京农业大学,2016:23-56.
- [10] 贺岚,杨武斌,陈常明.无机抗菌剂应用现状及发展趋势研究[J].湖南科技学院学报,2007,28(4):113-116.
- [11] 苗志国,李国旺,郭丽萍.载锌蒙脱石对大肠杆菌K88抗菌效果的影响[J].吉林农业科学,2007,32(4):56-58.
- [12] DEMIRCI S,USTAOĞLU Z,YILMAZER G A,et al. Antimicrobial properties of zeolite-X and zeolite-A ion-exchanged with silver,copper,and zinc against a broad range of microorganisms[J]. Applied biochemistry and biotechnology,2014,172(3):1652-1662.
- [13] MARYAN A S,MONTAZER M. Natural and organo-montmorillonite as antibacterial nanoclays for cotton garment[J]. Journal of industrial and engineering chemistry,2015,22:164-170.
- [14] CHEN H,ZHAO J,ZHONG A G,et al. Removal capacity and adsorption mechanism of heat-treated palygorskite clay for methylene blue[J]. Chemical engineering journal,2011,174(1):143-150.
- [15] 王爱勤,王文波,郑易安,等.凹凸棒石晶束解离及其纳米功能复合材料[M].北京:科学出版社,2014:62.
- [16] MA Y L,YANG B,XIE L. Adsorptive property of Cu<sup>2+</sup>-ZnO/cetylpyridinium-montmorillonite complexes for pathogenic bacterium *in vitro*[J]. Colloids and surfaces B biointerfaces,2010,79(2):390-396.
- [17] POTGIETER J H,POTGIETER-VERMAAK S S,KALIBANTONGA P D,et al. Heavy metals removal from solution by palygorskite clay[J]. Minerals engineering,2006,19(5):463-470.
- [18] 董文凯,王文波,王爱勤.凹凸棒石功能化及其吸附应用研究进展[J].高分子通报,2018(8):87-98.
- [19] BREEN P B,COMPADER C M,FIFER E K,et al. Quaternary ammonium compounds inhibit and reduce the attachment of viable *Salmonella typhimurium* to poultry tissues[J]. Journal of food science,2010,60(6):1191-1196.
- [20] GUO T,CAO S J,SU R,et al. Adsorptive property of Cu<sup>2+</sup>-loaded montmorillonite clays for *Escherichia coli* K88 *in vitro*[J]. Journal of environmental sciences,2011,23(11):1808-1815.
- [21] 王晓岚.金属离子的抗菌性能及其抗菌机理研究[D].广州:华南理工大学,2015:43-45.

(上接第84页)

- [5] 张玉芬,张秀军,张文丽,等.鲤鱼嗜水气单胞菌的分离与鉴定[J].安徽农业科学,2008,36(31):13689-13690,13709.
- [6] 王昱,袁增壮,聂福平,等.孟加拉进口黄鳝中致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定[J].安徽农业科学,2013,41(24):9997-9999,10026.
- [7] 朱健铭,姜如金,吴康乐,等.从耐药产气肠杆菌中首次发现DNA旋转酶A亚单位基因gyrA新的变异型[J].中国微生态学杂志,2013,25

(2):139-142.

- [8] 佟恒敏,刘芳萍,李昌文.耐氟喹诺酮类鸡源性沙门氏菌DNA旋转酶gyrA基因序列分析[J].东北农业大学学报,2005,36(6):767-773.
- [9] 薛慧娟,邓玉婷,姜兰,等.水产动物源嗜水气单胞菌药物敏感性及其QRDR基因突变分析[J].广东农业科学,2012(23):149-153.
- [10] 崔佳佳.淡水鱼源嗜水气单胞菌耐药机制初探[D].上海:上海海洋大学,2016.