

一株广温性大菱鲂肠道益生菌的筛选与鉴定

樊瑞锋^{1,2,5} 王印庚^{1*} 梁友¹ 高淳仁¹ 张正¹ 李彬¹ 翟介明³ 曲江波⁴

(¹青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室,中国水产科学研究院黄海水产研究所,266071)

(²上海海洋大学 水产与生命学院,201306)

(³明波水产有限公司,莱州 261400)

(⁴天源水产有限公司,烟台 264006)

(⁵青岛中仁药业有限公司,266329)

摘 要 从健康的大菱鲂肠道内分离细菌,以大菱鲂致病菌鲨鱼弧菌 *Vibrio archariae* 和大菱鲂弧菌 *Vibrio scophthalmi* 为指示菌,根据拮抗作用原则,分离得到一株菌 TYTG-1。根据菌株的形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析,菌株被鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。从养殖大菱鲂肠道中分离获得枯草芽孢杆菌在国内属首次报道。该菌株在 4~42 °C 均能生长,属广温性。经过 28d 的投喂添加浓度为 10⁷ 和 10⁹ CFU/g 枯草芽孢杆菌的饲料,大菱鲂生长正常,未产生不良反应。该株枯草芽孢杆菌对引起大菱鲂腹水病和肠炎病的两株致病弧菌具有良好的拮抗作用,其具有较大潜力作为肠道益生菌应用于大菱鲂的养殖。

关键词 大菱鲂 益生菌 16S rDNA 枯草芽孢杆菌 拮抗作用

中图分类号 Q939.96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0040-07

Screening and identification of a eurythermal probiotic bacterium in the intestine of cultured *Scophthalmus maximus*

FAN Rui-feng^{1,2} WANG Yin-geng^{1*} LIANG You¹ GAO Chun-ren¹
ZHANG Zheng¹ LI Bin¹ ZHAI Jie-ming³ QU Jiang-bo⁴

(¹Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(³Mingbo Aquaculture Co. Ltd, Laizhou 261400)

(⁴Tianyuan Aquaculture Co. Ltd, Yantai 264006)

(⁵Qingdao Zhongren Pharmaceutical Co., Ltd., 266329)

ABSTRACT One potential probiotic bacterium TYTG-1 screened from the intestine of cultured *Scophthalmus maximus* was obtained. The antagonism of bacterium TYTG-1 to turbot pathogens *Vibrio archariae* and *V. scophthalmi* was evaluated. Based on the morphological observations, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the bacterium was identified as *Bacillus subtilis*. This is the first report on *B. subtilis* being found in the intestine of cultured *S. maximus* in China. The TYTG-1 is a eurythermal bacterium that can grow at 4~42 °C. *S. maximus* could grow without any abnormal phenomenon as they were

国家科技支撑计划项目(2006BAD09A11)和公益性行业科研专项(nyhyzx07-046-渔药)共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85841732

收稿日期:2010-04-09;接受日期:2010-08-16

作者简介:樊瑞锋(1984-),女,硕士研究生,主要从事水产疾病防控研究。E-mail: fanruifeng106@163.com, Tel: (0532) 85817991

fed with the TYTG-1 bacterial cells at densities of 10^7 or 10^9 CFU/g for 4 weeks. The bacterium exhibited an excellent antagonism to the pathogens *V. archariae* and *V. scophthalmi* which could cause ascetic and enteric diseases in turbot. Therefore this probiotic bacterium is a potential candidate to be applied in turbot culture.

KEY WORDS *Scophthalmus maximus* Probiotic 16S rDNA *Bacillus subtilis*
Antagonism

大菱鲆于1992年从英国引入我国,现已形成了年产量5~6万t,年产值达40多亿的产业,成为我国北方海水养殖的重要品种。然而,随着大菱鲆养殖业的迅猛发展和集约化程度的不断提高,病害问题也日趋突出,尤其是细菌性疾病,大规模死亡现象频繁发生,严重威胁到产业的健康和可持续发展。化学试剂和抗生素的使用在一定程度上缓解了疾病情况,但长期使用破坏和干扰了养殖环境中的正常微生物区系的生态平衡,增加了养殖对象染病的机会,造成药物残留与细菌耐药性的发生和转移,并对养殖生物产生严重的毒副作用(Fuller 1989)。而且随着人民生活水平的不断提高和保健意识的增强,消费者对水产品绿色和无公害的要求越来越高。因此,益生菌的使用逐渐引入到水产养殖中来。益生菌以其高效、安全、无污染和成本低等独特的优势逐渐成为生态养殖模式的研究热点。

益生菌是在微生态环境下,调整微生态失调,保持微生态平衡,提高宿主的代谢能力、免疫功能,提高对饲料有消化吸收能力的微生物及其代谢产物的生长促进物质,从而发挥防治消化道疾病和促进生长的作用(Maeda *et al.* 2004;杨先乐等 2000)。目前,益生菌已经被广泛应用到水产养殖业中,益生菌作为抗生素的替代品日益受到重视(Gómez-Gil *et al.* 2000;邓丽等 2003)。有关研究报告,已从对虾、牙鲆等水产动物体内及水体中分离得到多株益生菌(Rengpipat *et al.* 2000;李继秋等 2006;王福强等 2004)。一些常见的益生菌制剂如芽孢杆菌、乳酸菌、光合细菌、酵母菌等已成功用于水产养殖中。大量的研究和实践证明,益生菌可以通过抑制致病菌和提高水产动物的免疫机能来增强水产动物的抗病力和免疫力,并且促进对饲料的消化吸收和生长。益生菌的使用方式大体有3种:(1)直接将益生菌投放到养殖水体中;(2)把益生菌固定于载体上形成生物膜,投放到循环水系统中;(3)把益生菌添加到饲料中,作为饲料添加剂投喂给养殖动物。益生菌大多来自养殖水体和水产动物本身的正常菌群,不会对养殖动物造成危害,因此逐渐成为水产养殖动物病害防治的一种生物控制方式(陈永青等 2002)。

在大菱鲆养殖过程中,腹水病和肠炎病(也称白便病)时有发生,并且死亡率较高,对养殖生产效益影响深重。经过本实验室前期研究证实,腹水病和肠炎病的致病菌具有多样性,常由鲨鱼弧菌 *Vibrio archariae* 和大菱鲆弧菌 *Vibrio scophthalmi* 感染而致(王印庚等 2004)。本实验从健康的养殖大菱鲆体内分离筛选得到一株可在低温生长的益生菌株 TYTG-1。以上述两种致病菌为指示菌,拮抗实验表明,TYTG-1 对鲨鱼弧菌和大菱鲆弧菌的生长有良好抑制作用,作为大菱鲆肠道益生菌具有潜在的利用价值。

1 材料与方 法

1.1 肠道细菌的分离

1.1.1 培养基

2216E:蛋白胨 5g、酵母膏 1g、磷酸高铁 0.1 g、琼脂 16 g、陈海水 1 000 ml, pH 7.5, 121 °C 灭菌 20min(杨吉霞等 2005); TSB 营养琼脂培养基: TSB(购自北京陆桥技术有限责任公司)30 g、氯化钠 15 g、蒸馏水 1 000 ml、琼脂 15g, pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 实验对象

养殖成鱼(300~600 g)10尾、亲鱼(3~5 kg)10尾。分别从山东省4个区域的养殖场取样,养殖大菱鲆健康,活力良好。

1.1.3 细菌的分离和纯化

将大菱鲆在无菌操作下解剖,取胃、中肠部位,加入 1ml 预冷的 1.5% NaCl 灭菌溶液,用玻璃匀浆器冰浴匀浆;匀浆液 10 倍梯度稀释至 10^{-5} ,取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 3 个稀释度各 0.1 ml,涂布平板,每个稀释度做两个平行,20℃ 倒置培养 5~7d;选择合适稀释度的平板(30~300CFU/平板)进行细菌的分离,根据菌落的大小、颜色、是否湿润、光滑、凸起等形态特征进行划线分离纯化 3 次。纯化后的菌株用 20% 的甘油生理盐水制成菌悬液, -80℃ 保存。

1.2 拮抗菌的筛选

以鲨鱼弧菌和大菱鲆弧菌为指示菌株,对分离得到的菌进行拮抗试验。采用点种法(Chythanya *et al.* 2000)进行初筛,然后用牛津杯法(刘冬梅等 2006)进行复筛。

点种法:取过夜培养的指示菌菌悬液涂布平板,然后将待检测菌株点种于同一平板,20℃ 培养 24 h 后观察。

牛津杯法:先倒一层薄的培养基,凝固后放上牛津杯,再倒一层培养基,待凝固后拔出牛津杯,形成孔洞。用灭菌棉签涂布指示菌悬液,然后将待检测菌的菌悬液 0.15 ml 注入孔洞中,20℃ 正置培养过夜。依据抑菌圈大小评判拮抗能力,并将筛选出的菌株重复拮抗实验,确保所筛选菌株拮抗性状稳定性。

1.3 致病性实验

实验用大菱鲆为烟台开发区天源水产有限公司的幼鱼,重量为 50 g 左右,室内暂养 5d 后进行攻毒试验。用升索牌颗粒饲料为基础饲料,粉碎后与菌株 TYTG-1 悬液、鸡蛋蛋清搅拌混合,将湿的饲料用绞肉机制成颗粒,阴凉处风干,置于 4℃ 保存。风干后经测定饲料中所含菌量分别为 10^7 和 10^9 CFU/g。

实验在圆形塑料桶中进行,水体积为 50 L,每桶 20 尾大菱鲆幼鱼,每组两个平行。空白对照组,只投喂基础饲料。水温 16~17℃,盐度 25~26,pH 在 7.8 左右。饲养期间保持长流水和充气。每天投喂两次,按照鱼体重的 1%~1.5% 投喂,或酌情投喂直至不再摄食为止。投喂 1h 后更换 2/3 体积的水。实验进行 28d,观察鱼体是否产生活动异常、病变和死亡。

1.4 菌株 TYTG-1 的生理生化试验

依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)(Holt *et al.* 1994)和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)进行常规分类,革兰氏染色、芽孢染色,用法国生物梅里埃公司的 API 32E 试剂条进行常见生理生化的实验,用 ATB 仪器进行测定,用半固体培养基穿刺接种培养和水浸片结合观察细菌运动性。

1.5 对抗生素的敏感性

将菌株 TYTG-1 用生理盐水制成菌悬液,涂布于 TSB 平板培养基,同时用无菌镊子将抗生素纸片(杭州天和微生物制品厂生产)贴于含菌平板,20℃ 培养 24~36 h,观察并测量抑菌圈大小。

1.6 温度、盐度和 pH 对菌株 TYTG-1 的影响

将菌株 TYTG-1 用 1.5% 的灭菌 NaCl 溶液制成菌悬液,用接种环点种于固体 TSB 培养基上,分别放置于 4、10、20、28、37、45℃,观察培养生长情况。

制作培养基时分别添加终盐度为 0、15、30、50、70、100 的 NaCl,将菌株 TYTG-1 用 1.5% 的灭菌 NaCl 溶液制成菌悬液,用接种环点种于各浓度的培养基上,20℃ 倒置培养 48h,观察培养生长情况。

制作培养基时分别调整各培养基的 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,将菌株 TYTG-1 用 1.5% 的灭菌 NaCl 溶液制成菌悬液,用接种环点种于各 pH 值的培养基上,20℃ 倒置培养 48 h,观察培养生长情况。

1.7 待检测菌株的 16S rDNA 序列测定和分析

1.7.1 PCR 模板的制备

过夜培养的单菌落用无菌去离子水制成菌悬液,100℃水浴10 min,4℃ 12 000 r/min离心10 min,上清液即为PCR扩增反应的模板(李继秋等 2006)。

1.7.2 16S rDNA 序列的PCR扩增和序列测定

16S rDNA扩增的引物为细菌通用引物,正向引物为27f: 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3',反向引物为1429r: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'。25 μl的PCR反应体系含有:10×缓冲液[(含Mg²⁺)2.5 μl,dNTP(10 mmol/L)]0.5 μl,引物各0.5 μl,Taq DNA聚合酶0.2 μl,DNA 1 μl。PCR反应程序为:94℃预变性4 min,30个循环,94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,最后72℃温育10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳确定特异条带后,直接交由上海生物工程技术公司进行PCR产物的纯化和序列测定。

1.7.3 序列的分析和系统发育树的构建

将得到的菌株TYTG-1的16S rDNA序列用BioEdit软件进行对比分析,确定其相似性。从GenBank中选取与其相似率最高的细菌16S rDNA序列,用BioEdit软件中集成的ClustalW软件进行多序列匹配排列,用系统发生推断软件Phylip 3.6进行统计和聚类分析。采用邻位相连法获得发育系统树,通过自举分析进行系统进化树的评估,自举数据集为1 000次。

2 结果

2.1 细菌形态特征及运动性

经过分离纯化,从养殖大菱鲆肠道中共得到98株细菌,其中与两株已知弧菌(鲨鱼弧菌和大菱鲆弧菌)有拮抗作用的有10株,而对两株已知弧菌均具有良好拮抗作用的只有菌株TYTG-1(图1、图2)。该菌株在TSB培养基上20℃培养24~30 h,菌落不规则圆形(直径4~6 mm)、表面扁平起皱、干燥、灰白色、色暗不透明。革兰氏染色阳性,杆状。芽孢偏中生(图3)。水浸片观察和穿刺接种培养均显示有运动能力。

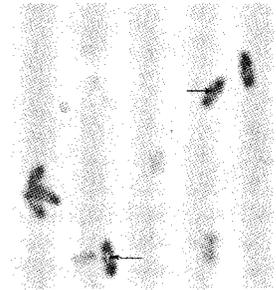
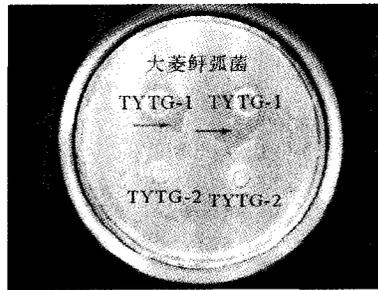
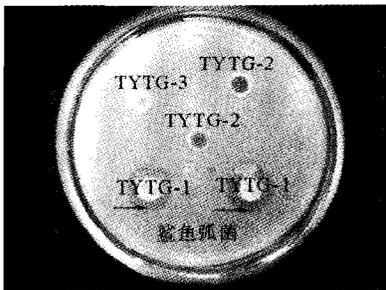


图1 菌株TYTG-1对鲨鱼弧菌的拮抗作用(箭头指示为抑菌圈)

图2 菌株TYTG-1对大菱鲆弧菌的拮抗作用(箭头指示为抑菌圈)

图3 芽孢染色(箭头指示为芽孢)
Fig. 3 Stained spore

Fig. 1 The antagonism of bacterium TYTG-1 to *V. archariae*
Fig. 2 The antagonism of bacterium TYTG-1 to *V. scophthalmi*

2.2 致病性实验

对大菱鲆投喂添加浓度为10⁷和10⁹CFU/g菌株TYTG-1的饲料,经过28d的观察得知,大菱鲆第1天摄食较少,随着对饲料的逐步适应而摄食恢复正常。与对照组相比,两个菌浓度的饲料对大菱鲆均未产生不良反应,没有产生肠道充血和白色粪便等应激反应,摄食、活动和生长正常,没有发生病变和死亡现象。

2.3 抗生素敏感性

根据纸片药物含量、受试菌株抑菌圈直径,得知菌株TYTG-1对头孢三嗪、红霉素、头孢他啶、头孢氨苄、头孢唑林、头孢拉定、罗美沙星、氟罗沙星、二甲胺四环素、强力霉素、苯唑青霉素、复方新诺明、头孢胺噻肟等抗生素敏感,对青霉素、利福平、链霉素、痢特灵、四环素、氧氟沙星、舒普深、丁胺卡那、庆大霉素、头孢唑肟、氨苄青霉素、乙酰螺旋霉

素、氟苯尼考等抗菌药物敏感性较弱,对多粘菌素 B 不敏感。

2.4 菌株的生理生化特性

形态学观察、生理生化及常规染色试验显示,该菌株革兰氏阳性、杆状、菌落不规则圆形、表面色暗、起皱、能运动、葡萄糖产酸阳性、L-阿拉伯糖产酸阳性、能在 4~42 °C 生长,初步判定为枯草芽孢杆菌(表 1)。菌株 TYTG-1 在盐度 0~10 下均能生长;在 pH5.0~9.0 能生长,pH 为 5.0 时,培养 48~72 h 后,会出现培养基琼脂液化现象,使培养基变软。该菌株在 4~42 °C 均能生长,属于广温性。

表 1 菌株 TYTG-1 的生理生化特性
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the bacterium TYTG-1

项目 Item	TYTG-1	项目 Item	TYTG-1
革兰氏染色 Gram stain	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-
菌体形状 Bacterial shape	长杆状 Long rod-shaped	脲酶 Urease	-
芽孢 Spore	偏中生 Subterminal	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
芽孢形状 Spore shape	椭圆形 Oval	L-阿拉伯糖醇 L-Arabitol	-
运动性 Motility	+	半乳糖酸盐 Galacturonate	+
0 NaCl 生长 Growth at 0 NaCl	+	5-酮基-葡萄糖酸钠 5-Ketogluconate	-
3% NaCl 生长 Growth at 3% NaCl	+	脂肪酶 Lipase	+
5% NaCl 生长 Growth at 5% NaCl	+	酚红 Phenol red	-
7% NaCl 生长 Growth at 7% NaCl	+	β -葡萄糖苷酶 β -Glucosidase	+
10% NaCl 生长 Growth at 10% NaCl	+	甘露醇 Mannitol	-
4 °C 生长 Growth at 4 °C	+	麦芽糖 D-Maltose	-
10 °C 生长 Growth at 10 °C	+	侧金盏花醇 Adonitol	-
28 °C 生长 Growth at 28 °C	+	古老糖 PLE	-
37 °C 生长 Growth at 37 °C	+	β -葡萄糖酸酶 β -Glucuronidase	-
42 °C 生长 Growth at 42 °C	+	α -半乳糖苷酶	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	海藻糖 Trehalose α -Galactosidase	-
N-乙酰- β -葡萄糖苷酶	-	鼠李糖 Rhamnose	-
N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	肌醇 Inositol	-
β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase	-	纤维二糖 D-Cellobiose	-
葡萄糖 Glucose	+	山梨醇 D-Sorbitol	-
蔗糖 Sucrose	+	α -麦芽糖苷酶 α -Maltosidase	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	L-天冬氨酸芳胺酶 L-Aspartic acid arylamidase	+
吲哚 Indole	-		

注: + 代表阳性, - 代表阴性. Note: +: Positive; -: Negative

2.5 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

通过对菌株 TYTG-1 的 16S rDNA 序列的测定,序列长度为 1 627bp,将其基因序列与 NCBI 数据库进行检索比对,从与此相似性较高的序列中选取 14 个序列进行系统发育学分析,发现它与 *Bacillus subtilis* 的碱基相似性达到 99%,在系统发育树中和 *Bacillus subtilis* HDYM-28 处于相近分支(图 4)。

3 讨论

根据细菌的形态、生理生化特征,结合 16S rDNA 序列分析,菌株 TYTG-1 被鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。该菌株从养殖的大菱鲃肠道中分离获得,在国内属首次报道。

芽孢杆菌属细菌是一类好氧或者兼性厌氧细菌,在肠道中具高度稳定性,能分泌蛋白酶、淀粉酶、维生素等,提高动物消化机能,促进营养物质的消化和吸收(吴秀红等 2007)。除了在畜禽养殖方面,芽孢杆菌作为益生菌在水产养殖中应用也十分广泛。Gatesoupe 等(1993)认为,芽孢杆菌可以释放抗生素、杆菌肽和有机酸,从而抑制病原菌生长。这与本研究菌株 TYTG-1 高效拮抗病原菌鲨鱼弧菌和大菱鲃弧菌的结果相似。经过 28d 的投喂添加浓度为 10^7 和 10^9 CFU/g 菌株 TYTG-1 的饲料,大菱鲃均未产生不良反应,没有产生肠道充血和白色粪便等应激反应,摄食、活动和生长正常,没有发生病变和死亡现象。说明短期口服使用枯草芽孢杆菌对大菱鲃肠道是安全的。鲨鱼弧菌和大菱鲃弧菌是养殖大菱鲃致病菌,经常导致大菱鲃腹水病和肠炎病。鉴于该株枯草芽孢杆菌对上述两株致病菌具有良好的拮抗作用,它将具有较大潜力作为肠道有益菌应用于大菱鲃养殖。

吴 垠等(1996)研究了益生菌剂对杂交鲤鱼越冬能力的影响。结果显示,在低温条件下,同对照组相比,益生菌剂使杂交鲤鱼的血清总蛋白、 γ -球蛋白、血糖量、血脂量、红细胞脆性、脑胆碱酯酶活性及白细胞吞噬功能等各项指标均有提高,成活率也明显高于对照组。华雪铭等(2001)研究发现,在基础饲料添加不同浓度的芽孢杆菌对异育银鲫的体重有显著的影响,极显著地提高了异育银鲫对嗜水气单孢菌的抵抗能力。在对虾疾病控制方面,Rengpipat 等(1998)研究发现,芽孢杆菌制剂能明显改善成虾体内的细菌菌群结构,使发光弧菌数目明显减少,有效控制弧菌性疾病的发生,促进机体的生长,对虾的成活率和增重率均高于对照组。另外,丁贤等(2004)报道,在饲料中添加芽孢杆菌制剂也发现,试验组对虾的蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶活性显著高于对照组,芽孢杆菌制剂可以增强机体免疫力和预防疾病,促进对虾生长发育,降低生产成本。针对枯草芽孢杆菌投入到养殖水体的作用,李卓佳等(1998)向罗非鱼养殖池中投入以芽孢杆菌为主的复合微生态制剂。结果表明,它能增加沉积物好氧菌的数量,抑制弧菌数量,将有机物分解为二氧化碳、硝酸盐、磷酸盐等无机小分子物质,为藻类的生长繁殖提供营养,并提高对虾的养殖产量。从上述研究报道来看,在养殖系统中使用枯草芽孢杆菌既可净化水质,也可对多种养殖动物促进生长和提高抗病力。

大菱鲃属冷温性鱼类,故养殖者多采用地下井海水进行养殖(雷霖霖 2001)。在我国大菱鲃实际养殖过程中常见的温度范围在 $5\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,冬、春季多在 $8\sim 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间。而分离得到的枯草芽孢杆菌在 $4\sim 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 均能生长,属于广温性生长菌。发挥该菌株低温下生长的特点,将其研制成口服型有益菌剂,对解决大菱鲃肠道疾病具有良好的应用前景。深入研究和分析显示,口服枯草芽孢杆菌能有效提高大菱鲃非特异性免疫指标,并大大提高抗感染能力(另文报道)。今后,也将深入研究该菌株在大菱鲃肠道中的作用机理、定植规律和使用规范,为指导生产提供理论依据。

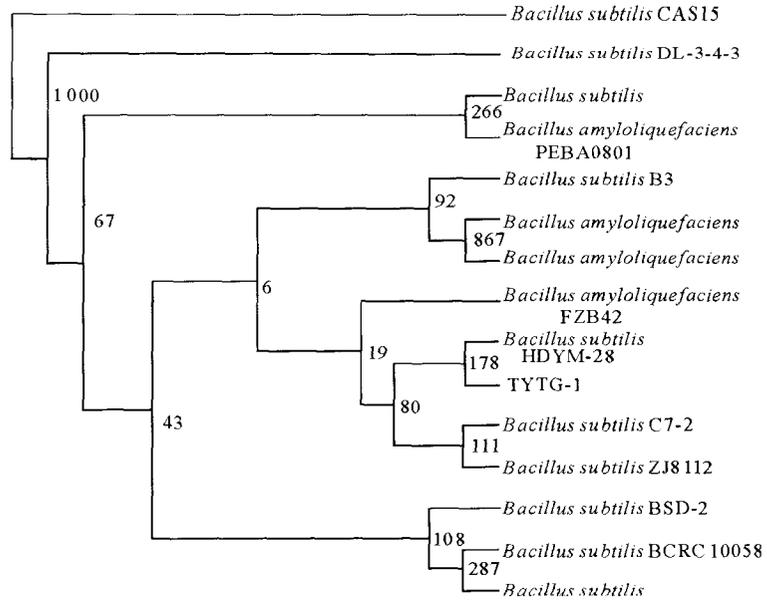


图 4 菌株 TYTG-1 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 4 The 16S rDNA gene sequence clustering results of bacterium TYTG-1

参 考 文 献

- 丁 贤,李卓佳,陈永青,李黑着,杨莺莺,杨 铿. 2004. 芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长和消化酶活性的影响. 中国水产科学, 11(6): 580~584
- 王印庚,张 正,秦 蕾,史成银,陈洁君,杨少丽,马爱军. 2004. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术. 海洋水产研究, 25(6): 63
- 王福强,陈 营,邢占涛,吴丁明. 2004. 牙鲆肠道内产蛋白酶菌的分离和筛选. 中国微生态学杂志, 16(5): 259~262
- 邓 丽,芮汉明. 2003. 益生菌的研究进展. 广州食品工业科技, 19(B11): 84
- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社
- 刘冬梅,李 理,杨晓泉,梁世中. 2006. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力. 食品研究与开发, 27(3): 110~111
- 华雪铭,周洪琪,邱小琼,刘小刚,曹 丹,张登沥. 2001. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长和抗病力的影响. 水产学报, 25(5): 448~452
- 李卓佳,张 庆,陈康德. 1998. 有益微生物改善养殖生态研究 I. 复合微生物分解有机底泥及对鱼类的促生长效应. 湛江海洋大学学报, 18(1): 5~8
- 李继秋,谭北平,麦康森,艾庆辉,徐 玮,张文兵,刘付志国,马洪明. 2006. 一株水产益生菌的鉴定. 中国海洋大学学报, 36(3): 434~438
- 吴秀红,张新中,周永灿,谢玉珍. 2007. 关于芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)应用概述. 现代渔业信息, 22(7): 16~18
- 吴 垠,马悦欣,祝国芹,桂远明,刘 妮,郭雁群,牟希亚,康 白,孔庆友,孙文平. 1996. 微生态制剂对提高杂交鲤越冬能力的研究. 中国水产科学, 3(2): 65~74
- 陈永青,林 亮,杨莺莺,李卓佳,李小涛. 2002. 微生态制剂在水产养殖中的应用. 生态科学, 24(1): 80~83
- 杨吉霞,蔡俊鹏,余德民. 2005. 近江牡蛎肠道细菌及其产酶能力的研究. 微生物学杂志, 25(5): 26~28
- 杨先乐. 2002. 微生态系统与水产动物的健康养殖. 内陆水产, 2: 23~24
- 雷霖霖,张树令. 2001. 利用深井海水工厂化养殖大菱鲆试验. 现代渔业信息, 16(3): 10~12
- Chythanya, R., and Karunasager, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* 22 strain. J. Aquaculture, 208: 1~10
- Fuller, R. 1989. A review: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365~378
- Gatesoupe, F. J. 1993. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. Kaushik, S. J., Luquet, P. Fish Nutrition in Practice. Institute National de la Recherche Agronomique, Paris, France, Les Colloques, 61: 561~568
- Gómez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. J. Aquaculture, 191(1~3): 259~270
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., et al. 1994. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th edit M. Baltimore London; Williams and Wilkins Co, 353~376
- Macda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., and Hirayama, K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. J. Hydrobio. 358: 285~290
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. J. Aquaculture, 167(3~4): 301~313
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium *Bacillus* S11. J. Aquaculture, 191(4): 271~288