

地衣芽孢杆菌 De 株对凡纳滨对虾粪便的降解效果

曹煜成¹, 李卓佳¹, 林小涛², 杨莺莺¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 采用独立分析法, 研究地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* De 株降解凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 粪便的效果。所收集对虾粪便先经冻干、粉碎, 再溶解于灭菌海水中, 分别在不同温度(16、21、26 和 31)、虾粪含量(5、10 和 20mg·L⁻¹)、芽孢杆菌初始添加量(1、2.5、5 和 10mg·L⁻¹)等条件下分析地衣芽孢杆菌 De 株对对虾粪便溶解液中的 NH₃—N、NO₂⁻—N、NO₃⁻—N、PO₄⁻—P 及 COD 的降解效果。结果表明, 地衣芽孢杆菌 De 株可有效降低样品中 COD 和 NO₃⁻—N 的含量, 其平均降解率分别高于 60%和 50%, 而 NH₃—N、NO₂⁻—N、及 PO₄³⁻—P 等的浓度则不断升高; 总体而言, 地衣芽孢杆菌 De 株在 26—31, 初始添加量 5mg·L⁻¹ 时对对虾粪便具有较好的降解效果($p < 0.05$); 当粪便溶解液浓度大于 10mg·L⁻¹ 时组间各项参数的差异不显著($p > 0.05$)。

关键词: 地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*; 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*; 粪便; 降解效果

中图分类号: S963.2; S942.3 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)04-0125-07

Degradation effects of *Bacillus licheniformis* strain De on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) dejecta

CAO Yu-cheng¹, LI Zhuo-jia¹, LIN Xiao-tao², YANG Ying-ying¹

(1. South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The degradation activity of *Bacillus licheniformis* De strain on shrimp dejecta was analyzed by an independent analytical method. The interference effects are avoidance, including biologic or environmental factors in ecosystem of aquaculture ponds. Dejecta of *Litopenaeus vannamei* was collected, dehydrofrozen, and dissolved in disinfected sea water after comminuted as powder. The degradation effects of NH₃—N, NO₂⁻—N, NO₃⁻—N, PO₄⁻—P and COD in the dejecta solution were studied at different temperature (16, 21, 26 and 31°C), dejecta (5, 10 and 20mg·L⁻¹) and *Bacillus* concentration (1, 2.5, 5 and 10mg·L⁻¹). The results show that concentrations of both COD and NO₃⁻—N decreased; their average degradation rates respectively exceeded 60% and 50%, but the concentrations of NH₃—N, NO₂⁻—N and PO₄⁻—P all continually increased. There were significant effects ($p < 0.05$) of temperature and of all parameters, with optimum conditions respectively at 26—31°C and *Bacillus* concentration of 5mg·L⁻¹. The differences of each two groups were insignificant ($p > 0.05$) as the dejecta concentration exceeded 10mg·L⁻¹.

Key words: *Bacillus licheniformis*; *Litopenaeus vannamei*; dejecta; degradation effects

在集约化对虾养殖过程中, 养殖环境的自身污染主要来源于人工饲料、有机肥料、养殖生物的排泄物和浮游生物尸体残骸等。有研究表明在平均温度为 28 时, 从体重为 0.02g 的虾苗养殖成 20g 的

成虾, 平均每个个体排泄的粪氮磷量分别为 218.3 和 190.8mg^[1]。可见, 养殖生物的排泄物对养殖自身污染的形成具有一定的贡献。有学者认为芽孢杆菌具有良好的脱氮去磷的活性^[2-3], 在对虾养殖过程

收稿日期: 2008-05-30; 修订日期: 2008-11-12。刘学东编辑

基金项目: 国家“十一五”支撑项目(2006BAD03B0106, 2006BAD09A07); 中央级科研院所基本科研专项(2007ZD01); 广东省科技计划(2007A020400001); 广东省重大科技兴渔项目(A200899A06); 公益性农业行业专项(nyhyzx07-042/200803012); 现代农业(虾)产业技术体系建设专项(nycytx46); 广东省鱼病防治专项(2130108)

作者简介: 曹煜成(1979—), 男, 浙江省东阳市人, 硕士, 研究实习员, 从事水产养殖环境修复研究。E-mail: cyc_169@163.com

通信作者: 李卓佳。E-mail: zhuojiali609@163.com

中施用芽孢杆菌可有效降低水体中 COD、氨氮、亚硝氮、活性磷酸盐的浓度^[4-5], 促进养殖水体中的生态良性循环。虽然已有不少学者对芽孢杆菌在水产应用方面进行了营养和水质改良等研究^[6-8], 但在生态体系隔绝条件下研究芽孢杆菌净化养殖环境的文献报道还相对较少。本研究借鉴了实验生态学方法, 以单因子或尽量减少生态因子对菌种的影响为基础, 针对地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* De 株降解凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 粪便的效果进行研究, 以期为摸清芽孢杆菌在净化对虾养殖环境的微观机理提供数据参考, 也为今后在水产养殖业中科学使用芽孢杆菌制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株

地衣芽孢杆菌 De 株分离自集约化对虾养殖池沉淀物, 由中国水产科学研究院南海水产研究所健康养殖中心保种。菌株形态杆状, 大小为 $(1.6-2.8) \times (0.6-0.8) \mu\text{m}$, 革兰氏染色为阳性。实验所用菌剂为干粉状, 活菌数为 $2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.1.2 分解对象

对虾粪便收集自实验室自养凡纳滨对虾, 虾体长为 $(9.18 \pm 1.32) \text{cm}$, 投喂饲料 30min 后采用虹吸方法吸取残存饲料及粪便, 每天 3 次, 粪便收集后用淡水小心洗涤, 用滤纸吸干, 再用冷冻干燥机作冻干处理, 然后碾成粉末状低温 (-20°C) 保存。待实验使用时再将其进行灭菌处理。

1.2 试验设计

1.2.1 温度对降解效果的影响

取比重为 1.016 的海水和对虾粪便粉末按 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度配制虾粪溶液, 灭菌 $(120^\circ\text{C}, 15 \text{min})$ 后测定溶液的 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 及 COD 含量。设定 16、21、26 和 31 4 个温度梯度, 为保持菌株培育的稳定性, 虾粪溶液在各温度下预先放置 5min, 待溶液温度基本达到所设置温度梯度要求时再加入 $5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芽孢杆菌, 恒温培育 96h, 期间每 24h 取样测定 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 及 COD 含量, 包括对照组各组均设 3 个平行。各温度条件下均分别设置一个不添加芽孢杆菌的对照组, 各水质指标浓度按如下公式计算: $C_x = C_m - C_k$, 式中 C_x 为各水质指标的浓度值, C_m 为各试验组中所测得各项指标的浓度值, C_k 为对照组中各项指标的浓度值。菌株培育期间采

用恒温式摇床, 以硅胶塞封口三角烧瓶进行封闭式避光培养。

1.2.2 虾粪含量对降解效果的影响

对虾粪便的初始添加量设定为 5、10 和 $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 各组添加芽孢杆菌 $5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 26 恒温培育 96h, 其余试验条件同上所述。

1.2.3 芽孢杆菌添加量对降解效果的影响

芽孢杆菌初始添加量设为 1、2.5、5 和 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个梯度, 虾粪溶液中对虾粪便粉末的浓度为 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 26 恒温培育 96h, 其余试验条件同上所述。

1.3 测定方法

样品中的 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 及 COD 的测定分别采用次溴酸盐氧化法、萘乙二胺分光光度法、镉还原法、磷钼蓝分光光度法和碱性高锰酸钾法^[9]。异养菌和芽孢杆菌的数量计数采用平板菌落计数法^[10]。

1.4 数据处理

虾粪溶液中各测定水质指标的降解率按下式计算: $R = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\%$, 式中 R 为降解率, C_0 为本底浓度, C_t 实验结束时的浓度。所得数据以单因素方差分析法进行统计, 以检验各组数据间的显著性差异, 显著性水平设置为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 温度对降解效果的影响

如图 1 所示, 样品中的 COD 和 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 含量随培育时间推移不断降低, $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 则呈现持续升高的趋势。相同温度下, 各组的 COD 和 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 含量降低显著 ($p < 0.05$), $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 则升高明显 ($p < 0.05$); 不同温度组间的 COD 浓度变化差异不显著 ($p > 0.05$), 温度对样品中 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 及 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 的浓度变化则具有明显的影响 ($p < 0.05$)。这主要是因为地衣芽孢杆菌 De 株对有机质具有较好的降解活性, 且菌体对温度的适应性较强, 故不同温度组间的 COD 浓度差异不显著 ($p > 0.05$), 但其浓度则随时间推移明显降低 ($p < 0.05$), 同时, 伴随有机质的降解, 样品中 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{—N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{—P}$ 等无机盐的含量不断升高。至于 $\text{NO}_3^- \text{—N}$ 含量为何显著降低, 这主要与菌体本身特有的反硝化作用机制有关。综合分析各项指标, 当温度为 26—31 时降解效果最佳。

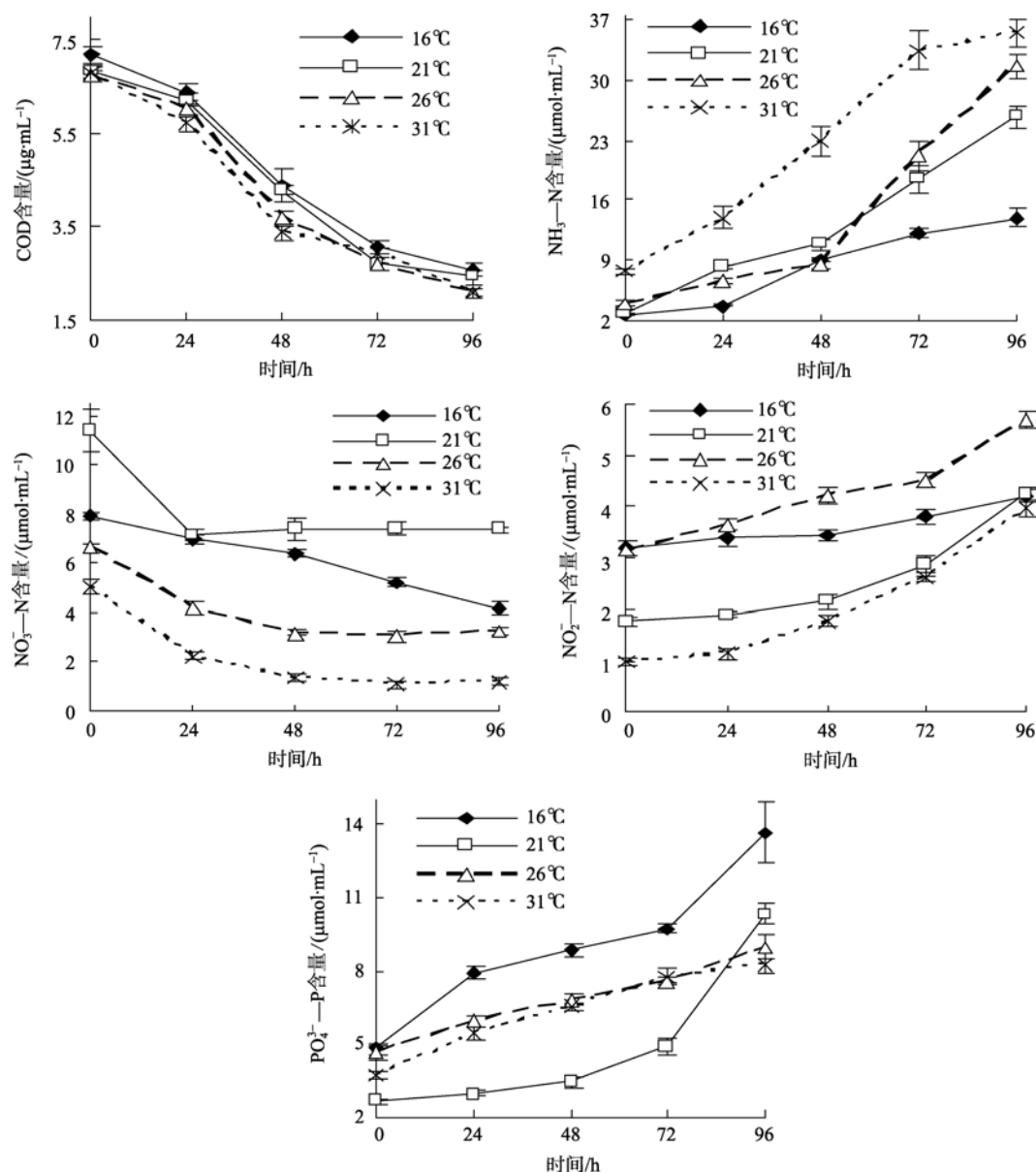


图1 不同温度条件下地衣芽孢杆菌对虾粪的降解效果

Fig. 1 Effects of temperature on shrimp dejecta degradation effectiveness of *Bacillus licheniformis*

试验期间 pH7.10—8.18。异养细菌及芽孢杆菌数量在试验初期较低, 分别为 3.3×10^4 和 $5.0 \times 10^3 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 随着时间推移细菌数量不断增加, 其中异养细菌数量升至 6.9×10^6 — $5.4 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 芽孢杆菌数量升至 1.7×10^6 — $2.0 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 虾粪含量对降解效果的影响

不论样品液中对虾排泄物的添加量是多少, 结果依然表现为 COD 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量不断降低, $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 呈现持续升高(图 2)。其中同一浓度组内 COD 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的降低, 或是 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的升高, 其变化均较显著 ($p < 0.05$); 不同的虾粪含量组中各项指标的变化趋势亦与上相同, 当虾粪含量大于 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,

各指标的变化差异不显著 ($p > 0.05$)。这主要与芽孢杆菌数量增殖差别不大有关, 试验期间样品 pH 8.17—8.27, 异养细菌及芽孢杆菌数量在初期较低, 分别为 3.3×10^4 和 $5.0 \times 10^3 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其后分别增至 1.2×10^7 — $4.1 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 5.7×10^6 — $1.6 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 组间差异不明显 ($p > 0.05$)。由于体系中有机的降解效率不仅与虾粪添加量有关, 还与细菌数量的多寡存在密切的联系, 当试验环境中虾粪添加量不再成为限制性因素时, 细菌数量就变成了影响有机质降解效果的关键性因子, 本试验体系中当虾粪含量大于 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不同浓度组中的菌量较为接近, 故其各项指标的降解效果无显著性差异 ($p > 0.05$)。

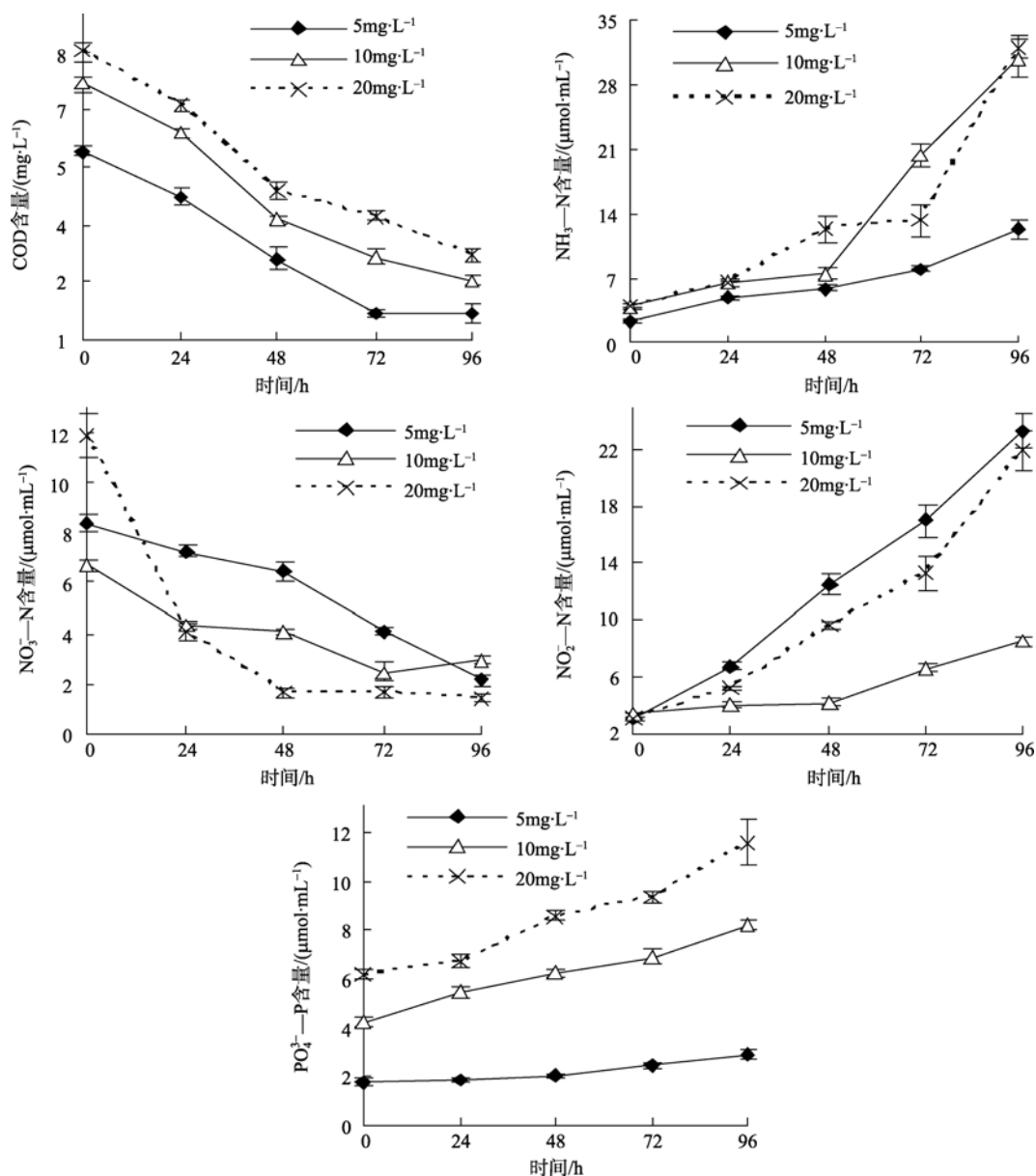


图 2 不同的虾粪含量对地衣芽孢杆菌降解虾粪的效果

Fig. 2 Effects of shrimp dejecta concentration on degradation effectiveness of *Bacillus licheniformis*

2.3 菌浓度对降解效果的影响

同一菌浓度组中 COD 和 NO₃⁻-N 均显著降低 ($p < 0.05$), NH₃-N、NO₂⁻-N、PO₄³⁻-P 则明显升高 ($p < 0.05$); 不同菌浓度组间各项参数的变化具有显著性差异 ($p < 0.05$), 但组间差异不显著 ($p > 0.05$) (图 3)。综合各项指标分析以 5mg·L⁻¹ 的菌浓度为宜。试验期间 pH 为 8.10—8.18, 异养细菌及芽孢杆菌数量在初期较低分别为 6.0×10^3 — 1.2×10^5 CFU·mL⁻¹ 和 1.0×10^3 — 1.0×10^4 CFU·mL⁻¹, 其后迅速增加, 分别增至 6.9×10^6 — 5.4×10^7 CFU·mL⁻¹ 和 1.7×10^6 — 2.0×10^7 CFU·mL⁻¹。这主要是因为地衣芽孢杆菌可分泌高活性的胞外蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶, 可有效降解有机质中的相关组分^[7,15-16], 随着培育时间

的推移, 虾粪溶液中有机质组分亦受到相应的降解, 从而也促进了异养细菌和芽孢杆菌数量的增长。但由于微生物的降解效率与其数量并非成严格的正比关系^[7,15]。所以, 在变化过程中各实验组的降解效果没有因菌浓度的升高而呈现明显的组间差异。

2.4 芽孢杆菌对对虾粪便的降解率

表 1 数据表明, 地衣芽孢杆菌 De 对降解对虾粪便中的 COD 和 NO₃⁻-N 具有显著的效果, 96h 内对 COD 的平均降解率超过 60%, NO₃⁻-N 则平均在 50%以上, 但样品中 NH₃-N、NO₂⁻-N、PO₄³⁻-P 的平均降解率均呈负值。这主要因为地衣芽孢杆菌 De 对有机质具有较好的降解活性, 使 COD 明显降

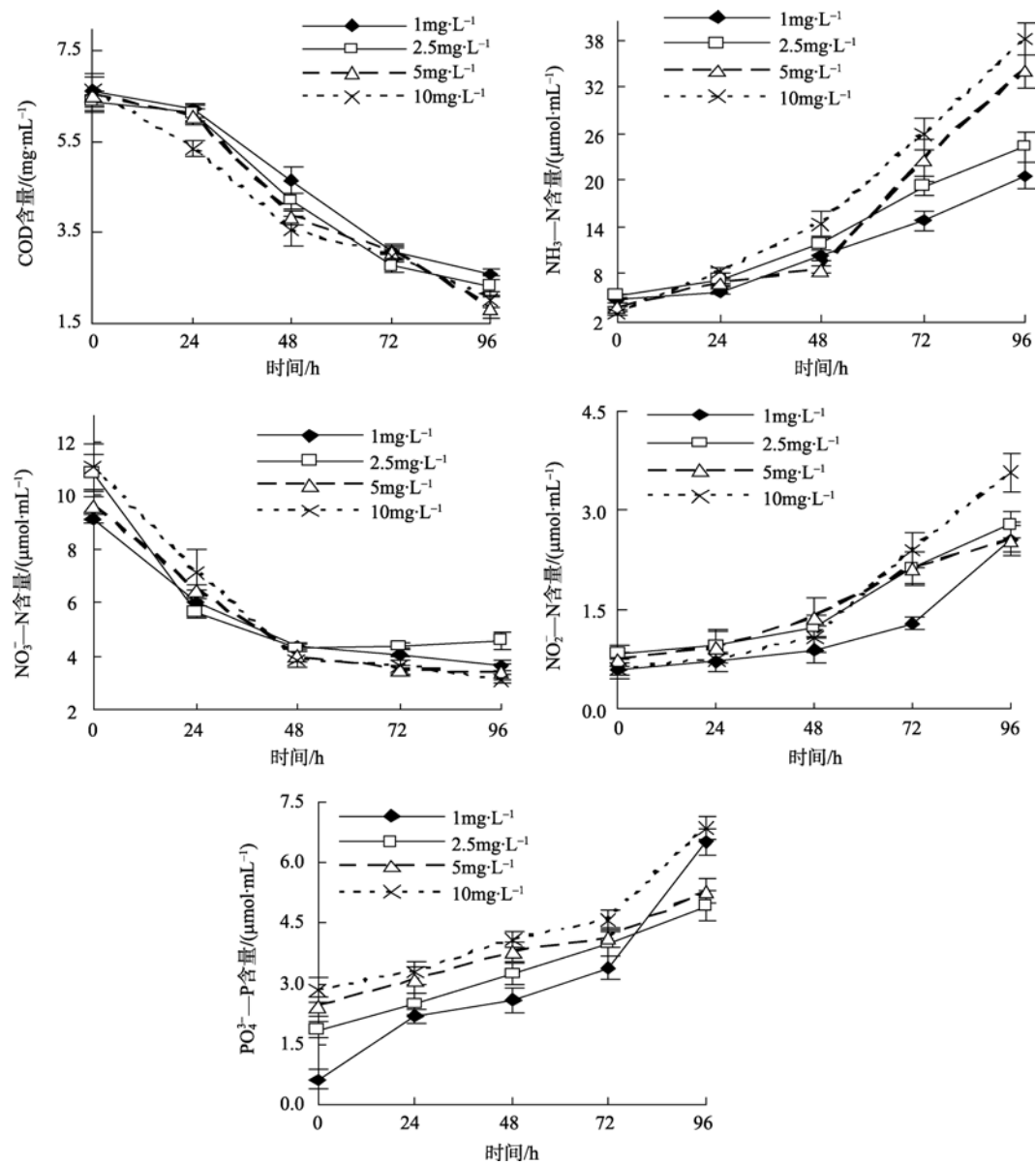


图 3 不同浓度的地衣芽孢杆菌对其降解虾粪效果的影响
Fig. 3 Effects of *Bacillus licheniformis* concentration on shrimp dejecta degradation effectiveness

表 1 地衣芽孢杆菌 De 株对对虾粪便的降解率(平均值±标准误差) %
Tab. 1 Degradation of *Bacillus licheniformis* on shrimp dejecta (Mean±SE) %

组别		COD	NH ₃ —N	NO ₃ [—] —N	NO ₂ [—] —N	PO ₄ ^{3—} —P
温度/	16	64.02±2.42	—478.95±14.60 ^a	47.21±1.83 ^a	—33.28±9.90 ^a	—206.52±31.86 ^a
	21	64.58±1.65	—878.25±102.82 ^b	35.10±5.45 ^b	—141.97±16.52 ^b	—359.34±37.63 ^b
	26	69.23±1.29 ^a	—779.65±74.60 ^c	51.34±3.89 ^c	—80.21±13.53 ^c	—106.83±28.29 ^c
	31	69.43±1.19 ^a	—382.46±36.57 ^d	76.52±4.61 ^d	—305.77±48.81 ^d	—142.21±21.59 ^c
虾粪含量/ (mg·L ^{—1})	5	77.98±4.69	—438.36±81.39	74.54±3.31 ^a	—651.43±79.15	—68.63±24.07 ^a
	10	71.74±1.97	—694.31±72.12 ^a	56.34±4.02 ^b	—677.24±10.42	—94.13±12.08 ^b
	20	66.42±3.04 ^a	—729.93±103.92 ^a	88.13±1.19 ^c	—616.86±73.83 ^a	—88.54±20.23 ^c
菌浓度/ (mg·L ^{—1})	1.0	60.98±0.42	—382.26±44.75 ^a	63.43±2.90 ^a	—330.15±20.54 ^a	—107.51±4.77 ^a
	2.5	63.68±2.41	—406.30±38.09 ^b	60.42±0.98 ^a	—241.63±52.20 ^b	—169.87±10.57 ^b
	5.0	71.71±2.85 ^a	—937.17±163.56 ^c	68.21±4.43 ^b	—242.83±49.99 ^b	—117.97±32.90 ^a
	10.0	69.44±2.40 ^a	—1364.30±58.22 ^c	74.98±3.54 ^c	—518.54±80.52 ^c	—144.15±29.71 ^c

注: 同一列中具有不同字母的存在显著性差异 (p<0.05)。

低, 伴随体系中物质的循环转化, $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 NO_2^- —N、 PO_4^{3-} —P 不断升高, 加之地衣芽孢杆菌的反硝化机制使 NO_3^- —N 亦有所降低。

3 讨论与结果

芽孢杆菌能分泌高活性的胞外酶系, 可将养殖水体中的有机污染物迅速降解, 有效促进养殖环境的生态良性循环^[7]。本研究结果表明, 地衣芽孢杆菌 De 株可有效降低对虾粪便释放出来的 NO_3^- —N、COD 的含量这与刘波等^[3]的研究结果相似, 但试验组的 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 NO_2^- —N 和 PO_4^{3-} —P 浓度不断升高, 与其他学者^[4-5]的研究结果截然不同。笔者认为其中可能有如下几个方面的原因。

其一, 与所使用的菌种及其培养条件不同有关, 不同的菌种甚至菌株其生物学特性各有不同, 虽然有学者同样采用芽孢杆菌, 但本研究中的菌株为地衣芽孢杆菌 De 株, 它分离自集约化对虾养殖池塘的沉淀物, 能较好地适应对虾养殖池塘环境^[7,15], 和其他研究中所采用菌种的来源及环境适应性有所不同, 从而使其生理生化特性存在一定的差异。据文献报道地衣芽孢杆菌一般条件下为化能异养^[10], 能分泌高活性的胞外酶^[11-14]降解周围环境中的有机质, 可有效降低养殖池塘中的 COD。同理, 地衣芽孢杆菌对虾粪便中的有机质成分亦具有显著的降解效果。

其二, 有些菌种或菌株在特定条件下可利用环境中的 $\text{NH}_3\text{—N}$ 作为惟一氮源进行生长, 达到减少环境中氨氮含量的效果^[15]。本研究表明地衣芽孢杆菌 De 株无法有效降解 $\text{NH}_3\text{—N}$, 笔者认为可能该菌株不具降解 $\text{NH}_3\text{—N}$ 的能力, 或因外界环境条件的限制抑制了其降解 $\text{NH}_3\text{—N}$ 的能力, 还有待进一步研究。有的微生物如地衣芽孢杆菌则在特定条件下可诱导产生硝酸盐还原酶 A 和亚硝酸盐还原酶, 利用环境中的硝酸盐作为呼吸链的最终受氢体,

进行硝酸盐呼吸作用(nitrate respiration)即通常所说的反硝化作用(denitrification), 该生理生化作用可使环境中的硝氮含量有所降低, 同时导致亚硝氮的积累^[15]。本研究中 NO_3^- —N 浓度具有相当程度的降低, 当菌浓度为 $10.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 其 96h 的降解率高达 $(74.98\pm 3.54)\%$, NO_2^- —N 则随时间推移浓度不断升高, 当温度为 21℃ 时其 96h 的降解率高达 $(-359.34\pm 37.63)\%$, 笔者认为这可能就与上述原因有关。

其三, 本研究主要是评价地衣芽孢杆菌 De 株对对虾排泄物的降解效果, 故在开展本试验时有意地借鉴了实验生态学方法, 以单因子或尽量减少生态因子对菌种的影响, 这与其他学者在养殖池塘进行芽孢杆菌净化养殖水体环境的研究有所不同。池塘环境中含有大量浮游生物及其他种类的微生物, 当藻类或光合细菌进行光合作用时可利用水体中的无机氮、活性磷及其他物质, 从而降低养殖环境中的氮、磷含量。由于本研究系统中没有其他生物的协同, 不能形成有效的生态系统结构和物质转化循环体系, 无法进行氮、磷的生态循环利用, 使 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 NO_2^- —N、 PO_4^{3-} —P 不断累积。加之, 地衣芽孢杆菌 De 株持续降解对虾排泄物, 释放出 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 NO_2^- —N、 PO_4^{3-} —P, 所以导致本研究中上述物质的含量不断升高。

如果环境中存在一定的有益藻类, 形成菌藻协同的生态效应, 使微生物降解产生的氮、磷及其他物质得以进入物质转化循环系统^[16-17], 利用藻类或光合细菌吸收、转化 $\text{NH}_3\text{—N}$ 、 NO_2^- —N、 PO_4^{3-} —P, 即可大大降低环境污染的累积效应。所以, 在水产养殖实际生产应用时, 使用芽孢杆菌调节水体环境, 需充分考虑其他生物因素的影响, 科学运用生态调控技术, 建立有效的生物管理调控方案, 以满足集约化对虾养殖可持续发展的技术需要^[18-19]。

参考文献

- [1] 李松青, 林小涛, 李卓佳, 等. 摄食对凡纳滨对虾耗氧率和氮、磷排泄率的影响[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 44-48.
- [2] 郝桂玉, 徐亚同, 黄民生, 等. 芽孢杆菌脱氮作用的研究[J]. 环境科学与技术, 2004, 27(1): 20-21.
- [3] 刘波, 刘文斌. 芽孢杆菌对水产养殖环境的净化作用[J]. 渔业现代化, 2004, 22: 7-8.
- [4] 熊伟, 梁运祥, 戴经元, 等. 枯草芽孢杆菌对斑节对虾饲养池水净化作用的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(3): 247-250.
- [5] 刘颖, 丁桂珍, 胡传红, 等. 枯草芽孢杆菌对养殖水体水质影响研究[J]. 淡水渔业, 2004, 34(5): 12-14.
- [6] LIN HEIZHAO, GUO ZHIXUN, YANG YINGYING, et al. Effect of dietary probiotics on digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone[J]. Aquaculture Research, 2004, 35: 1441-1447.

- [7] 曹煜成, 李卓佳, 冯娟, 等. 地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性的研究 [J]. 热带海洋学报, 2006, 24(6): 6–12.
- [8] 李卓佳, 张庆, 陈康德, 等. 应用微生物健康养殖斑节对虾的研究[J]. 中山大学学报, 2000, 39(增刊): 229–232.
- [9] 国家质量技术监督局. 海洋监测规范——海水分析 (GB17378.4—1998)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1998: 142–162.
- [10] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 730–737.
- [11] GATESOUBE F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 160: 177–203.
- [12] WELLINGTA C A N, MEIRE L L M. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2004, 35: 91–96.
- [13] ÇALIK P, BILIR E, ÇALIK G, et al. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 685–697.
- [14] MAITIN V, KAVITHA R, UMESH-KUMAR S. Properties of an extracellular amylase purified from a *Bacillus* species[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17: 823–826.
- [15] 曹煜成, 李卓佳, 吴灶和, 等. 地衣芽孢杆菌胞外蛋白酶的纯化及特性分析[J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 262–268.
- [16] 李卓佳, 曹煜成, 陈永青, 等. 地衣芽孢杆菌 De 株的胞外产物对凡纳滨对虾脂肪酶活性影响的体外试验[J]. 高技术通讯, 2006, 16(2): 191–195.
- [17] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 140–141.
- [18] 沈南南, 李纯厚, 贾晓平, 等. 3 种微生物制剂调控工厂化对虾养殖水质的研究[J]. 南方水产, 2007, 3(3): 20–25.
- [19] 刘朝阳, 孙晓庆. 生物控制法在水产养殖水质净化中的综合应用[J]. 南方水产, 2007, 3(1): 69–74.