

膜生物反应器对白斑综合症病毒的去除研究

潘忠诚^{1,2}, 赵方波¹, 何建国², 翁少萍², 温青¹

(1. 哈尔滨工程大学材料科学与化学工程学院环境工程系, 哈尔滨 150001; 2. 中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要:研究了不同孔径的膜生物反应器对游离白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的截留效果, 对不同膜生物反应器的进水、上清液、出水进行荧光定量 PCR 检测. 结果表明, 0.45 μm 孔径的膜组件对磷酸缓冲液中 WSSV 的去除量仅 0.6 lg; 0.22 μm 孔径的膜对 WSSV 病毒的去除量为 1.18 lg; 0.1 μm 孔径的膜对 WSSV 的去除量为 5.5 lg. 进一步研究表明, 在养殖废水中添加游离的 WSSV 时, 随着时间的延长, 膜组件的生物样物质对 WSSV 去除起了重要的作用; 孔径为 0.45 μm 的膜生物反应器, 对 WSSV 的去除量也达到 5.35 lg; 3 种不同孔径膜生物反应器中运行 12h 后, 对 WSSV 的去除率并没有显著差异.

关键词:膜生物反应器; 养殖废水; 定量 PCR; 白斑综合症

中图分类号: X799.3 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0650-05

Removal Efficiency of the White Spot Syndrome Virus in the Membrane Bioreactors

PAN Zhong-cheng^{1,2}, ZHAO Fang-bo¹, HE Jian-guo², WENG Shao-ping², WEN Qin¹

(1. Department of Environmental Engineering, School of Material Science and Chemical Engineering, Harbin Engineering University, Harbin 150001, China; 2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: White spot syndrome virus removal was performed in three submerged membrane bioreactors with the different membrane pore sizes. Samples were sampled from the influent, effluent and supernatant fluid in each MBR and were detected by a Taqman-based real-time PCR technology. When these MBRs with a pore of 0.45 μm , 0.22 μm , and 0.1 μm were treated the virus of WSSV isolated from the phosphorous buffer saline, the removal rate of WSSV could be achieved 0.6 lg, 1.18 lg, and 5.5 lg, respectively. The removal rate of the membrane module with a pore size of 0.45 μm was lowest than those of the other membrane modules. When the MBRs with the different pore sizes were treated the domestic aquaculture wastewater containing the WSSV, the removal efficiency of WSSV in the MBRs with a pore size of 0.22, 0.45 μm was increasing while the filtration resistance increased. It was revealed that the biofilm accumulating on the surface of the membrane made a major contribution to WSSV removal. No significant difference on the removal efficiency of WSSV was found ($p > 0.05$) in the MBRs on hour 12, the membrane with a pore size of 0.45 μm demonstrated an almost complete removal of WSSV (up to 5.35 lg).

Key words: MBRs; aquaculture wastewater; real-time PCR; WSSV

在生活污水中的病毒种类有 100 种之多^[1], 利用膜生物反应器处理模型病毒也有所报道^[2~4], 但大都集中模型病毒的研究上, 这是因为诸如 T_4 、 f_2 等噬菌体病毒能够在不同细菌中形成噬菌斑, 有利于膜生物反应器对这些病毒的截留, 而不能在细菌基因进行完整融合的病毒粒子在 MBR 中的截留情况至今鲜见报道. 有关对虾 WSSV 的危害^[5]、检测方法^[6~9]、传播情况^[5,7,10]、基因组^[11,12]及抗 WSSV 的对虾选育^[13,25,26], 国内外都有大量的报道, 但控制 WSSV 的传播大多集中在对虾养殖模式和不同的消毒方法方面, 但无论怎样改进养殖模式和消毒方法, 均不能从根本上彻底消除对虾细菌病和病毒病的蔓延. 而且利用不同的化学试剂对养殖废水或孵化场进水化学处理后, 易产生二次污染, 同时化学消毒剂对生物有相当大的毒性作用, 不利于对虾生长. 当今, 对虾养殖系统水过滤模式无论在商品对虾养殖水系统还是在种虾繁育系统大多数都采用沙滤模式. 沙滤对水中浮游动植物能够很好过滤, 同时对病

毒和细菌也有一定的过滤效果, 但就现实的情况看, 沙滤对这些细菌和病毒的过滤效果并不理想. MBR 在处理工业废水和生活污水中处理已有广泛的研究^[14~20], 利用 MBR 对养殖进行病毒去除还鲜见报道. 本实验利用不同孔径的 MBRs 对 WSSV 的截留进行比较系统的研究.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验装置

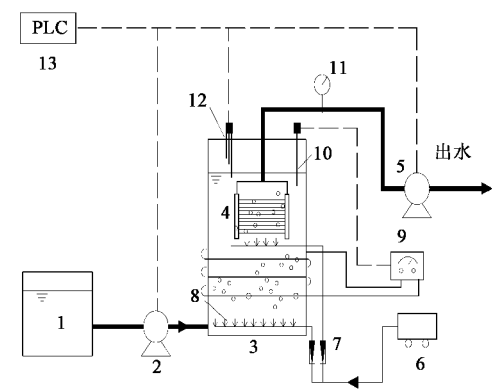
采用连续进水、恒量出水一体式膜生物反应器对 WSSV 的去除效果进行了试验研究. 原水初次试验是人工配制 WSSV 的粗提液(具体方法见实验方法 1), 二次试验是在养殖废水中添加 WSSV 的粗提

收稿日期: 2007-01-19; 修订日期: 2007-07-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2001AA601030); 哈尔滨工程大学基金项目(002100260728)

作者简介: 潘忠诚(1974~), 男, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为环境工程和水生生物学, E-mail: panzhch9221@sina.com

液,以保证进水中游离病毒在定量 PCR 中检测到 WSSV 的存在;原水通过蠕动泵进入生物反应器,出水通过抽吸泵连续出水.试验系统如图 1 所示,主要由气升式好氧反应器、膜组件、温度控制器、液位控制器等单元组成.好氧反应器容积为 20 L,曝气量为 0.04 ~ 0.1 m³/h.不同孔径的膜组件材料均为聚丙烯 (PP).3 个膜生物反应器除了试验膜组件的孔径不同外(0.1、0.22 或 0.45 μm 孔径),其余完全相同.膜生物反应器中膜组件的主要特征如表 1 所示.



1.进水水箱; 2.进水泵; 3.好氧反应器; 4.膜组件
(0.1、0.22 或 0.45 μm 孔径); 5.出水泵;
6.充气泵; 7.气体流量计; 8.气石头; 9.温度控制器;
10.温度传感器; 11.压力表; 12.水位传感器;
13.程序逻辑控制器

图 1 膜生物反应器的试验装置

Fig.1 Schematic of MBR experimental setup

表 1 膜生物反应器中膜组件的主要特征

Table 1 Major characteristics of the MBRs

膜组件	特征	膜组件	特征
形状	管状	膜孔径/μm	0.1、0.2、0.45
材料	聚丙烯	尺寸(W × H × T)/mm	160 × 100 × 12
膜面积/m ²	0.2	pH 耐受范围	1 ~ 14

1.1.2 养殖废水

养殖废水取自广东省湛江市东海岛某凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖场的污水排放口.考虑到其污水 WSSV 的浓度很难被 PCR 检测到,因此在原污水基础上添加 WSSV 的粗提液, WSSV 粗提液是用缓冲 PBS 配制的,最终具有能检测到 WSSV 的养殖废水,水质主要参数见表 2,对这些参数的测定方法采用国家环保总局规定测定海水的标准方法.

1.1.3 引物及探针序列

Taqman 探针在 5'端标记 FAM 荧光报告基因, 3'标记的 TAMRA 为荧光淬灭基因.引物和 Taqman

表 2 养殖废水及运行参数/mg•L ⁻¹		
Table 2 Characteristics of aquaculture wastewaters and test parameters of the MBR/mg•L ⁻¹		
指标	平均值	变化范围
COD	28.9	17.9 ~ 38.7
pH	8.2	8.1 ~ 8.3
TN	2.672	1.96 ~ 3.45
DTN	1.447	1.35 ~ 1.67
NH ₄ ⁺ -N	0.941	0.86 ~ 1.23
NO ₃ ⁻ -N	0.472	0.41 ~ 0.76
NO ₂ ⁻ -N	0.037	0.028 ~ 0.056
TP	0.216	0.193 ~ 0.317
DTP	0.147	0.11 ~ 0.15

由上海生工合成.
WSSV-1: 5'-CCACCAATTCTA CTCATGTACCAAA-3'.
WSSV-2: 5'-TCCTTGCAATGGGCAAAATC-3'.
Taqman 探针序列: WSSV-3: 5'-FAM-CTGGGTTACGAGTCTAA-TAMRA-3^[21].

1.1.4 PCR 反应体系

2 × Taqman 探针主要反应混合液 12.5 μL, Taqman 探针 0.3 μL(0.3 ~ 0.5 μm•L⁻¹)、上游引物 0.5 μL(0.5 μm•L⁻¹)、下游引物 0.5 μL(0.5 μm•L⁻¹)、模板 2 μL、Taq 酶 0.2 μL、超纯水 9 μL、总量 25 μL.

1.2 实验方法

1.2.1 游离 WSSV 粗提液制备

从 WSSV 的虾池中挑选出具有 WSSV 典型症状的凡纳滨对虾数尾,经 PCR 检测, WSSV 呈阳性.病虾头胸部去甲壳和肝胰腺后,在冰浴条件下剪碎.按每 g 肌肉组织加入 100 mL 磷酸 PBS(pH 7.6)缓冲液,在冰浴中电动匀浆 1 h,匀浆液 200 目筛绢网过滤,再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,其滤液为游离的 WSSV 粗提液.

1.2.2 WSSV DNA 制备

取不同病毒虾的粗提液各 300 μL,向粗提液中加入 30 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),振荡混匀后放入 55℃水浴中孵育至少 3 h,消化好的粗提液 13 000 r/min 离心 10 min,然后取上清 2μL 作 PCR 模板.

1.2.3 定量标准品制备

将待扩增的 DNA 片段转入 p UC₁₈ 质粒,构成重组质粒 p UC18-WSSV,经重组质粒增殖后提出目的 DNA,经定量计算作标准.

1.2.4 PCR 扩增条件

93℃ 2 min 预变性.60℃ 1 min 退火延伸,共 40 个循环.单点荧光检测在 60℃进行.

1.2.5 结果分析

膜生物反应器对 WSSV 去除效果,如公式(1)、(2)计算,膜对 WSSV 的去除率:

$$R_1 = \frac{c_{in}}{c_{out}} \tag{1}$$

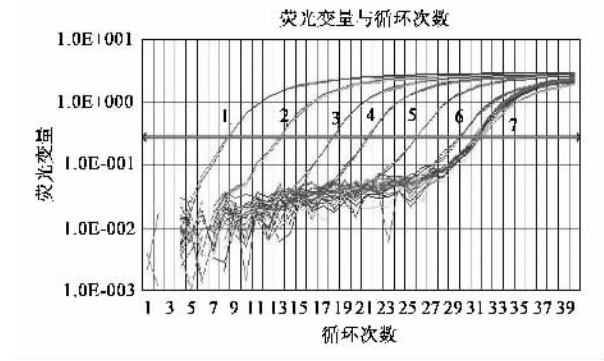
$$R_2 = \lg \frac{c_{super}}{c_{out}} \tag{2}$$

式中, R_1 、 R_2 分别为表观截留率和本征截留率; c_{in} 、 c_{out} 、 c_{super} 分别为进水、出水、上清液的 WSSV 浓度(膜生物反应器的液体经 8 000 r/min 离心 15 min 得到),单位均为 copy/mL. 定量 PCR 结果在荧光定量 PCRABI7000 进行,基线确定取 10 个左右的荧光信号,根据 c_i 值换算成每 mL 含有 WSSV 的 DNA 拷贝数.

2 结果与讨论

2.1 WSSV 标准样品的灵敏度及测试范围

用各标准样品作定量 PCR,结果发现在 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 的标准样品能够在荧光定量 PCR 检测到,低于 10^3 以下不能检测出样品中是否有 WSSV,标准样品的扩增曲线如图 2 所示,标准曲线及其斜率、截距和相关系数的具体结果见图 3.



1~7 依次为 1.7×10^9 、 1.7×10^8 、 1.7×10^7 、 1.7×10^6 、 1.7×10^5 、 1.7×10^4 、 1.7×10^3

图2 标准样品 1~7 WSSV 的扩增曲线

Fig.2 Standard curve of the WSSV copy number made up of 1~7 standard samples

2.2 膜对单一组分中的 WSSV 截留

首先在单一组分环境中进行膜对 WSSV 截留实验,膜分离的对象是投加一定量 WSSV 的 PBS(pH 7.6)缓冲液,测定膜分离前后的病毒浓度,计算不同孔径的膜对 WSSV 截留性能.结果表明,采用 $0.22 \mu\text{m}$ 的 PP 膜截留量达 1.18 lg,采用 $0.1 \mu\text{m}$ 的 PP 膜对 WSSV 病毒的截留量高达 5.5 lg. $0.45 \mu\text{m}$ 的 PP 膜

对 WSSV 截留量为 0.6 lg.微滤是基于筛分原理即膜孔径的大小对不同大小的物质进行分离的膜过程.因此,膜孔径和被分离颗粒物质的粒径是影响膜截留的主要因素,膜对颗粒物质的截留效果通常用 $R=[\lambda(2-\lambda)]^2$ 进行估算^[22],其中 λ 为分离颗粒物质直径与膜孔直径之比.因此理论估算 $0.45 \mu\text{m}$ 的膜对 WSSV 去除率仅为 6%, $0.22 \mu\text{m}$ 的膜对 WSSV 截留率为 25%,而 $0.1 \mu\text{m}$ 对 WSSV 的截留率为 68%.膜孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的 PP 膜对 WSSV 截留率实际测定为 87%,膜孔径为 $0.1 \mu\text{m}$ 的 PP 膜实际测定对 WSSV 去除率为 97.5%;膜孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的 PP 膜实际测定对 WSSV 去除率为 31.5%.因此可以看出膜本身对病毒截留也具有重要作用.

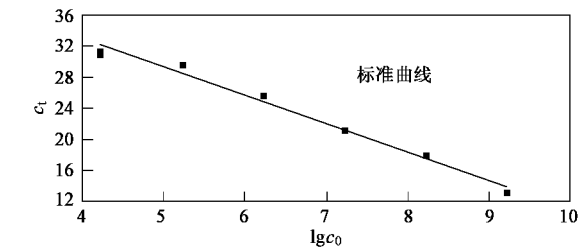


图3 样品 2 次重复 5 次稀释的标准曲线

Fig.3 Standard curve made with two replicates of each of five dilutions

2.3 MBR 对多组分液中的 WSSV 截留

微滤膜过滤过程遵循达西定律^[23]:

$$J = \frac{\Delta p}{\mu R_m} \tag{3}$$

式中, J 为膜通量; Δp 为膜两侧的压力差; μ 为滤液的粘度; R_m 为膜阻力.

由式(3)可知,当膜通量不变时,膜阻力会随着膜压力的升高而升高.在单一组分的 WSSV 粗提液中,因此滤液粘度、膜通量相同的情况下,膜阻力与 Δp 呈正比增长的,实际测定 3 个不同孔径的膜阻力与 Δp 也是如此;但当进水中的原水是与养殖废水中添加一定量的 WSSV 粗提液时,除了膜本身的阻力外,还有膜污染形成的阻力,使得膜阻力比新膜阻力大很多,此时的式(3)应为^[24]:

$$J = \frac{\Delta p}{\mu(R_m + R_p + R_c)} \tag{4}$$

式中, R_m 为膜本身的阻力; R_p 为混合液胶体和颗粒在膜孔内粘附和堵塞形成的膜阻力; R_c 为污泥颗粒在膜表面堆积成滤饼层形成的膜阻力.随着膜压力的升高,滤饼层被增厚, R_p 和 R_c 会随着升高,而抽吸式的 MBR 出水维持在恒定的 $4.5 \text{ L} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{h})^{-1}$ 时,

同时考虑 3 个不同孔径的膜生物反应器处理养殖废水添加相同量的 WSSV 粗提液时.结果发现,当 MBR 系统运行时间的延长,不同膜组件的膜生物反应器的膜阻力也相应提高,随着膜生物反应器的膜阻力上升,不同孔径的膜也相应地形成了膜表面的滤饼层和凝胶层,因此对 WSSV 的去除在于多因素的联合作用.当不同膜孔径的膜生物反应器系统运行 10 h,3 个不同孔径的跨膜压基本保持在 15 kPa 时,0.1 μm 、0.22 μm 和 0.45 μm 3 个膜孔径的膜生物反应器系统对 WSSV 的去除量分别为 5.6 lg、5.45 lg 和 5.15 lg,也就是说,膜孔径为 0.45 μm 膜生物反应器随着跨膜压(trans-membrane pressure, TMP)的提高,对 WSSV 的去除由原来的不到 0.6 lg 上升到 5.15 lg,说明了膜孔径为 0.45 μm 时,膜生物反应器中对 WSSV 去除效果不是膜本身的截留,而是膜生物反应器中在运行过程中形成膜污染造成. 3 个不同孔径膜生物反应器的 TMP 如图 4 所示,可以看出,随着时间的延长,不同孔径的膜生物反应器 TMP 是相应增加,当时间为 10 h 时,3 个膜孔径的 TMP 基本保持一致.0.1 μm 膜生物反应器对 WSSV 去除效率在整个反应过程中对 WSSV 的去除效果基本维持在 5.6 lg 水平,而 0.22 μm 和 0.45 μm 孔径的膜生物反应器随着反应器运行时间不断延伸,其对 WSSV 去除效果在不断变化,12 h 后,2 种膜孔径的膜生物反应器对 WSSV 去除量分别为 5.45 lg 和 5.35 lg,3 种膜孔径对 WSSV 的去除量不存在显著差异($p > 0.05$),具体结果如图 5 所示.

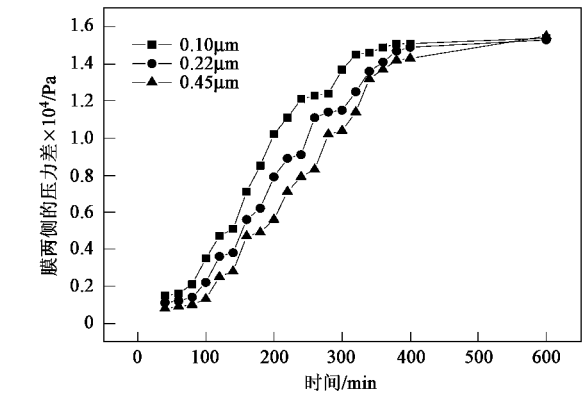


图 4 不同膜孔径的跨膜压在不同时间的变化情况
Fig.4 Changes of the trans-membrane pressure (TMP) in the MBRs of the different pore sizes with time extension

2.4 MBR 上清液的 WSSV 变化

由于定量 PCR 仪在检测 WSSV 过程中 c_t 值大于 40 时,对 WSSV 的检测为阴性,为了确保虾塘养

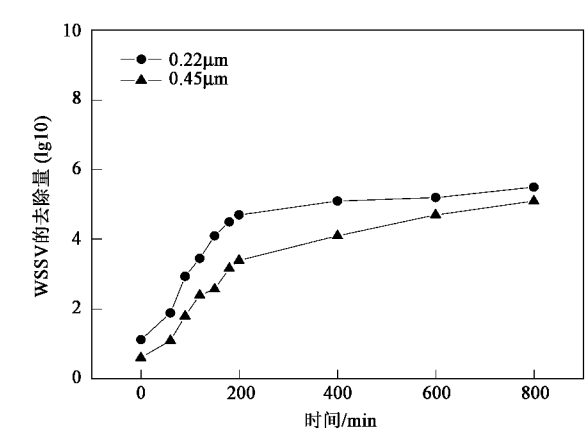


图 5 不同膜孔径对 WSSV 去除结果
Fig.5 Results on the removal efficiency of WSSV in the MBRs of the different pore sizes with time extension

殖废水的 WSSV 能够被检测到,在膜生物反应器的进水中添加 WSSV 的粗提液.在不断添加 WSSV 的粗提液到 3 种不同孔径的膜生物反应器的进水中时,原则上 3 种膜生物反应器进水上清液的 WSSV 浓度会逐步提高,而实际测定的 WSSV 每 mL 的拷贝数基本上与进水浓度保持在同一数量级,说明 WSSV 在生物反应器中可能被活性污泥吸附或被灭活.

2.5 膜清洗后对 WSSV 去除效果的影响

3 个不同膜组件运行 10 d 后,从膜生物反应器取出膜组件,用 NaOH 和 NaClO 对膜进行清洗除去凝胶层对病毒的去除影响.膜经过化学清洗后,再用双蒸水反复冲洗除掉残留在膜中碱性清洗液后,采用向膜中添加 WSSV 的粗提液,使 3 个不同孔径膜生物反应器处理养殖废水 WSSV 的初始浓度上升到 120 000 ~ 210 000 copy/mL,具体结果见图 6.由于 0.1 μm 孔径膜的上清液 WSSV 通过荧光定量 PCR 仪未能检测到,超过本次检测极限 10^3 copy/mL,因此认为其去除率为 100%;0.22 和 0.45 μm 的膜清洗后,对 WSSV 的平均去除效分别为 94% 和 40%,对于 0.1 μm 孔径的膜组件,滤饼层和凝胶层的去除没有影响膜对病毒的截留,说明膜孔径为 0.1 μm 膜组件主要依靠自身较小的膜孔径完成对 WSSV 截留.

3 结论

(1)3 个不同孔径的 MBRs 对 WSSV 的去除主要由膜本身起重要作用,0.1 μm 孔径的 MBR 对 WSSV 去除量为 5.5 lg; 0.22 μm 孔径的 MBR 对 WSSV 去除量为 1.18 lg;0.45 μm 孔径的 MBR 对 WSSV 去除

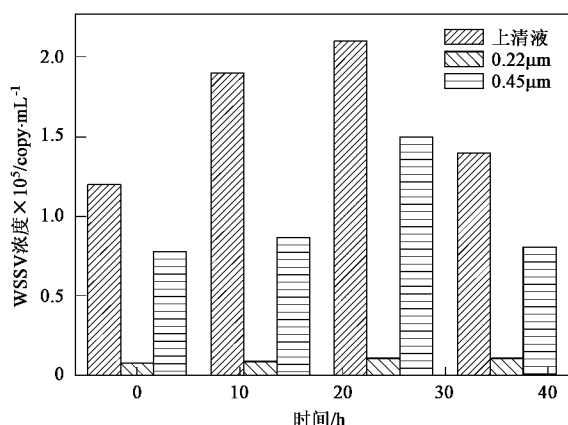


图 6 不同孔径的膜经化学清洗后对 WSSV 的去除效果

Fig.6 Changes of removal efficiency of WSSV in the MBRs with the different pore sizes after cleaning by means of chemical solution

量为 0.6 lg.

(2)在养殖废水中添加不同 WSSV 的粗提液,保证了养殖废水能够被荧光定量 PCR 检测到,当 3 个不同孔径的 MBRs 运行 10 h 后,MBRs 的滤饼层和凝胶层对游离 WSSV 的截留是主要决定因素,最终 0.1、0.22 和 0.45 μm 孔径的 MBR 对游离的 WSSV 截留量分别为 5.6 lg、5.45 lg 和 5.35 lg.因此可以看出,0.22 μm 和 0.45 μm 的 MBR 对 WSSV 的截留主要在于滤饼层和凝胶层的作用.

(3)受污染的不同孔径 MBRs,经碱洗后再用双蒸汽反复冲洗后,0.22 μm 膜对 WSSV 的截留比新膜对 WSSV 的去除率显著升高,为 94%;0.45 μm 膜对 WSSV 的去除率略有升高,为 40%.

参考文献:

- [1] Kennedy R C, Sparrow J T, Sanchez Y, *et al.* Enhancement of viral hepatitis B antibody (anti-HBs) response to a synthetic cyclic peptide by priming with anti-idiotypic antibodies Enteric viruses in water: Monographs in Virology [J]. Journal of Virology, 1984, **136** (1):247-252.
- [2] Krauth K, Staab K F. Pressurized bioreactor with membrane filtration for wastewater treatment [J]. Journal of Water Research, 1993, **27**(3):405-411.
- [3] 郑祥,魏源送,樊耀波,等.膜生物反应器在我国的研究进展[J].给水和排水,2002, **28**(2):105-110.
- [4] Tatsuki U, Nigel J H. Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor[J]. Journal of Water Research, 2000, **34**(7): 2151-2159.
- [5] Lightner D V, Redman R M. Shrimp diseases and current diagnostic methods [J]. Journal of Aquaculture, 1998, **164**(1-4):201-220.
- [6] Nunan L M, Poulos B T, Lightner D V. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp[J]. Aquaculture, 1998, **160**(1-2): 19-30.

- [7] Wongteerasupaya C, Wongwisansri S, Boonsaeng V, *et al.* DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species [J]. Journal of Aquaculture, 1996, **143**(1): 23-32.
- [8] Durand S V, Redman R M, Mohney L L, *et al.* Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV [J]. Journal of Aquaculture, 2003, **216**(1-4):9-18.
- [9] 徐丽美,杨丰.利用定量 PCR 方法研究对虾白斑杆状病毒感染与发病的关系[J].高技术通讯,2001, **11**(12):9-11.
- [10] Rajan P R, Ramasamy P, Purushothaman V, *et al.* White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus*[J]. Journal of Aquaculture, 2000, **184**(1-2):31-44.
- [11] Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. Journal of Virology, 2001, **75**(23):11811-11820.
- [12] Chen L L, Leu J H, Huang C J, *et al.* Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif Important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells [J]. Journal of Virology, 2002, **293**(1):471-477.
- [13] Argue B J, Arce S M, Lotz J M, *et al.* Selective breeding of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus [J]. Journal of Aquaculture, 2002, **204**(3-4):447-460.
- [14] Bouhabila E H, Aïm R B, Buisson H, *et al.* Microfiltration of activated sludge using submerged membrane with air bubbling [J]. Journal of Desalination, 1998, **118**(1-3):315-322.
- [15] Elmaleh S, Abdelmoumni L. Experimental test to evaluate performance of an anaerobic reactor provided with an external membrane unit [J]. Journal of Water Science and Technology, 1998, **38**(8-9):385-392.
- [16] Günder B, Krauth K. Replacement of secondary clarification by membrane separation results with plate and hollow fiber modules [J]. Journal of Water Science and Technology, 1998, **38**(4-5): 383-393.
- [17] Kowalska M, Bodzek M, Bohdziewicz J. Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms [J]. Journal of Process Biochemistry, 1998, **33**(2):189-197.
- [18] 桂萍,黄霞,钱易.三种型式膜-生物反应器工艺运行特性研究[J].给水排水,1999, **25**(3):24-27.
- [19] 刘锐,黄霞,钱易,等.一体式膜-生物反应器处理生活污水的中试研究[J].给水排水,1999, **25**(1):1-4.
- [20] 张颖,任南琪.不同膜组件的 SMBR 处理蛋白废水的特性研究[J].哈尔滨工业大学学报,2001, **33**(6):51-55.
- [21] Liu B, Yu Z M, Song X X, *et al.* The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Journal of Aquaculture, 2006, **253**:163-170.
- [22] 时钧,袁权,高从锴.膜技术手册[M].北京:化学工业出版社,2001.25-87.
- [23] Mulder M 著,李琳译.膜技术基本原理[M].(第二版).北京:清华大学出版社,1999.270-293.
- [24] Lim A L, Bai R. Membrane fouling and cleaning in microfiltration of activated sludge wastewater [J]. Journal of Membrane Science, 2003, **216**(122):279-290.
- [25] 刘萍,孟宪红,孔杰,等.对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析[J].水产学报,2002, **26**(3):270-274.
- [26] 刘萍,何玉英.快速生长的新品种“黄海一号”的人工选育[J].水产学报,2005, **29**(1):1-5.