

## 研究报告

## 海水养殖系统中 37 株枯草芽孢杆菌生理代谢、遗传特性及抑菌效果差异分析

张杨<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>2,3</sup>, 于永翔<sup>\*2,3</sup>, 张正<sup>2,3</sup>, 廖梅杰<sup>2,3</sup>, 王春元<sup>2,3</sup>, 李彬<sup>2,3</sup>, 荣小军<sup>2,3</sup>, 葛建龙<sup>2,3</sup>

1 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

2 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

3 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食品产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

张杨, 王印庚, 于永翔, 张正, 廖梅杰, 王春元, 李彬, 荣小军, 葛建龙. 海水养殖系统中 37 株枯草芽孢杆菌生理代谢、遗传特性及抑菌效果差异分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3300-3313.

ZHANG Yang, WANG Yingeng, YU Yongxiang, ZHANG Zheng, LIAO Meijie, WANG Chunyuan, LI Bin, RONG Xiaojun, GE Jianlong. Physiological metabolism, genetic characteristics, and bacteriostatic activity diversity of 37 *Bacillus subtilis* from mariculture system[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3300-3313.

**摘要:** 【背景】由水产致病菌导致的病害不断暴发, 寻找安全有效的抗生素替代品是目前生产的迫切需求。人们通常过于关注益生菌效应, 而对其安全性评价重视度不够。【目的】分析我国海水养殖系统中不同来源枯草芽孢杆菌菌株的表型及遗传特征, 并寻找绿色安全且具有多重抑菌作用的菌株。【方法】以 2009–2021 年从我国海水养殖系统中分离的 37 株枯草芽孢杆菌为对象, 利用纸片扩散法(K-B 法)检测其对不同抗生素的抗性; 利用培养基平板法测定淀粉酶、蛋白酶和溶血能力; 通过 PCR 方法检测枯草芽孢杆菌溶血相关基因携带风险; 采用牛津杯法测定其对副溶血弧菌、溶藻弧菌、爱德华氏菌、哈维氏弧菌、美人鱼发光杆菌和假交替单胞菌等 6 种病原菌的抑菌作用; 并对候选益生性枯草芽孢杆菌的安全性进行评估。【结果】药敏检测结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌对甲氧苄啶、吡哌酸、链霉素表现出强耐药性, 对磺胺嘧啶表现出中等耐药, 对头孢噻肟、环丙沙星、舒巴坦的耐药率低, 对克拉霉素、诺氟沙星、氟苯尼考、氟甲喹、复方新诺明、四环素表现为完全敏感。蛋白酶、淀粉酶活性测试结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌能不同程度地水解酪蛋白和淀粉。溶血性测试结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌中有 4 株出现溶血现象, 而 8 个溶血相关基因在 37 株枯草芽孢杆菌中均有检出, 溶血表型与检测基因关联分析表明, 产生溶血现象的

资助项目: 青岛市海洋科技创新专项项目(22-3-3-hygg-3-hy); 山东省泰山产业领军人才项目(LJNY201802); 山东省重点研发计划(科技示范工程)课题(2021SFGC0701)

This work was supported by the Qingdao Marine Science and Technology Innovation Project (22-3-3-hygg-3-hy), the Project of Taishan Industry Leading Talent Project of Shandong Province (LJNY201802), and the Key Research and Development Program of Shandong Province (2021SFGC0701).

\*Corresponding author. E-mail: yuyx@ysfri.ac.cn

Received: 2022-11-22; Accepted: 2023-01-31; Published online: 2023-03-13

菌株与其溶血基因携带间无直接相关性。抑菌试验分析表明, 37 株枯草芽孢杆菌均对 2 种及以上病原菌有抑制作用, 对 6 种病原菌均具有良好抑菌作用的有 2 株(菌株 Bs4 和 Bs7)。对凡纳滨对虾的安全试验表明, 菌株 Bs4 对凡纳滨对虾具有高安全性, 7 d 对虾存活率为 100%。【结论】通过对 37 株枯草芽孢杆菌生理代谢表型、遗传特性及病原拮抗特性进行比较分析, 揭示了我国海水养殖系统中枯草芽孢杆菌具有多元化的表型及遗传特征, 并筛选出一株生态安全且具有多重抑菌活性的益生性枯草芽孢杆菌, 为水产养殖病害防控、开发抑菌类微生态制剂及水产养殖行业健康绿色发展提供了理论基础和技术支撑。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 抗生素敏感性; 溶血性; 产酶能力; 抑菌作用; 生态安全

## Physiological metabolism, genetic characteristics, and bacteriostatic activity diversity of 37 *Bacillus subtilis* from mariculture system

ZHANG Yang<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2,3</sup>, YU Yongxiang<sup>\*2,3</sup>, ZHANG Zheng<sup>2,3</sup>, LIAO Meijie<sup>2,3</sup>, WANG Chunyuan<sup>2,3</sup>, LI Bin<sup>2,3</sup>, RONG Xiaojun<sup>2,3</sup>, GE Jianlong<sup>2,3</sup>

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

3 Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong, China

**Abstract:** [Background] Diseases caused by aquatic pathogens continue to break out, and finding safe and effective alternatives to antibiotics is an urgent need. Probiotics are often influenced by interests and profit-making, whereas not enough attention has been paid to their safety evaluation. [Objective] To find green and safe probiotics with multiple bacteriostatic activities based on the phenotypic and genetic characteristics of *Bacillus subtilis* in China's mariculture system. [Methods] Taking 37 *B. subtilis* isolated from China's mariculture system from 2009 to 2021 as the research object, this study used K-B method to detect the resistance of *B. subtilis* to different antibiotics. The amylase, protease, and hemolytic capacity of *B. subtilis* were determined by medium plate method. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the risk of carrying genes related to hemolysis in *B. subtilis*. The Oxford cup method was used to determine its bacteriostatic effects on six pathogens, including *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio algaelyticus*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi*, *Pseudoalteromonas* sp., and *Photobacterium damsela*. The safety of candidate probiotic *B. subtilis* was evaluated. [Results] The results of drug susceptibility test showed that 37 isolates of *B. subtilis* showed strong resistance to trimethoprim, pipemidic acid, and streptomycin, moderate resistance to sulfadiazine, low resistance to cefotaxime, ciprofloxacin, and sulbactam, and complete sensitivity to clarithromycin, norfloxacin, florfenicol, flumequine, cotrimoxazole, and tetracycline. The test results of protease and amylase activity showed that 37 isolates of *B. subtilis*

hydrolyzed casein and starch to varying degrees. The hemolytic test results showed that 4/37 isolates of *B. subtilis* had hemolytic phenomenon, while 8 hemolysis-related genes were detected in 37 isolates of *B. subtilis*. The analysis of the correlation between hemolytic phenotype and detection gene showed that there was no direct correlation between the strain that produced hemolysis and its hemolytic gene carrier. The analysis of bacteriostatic experiments showed that all isolates of *B. subtilis* had inhibitory effect on 2 or more pathogenic bacteria, and 2 isolates (strains Bs4 and Bs7) had good bacteriostatic effects on 6 pathogenic bacteria. Safety experiments on *Litopenarus vanmamei* showed that strain Bs4 had high safety against *L. vanmamei*, and the survival rate of 7 d was 100%. **[Conclusion]** Through the comparative analysis of the physiological metabolic phenotype, genetic characteristics, and pathogen antagonism characteristics of *B. subtilis* isolates, it is revealed that *B. subtilis* has diversified phenotypes and genetic characteristics in China's mariculture system. An ecologically safe and probiotic *B. subtilis* with multiple bacteriostatic activities is screened out, which provides a theoretical basis and technical support for the prevention and control of aquaculture diseases, the development of bacteriostatic microecological preparations, and the healthy and green development of aquaculture industry.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; antibiotic susceptibility; hemolytic; enzyme-producing capacity; bacteriostasis; ecological security

随着人民生活水平的提高,对高蛋白、低脂肪的优质食品需求不断增加,在此背景下,水产养殖业得以逐步发展。养殖水产品在为人们提供丰富优质蛋白质的同时,也为我国的粮食安全提供了重要保障。但日益扩大的养殖规模使得水产病害发生几率显著增加,对水产养殖业造成了严重打击。据统计,2020年由病害导致的水产品损失达到139万t,累计约20.8亿元<sup>[1]</sup>。在众多水产养殖病害中,由细菌感染导致的疾病占比较大,成为限制水产养殖业发展的重要因素。在海水养殖过程中常见的病原菌包括副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio algaelyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、鳃弧菌(*Vibrio anguallanim*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)等,严重影响鱼、虾、

贝类等水产养殖动物的健康养殖<sup>[2]</sup>。

抗生素以其简单、快速、经济的优点被长期用作对抗细菌性疾病的有效药物<sup>[3]</sup>,但是广泛、频繁地使用抗生素易导致抗生素在某些情况下不再有治疗细菌性疾病的功效<sup>[4]</sup>,并引起水产养殖相关细菌的遗传和代谢特性发生显著变化,甚至扩大细菌耐药性的传播<sup>[5]</sup>。水生生态系统中的益生菌会产生抑制其他微生物生长的抗微生物物质,并作为一种安全的添加剂以改善宿主的微生物菌群,提高免疫反应<sup>[6]</sup>。芽孢杆菌是人类发现最早的细菌之一,能够改善水体环境、促进生长、提高免疫力、抑制病原菌,现已成为多种动物疾病防控的重要生物制品<sup>[7]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是最常用、最具特色的一类芽孢杆菌,在水产养殖上的应用研究比较多,且易于生产和保存。枯草芽孢杆菌可以在动物肠道内竞争性抑制其他有害菌的生存与繁殖,有利于有益菌的生长,进而改

善肠道菌群结构,从而间接提高机体免疫力<sup>[8]</sup>。据报道,枯草芽孢杆菌对副溶血弧菌<sup>[9]</sup>、迟缓爱德华菌<sup>[10]</sup>、嗜水气单胞菌<sup>[11]</sup>等具有抑制作用,然而并非所有芽孢杆菌都适合应用于生产实践中,某些芽孢杆菌是食源性病原体,可导致不同形式的疾病<sup>[12]</sup>。例如,对虾细菌性白斑症(bacterial white spot syndrome, BWSS)的发生与虾池中异常使用含有枯草芽孢杆菌的生物菌剂有关<sup>[13]</sup>。因此,只有生态友好、生物安全、具有益生作用的芽孢杆菌才能被用作益生菌。

本研究以实验室分离于 2009–2021 年不同地区的 37 株枯草芽孢杆菌为研究对象,通过对其生理代谢表型、遗传特性进行分析,并以副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、迟缓爱德华氏菌、假交替单胞菌、美人鱼发光杆菌共 6 种病原菌为指示菌,探究不同枯草芽孢杆菌菌株间抑菌效果差异,以期获得生态安全且具有多重抑菌活性的潜在益生性芽孢杆菌,为开发适用于水产养殖环境的抑菌类微生态制剂提供理论基础和材料保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究共包含 37 株枯草芽孢杆菌,于 2009–2021 年分离自我国不同地区的海水养殖环境中,所有菌株均保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所,并进一步进行 16S rRNA 基因鉴定。此外,用于拮抗试验的 6 株病原菌分别为副溶血弧菌<sup>[14]</sup>、溶藻弧菌、爱德华氏菌<sup>[15]</sup>、哈维氏弧菌、美人鱼发光杆菌<sup>[16]</sup>、假交替单胞菌,均由实验室保存并已通过试验证实。大肠杆菌 ATCC 25922 由实验室保藏。

凡纳滨对虾,青岛市瑞滋海珍品发展有限公司; TSB 固体培养基,北京陆桥技术股份有限公司;可溶性淀粉琼脂、酪蛋白琼脂,青岛

高科技工业园海博生物技术有限公司。菌落计数仪, Interscience 公司。

### 1.2 枯草芽孢杆菌抗生素敏感性测试

将实验室–80 °C 冰箱保存的 37 株枯草芽孢杆菌和 6 种病原菌接种于 TSB 固体培养基,枯草芽孢杆菌 28 °C 活化培养 36 h,病原菌 28 °C 活化培养 24 h,随后挑取单菌落接种于新 TSB 固体培养基上,培养得到菌株的纯培养物。

挑取纯化后的枯草芽孢杆菌重悬于 1.5% NaCl 无菌溶液中,制备成  $10^6$  CFU/mL 的菌悬液,采用纸片扩散法(K-B 法)对 37 株枯草芽孢杆菌进行药物敏感性测试。本试验共选用 7 类 13 种抗生素,包括:β-内酰胺类 2 种(头孢噻肟、舒巴坦),喹诺酮类 4 种(环丙沙星、吡哌酸、诺氟沙星、氟甲喹),磺胺类 3 种(甲氧苄啶、复方新诺明、磺胺嘧啶),大环内酯类 1 种(克拉霉素),氨基糖苷类 1 种(链霉素),四环素类 1 种(四环素),氯霉素类 1 种(氟苯尼考)。以大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌,进行各批次测试的质控。检测结果根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)抗生素敏感试验标准进行判读,将耐药情况分为敏感 S (sensitive)、中间 I (intermediate)、耐药 R (resistant)<sup>[17]</sup>。同时,参照 Magiorakos 等<sup>[18]</sup>计算不同菌株的多重耐药指数(multi-antibiotic resistance indexes, MARIs),即某一细菌对 13 种测试抗生素耐受的抗生素数目与测试抗生素总数目的比值。

### 1.3 枯草芽孢杆菌产淀粉酶和蛋白酶能力检测

在 500 mL 去离子水中分别添加 18.5 g 可溶性淀粉琼脂和 21.0 g 酪蛋白琼脂制备成测定淀粉酶分解能力的淀粉平板和测定蛋白酶分解能力的酪蛋白平板。将纯化后的枯草芽孢杆菌重悬于无菌 1.5% NaCl 溶液中,制备成浓度为

$10^8$  CFU/mL 的菌悬液( $OD_{600} \approx 0.8$ )。随后吸取 5  $\mu$ L 菌悬液接种于淀粉平板和酪蛋白平板, 28  $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h 后观察测量菌苔周围水解圈, 并拍照记录菌株的淀粉酶和蛋白酶分解能力。

#### 1.4 枯草芽孢杆菌的溶血性及相关溶血基因检测

使用 TSB 固体培养基添加 5% 无菌脱纤维绵羊血制成血平板。将纯化后的枯草芽孢杆菌重悬于无菌 1.5% NaCl 溶液制备成  $10^8$  CFU/mL 的菌悬液( $OD_{600} \approx 0.8$ ), 吸取 5  $\mu$ L 菌悬液转接于血平板, 28  $^{\circ}$ C 恒温培养 36 h 后判定菌株的溶血能力。

为了进一步探究菌株的溶血特性, 通过 PCR 测定 37 株枯草芽孢杆菌内溶血相关基因携带情况, 共检测 *yhdP*、*yhdT*、*yrkA*、*yqxC*、*yplQ*、*yugS*、*yqhB* 和 *ytjA* 这 8 种溶血相关基因<sup>[19]</sup>, 相关基因引物序列见表 1。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA (100 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O

10.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 52  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各基因携带情况。

#### 1.5 枯草芽孢杆菌对 6 种病原菌的体外抑菌能力检测

采用牛津杯法检测 37 株枯草芽孢杆菌对 6 种不同病原菌的拮抗活性。挑取纯化后的枯草芽孢杆菌加入无菌 1.5% NaCl 溶液制备成浓度为  $10^8$  CFU/mL 菌悬液( $OD_{600} \approx 0.8$ ), 同步制备浓度为  $10^6$  CFU/mL 的副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、爱德华氏菌、假交替单胞菌和美人鱼发光杆菌菌悬液( $OD_{600} \approx 0.5$ )。吸取 100  $\mu$ L 病原菌菌悬液涂布于 TSB 固体培养基表面, 随后在牛津杯孔内加入 100  $\mu$ L 的芽孢杆菌菌悬液, 静置 10 min 后置于 28  $^{\circ}$ C 培养 36 h, 观察 37 株枯草芽孢杆菌对 6 种病原菌的抑制作用, 并用菌落计数仪测量抑菌圈直径。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 The primers used to this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product size (bp)
<i>yhdP</i>	ATATACCCGCTACCCTGTGGAAGAG GCAGTACCGCCGTATTCATCAGAC	237
<i>yhdT</i>	ATGGCTGCTGTGTCAACTGAGATG AAGTCCCGAGGTTCCCTCCGTATTC	312
<i>yrkA</i>	ATATGGCGGCACTTCAGGTTTAGTC CGGCTTCTATAACGGACCCAACCTG	263
<i>yplQ</i>	GGCATCGGTGTCCTCTTATCCATC CCAACAGGGTAAAGCCGAGTGTG	277
<i>yqxC</i>	TCCTTTATTTCACTGCGGCTCATCC TTCCGTCTCCTCCCGTGATTGG	241
<i>yugS</i>	GCAGAAGGAGCGGATTCACATGG TTAGAAGCCAGCCTGCAATCGTATC	260
<i>yqhB</i>	GCTTTAGGACTGGGATGGCTTGG ATCAATCGGGCAGAGTGGTTCAAC	281
<i>ytjA</i>	ATGAAAACCTATTCATCGCTCTG CTTTTCAGGAACGGGATCGACT	231

## 1.6 枯草芽孢杆菌对凡纳滨对虾的安全性分析

挑取候选益生性枯草芽孢杆菌单菌落接种于 200 mL 液体 TSB 培养基, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后, 于 24 °C、12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用无菌 PBS 溶液重悬洗涤 3 次后, 调整菌液浓度为  $10^8$  CFU/mL 的菌悬液 ( $OD_{600} \approx 0.8$ ) 备用。

采用人工浸浴的方式测定枯草芽孢杆菌对凡纳滨对虾的安全性。虾体长约为 6 cm, 所有试验虾在试验前均暂养 7 d 以确保对虾健康。每组使用健康的凡纳滨对虾 30 尾, 每组 3 个平行, 试验水温为 28 °C。试验组添加候选益生性枯草芽孢杆菌至终浓度为  $10^8$  CFU/mL, 对照组加入等量的无菌 PBS 溶液。试验期间连续充气, 观察对虾的存活情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 枯草芽孢杆菌基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

纯化后的 37 株枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 基因扩增得到 1 452 bp 的目标条带, 经测序后进行 BLAST 同源比对分析, 与 GenBank 中芽孢杆菌属的成员进行聚类分析。鉴定后 37 株菌均为枯草芽孢杆菌(图 1), 相关序列已提交至 GenBank, 登录号 OQ423136–OQ423172。

### 2.2 枯草芽孢杆菌对不同类别抗生素的敏感性分析

药敏检测结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌对 13 种抗生素的耐药情况差异较大, 对同一类药物的耐药情况并不完全相同, 见图 2。对于试验选用的 4 种喹诺酮类药物, 37 株枯草芽孢杆菌对吡哌酸表现为较高耐药性, 耐药率达到 71.4%, 对环丙沙星表现出低耐药性, 耐药率仅有 2.7%, 而对于诺氟沙星、氟甲喹则表现为完

全敏感; 对于所用的 3 种磺胺类药物, 枯草芽孢杆菌对甲氧苄啶和磺胺嘧啶的耐药率达到 57.1% 和 42.9%, 但对复方新诺明抗生素全部表现为敏感; 在选用的 2 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素中, 枯草芽孢杆菌对头孢噻肟的耐药率为 21.6%, 而对舒巴坦的耐药率仅为 2.7%。对于其他种类的药物, 对链霉素的耐药率为 54.3%, 对四环素、氟苯尼考和克拉霉素均表现为敏感。多重耐药指数分析表明, 37 株枯草芽孢杆菌的 MARI 为 0.00–0.38, 有 16 株菌对测定的 3 种以上抗生素耐受, 多重耐药率达到 43.2%。

### 2.3 枯草芽孢杆菌淀粉酶和蛋白酶活性分析

蛋白酶活性测试结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌均能在酪蛋白琼脂培养基上形成透明圆环(表 2), 蛋白酶水解圈直径为 8.2–20.4 mm, 若以水解圈直径大于 15 mm 为参考, 则有 13 株菌表现为强蛋白酶活性, 蛋白酶活性最强的菌株为 Bs28(图 3)。淀粉酶活性测试结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌均能水解淀粉, 淀粉酶水解圈直径为 10.2–16.8 mm, 以水解圈直径大于 15 mm 为参考, 有 8 株表现为强淀粉酶活性, 包括 Bs1、Bs12、Bs16、Bs17、Bs19、Bs24、B27 和 B29。

### 2.4 枯草芽孢杆菌溶血性及溶血基因检测分析

溶血性测试结果显示, 接种培养 36 h 后, 37 株枯草芽孢杆菌中有 4 株枯草芽孢杆菌在绵羊血平板上形成溶血环(溶血环直径为 11–14 mm), 表现出了溶血效应(图 4), 分别是 Bs6、Bs7、Bs29 和 Bs31, 其余 33 株菌均无溶血活性。

溶血基因检测结果表明, 8 种枯草芽孢杆菌溶血相关基因在 37 株枯草芽孢杆菌中均被检出, *yugS*、*yhdP*、*yqxC*、*yplQ*、*yqhB*、*ytjA*、*yhdT* 和 *yrkA* 的检出率分别为 94.59%、91.89%、86.49%、86.46%、86.49%、86.49%、81.08% 和

59.46% (图 5)。

溶血表型与检测基因关联分析表明, 未出现溶血现象的枯草芽孢杆菌含有不同数量的溶血基因。产生溶血现象的菌株 Bs6、Bs7 和 Bs31 均检测到 8 个溶血基因, 但有 17 株无溶血现象

的枯草芽孢杆菌也检测到 8 种溶血基因, 与菌株 Bs6、Bs7 和 Bs31 具有相同的溶血基因携带情况。另外一株产生溶血现象的菌株 Bs29 只检测出了 *yhdP* 和 *yugS*, 而且无与其相同溶血基因型的枯草芽孢杆菌。

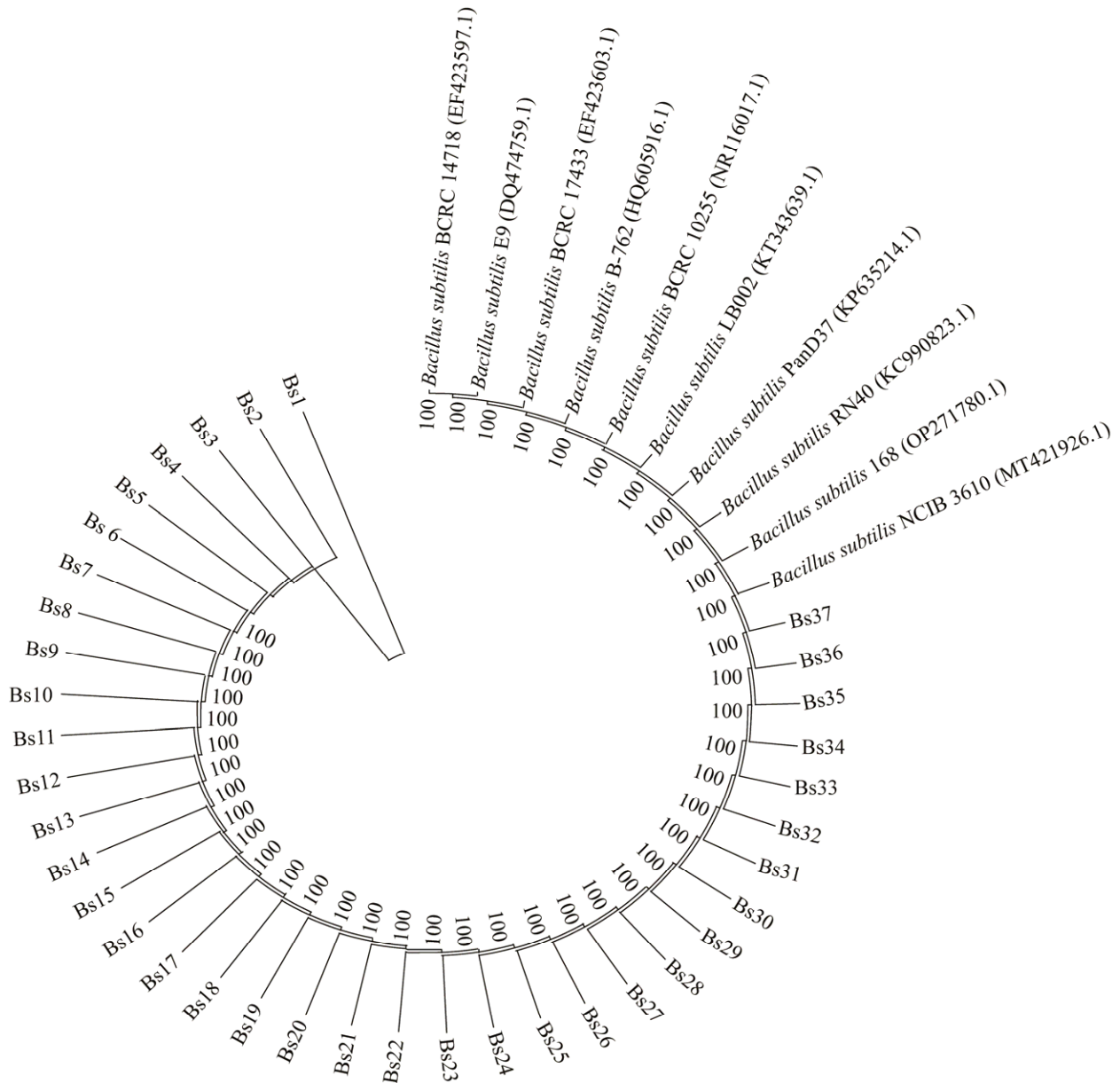


图 1 枯草芽孢杆菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内的数字为 GenBank 登录号; 结点处数字为 bootstrap 值

Figure 1 Phylogenetic tree of *Bacillus subtilis* based on 16S rRNA gene sequence by adjacency method. Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the bootstrap value.

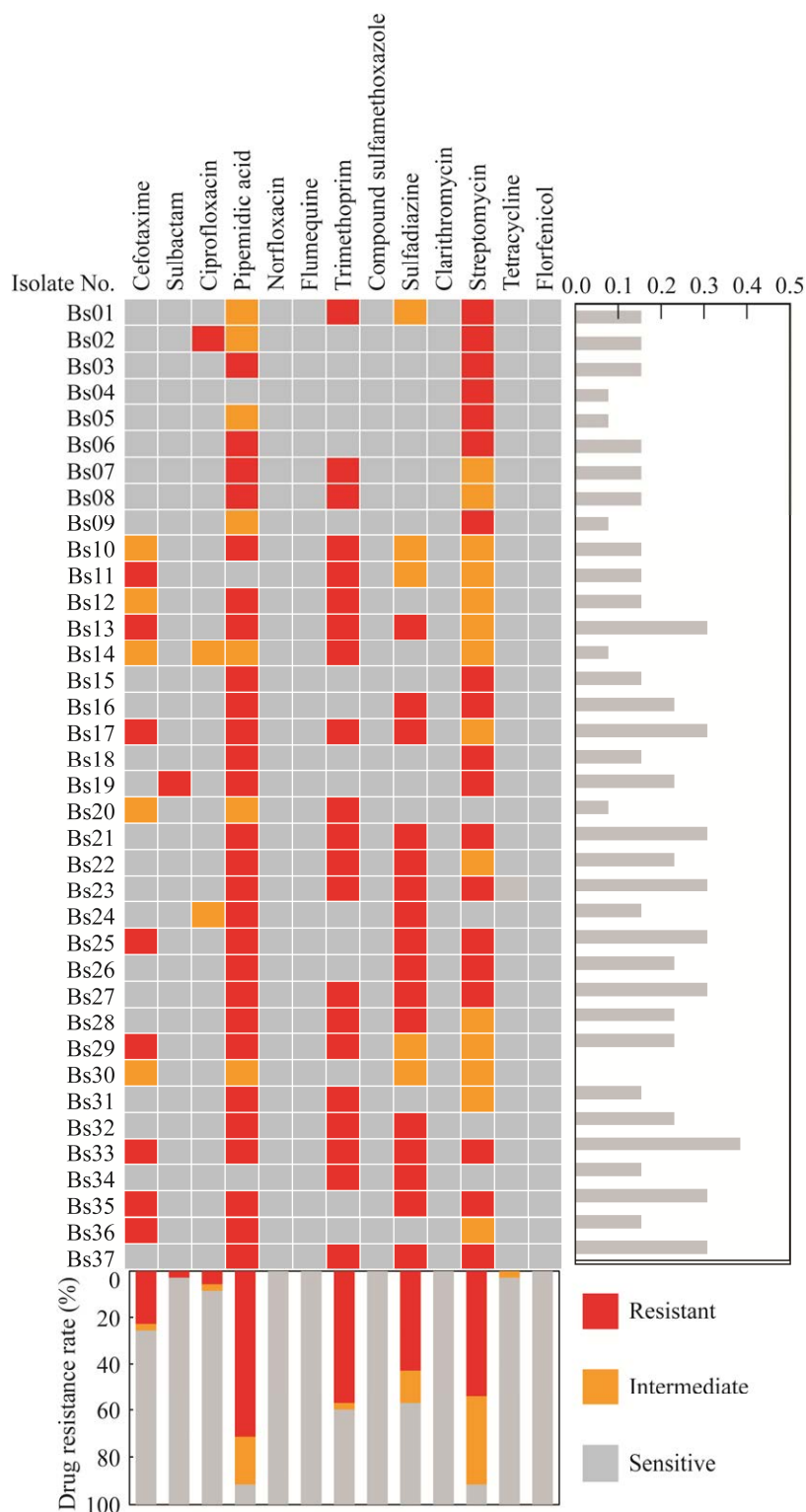


图 2 37 株枯草芽孢杆菌对 13 种抗生素的敏感性

Figure 2 The susceptibility pattern of 37 *Bacillus subtilis* to 13 antimicrobial agents.



表 2 枯草芽孢杆菌的蛋白酶及淀粉酶水解圈直径  
Table 2 Protease and amylase hydrolysis circle diameter of *Bacillus subtilis*

菌株 Strain	蛋白酶 Protease (mm)	淀粉酶 Amylase (mm)	菌株 Strain	蛋白酶 Protease (mm)	淀粉酶 Amylase (mm)
Bs1	9.0	16.8	Bs20	9.1	12.6
Bs2	10.7	12.2	Bs21	12.6	10.2
Bs3	16.0	12.0	Bs22	8.2	13.0
Bs4	17.9	13.0	Bs23	8.5	12.6
Bs5	18.1	12.5	Bs24	8.5	15.2
Bs6	19.0	12.4	Bs25	11.3	13.2
Bs7	17.3	10.6	Bs26	16.6	12.8
Bs8	10.2	12.6	Bs27	10.2	16.2
Bs9	18.4	13.6	Bs28	20.4	13.6
Bs10	17.7	11.4	Bs29	18.4	15.6
Bs11	12.7	13.4	Bs30	12.0	12.2
Bs12	19.3	15.2	Bs31	10.2	14.6
Bs13	10.5	11.5	Bs32	16.2	14.2
Bs14	13.9	12.4	Bs33	11.8	14.4
Bs15	10.0	14.8	Bs34	13.0	11.2
Bs16	12.6	15.4	Bs35	9.8	12.8
Bs17	12.3	15.0	Bs36	11.3	13.8
Bs18	16.2	13.2	Bs37	10.0	14.4
Bs19	10.9	15.4			

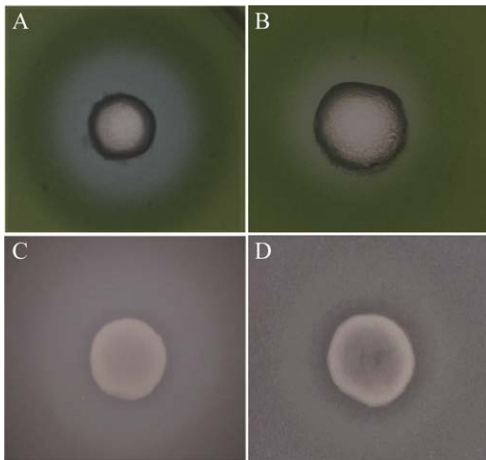


图 3 枯草芽孢杆菌的蛋白酶和淀粉酶表型特征  
A: 强蛋白酶活性. B: 弱蛋白酶活性. C: 强淀粉酶活性. D: 弱淀粉酶活性

Figure 3 Different protease and amylase activity phenotype of *Bacillus subtilis*. A: Strong protease activity. B: Weak protease activity. C: Strong amylase activity. D: Weak amylase activity.

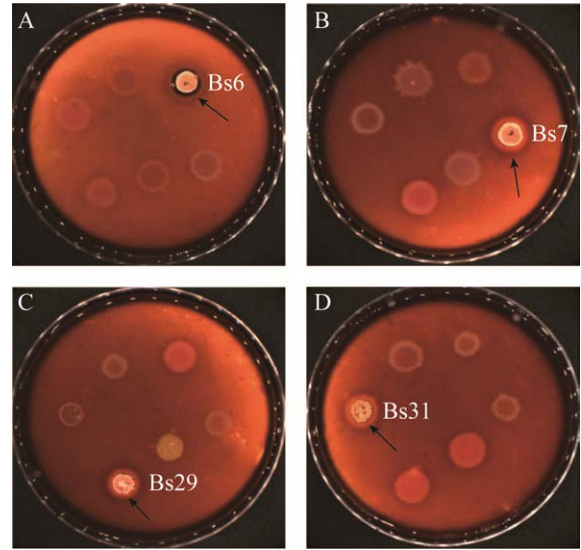


图 4 枯草芽孢杆菌溶血活性

Figure 4 Hemolytic activity of *Bacillus subtilis*.

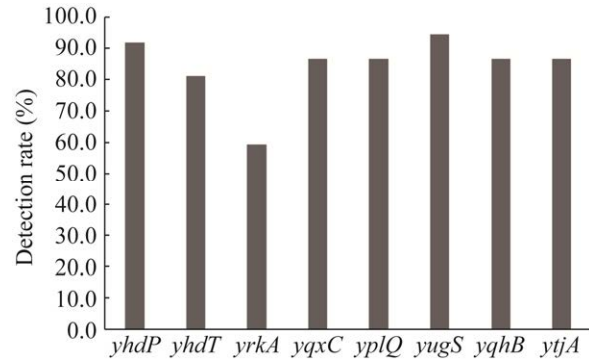


图 5 枯草芽孢杆菌菌株内溶血相关基因检出率

Figure 5 Detection rate of hemolysis-related genes in *Bacillus subtilis* isolates.

## 2.5 枯草芽孢杆菌对 6 种病原菌的抑菌效果分析

抑菌检测结果显示, 37 株枯草芽孢杆菌对 6 种病原菌抑菌能力在不同枯草芽孢杆菌分离株之间表现出明显差异(图 6)。37 株枯草芽孢杆菌均对 2 种以上病原菌有抑制作用, 仅对 2 种病原菌有抑制作用的枯草芽孢杆菌有 8 株, 对 3 种病原菌有拮抗作用的有 7 株, 对 4 种病原菌有拮抗作用的有 7 株, 对 5 种病原菌有拮抗

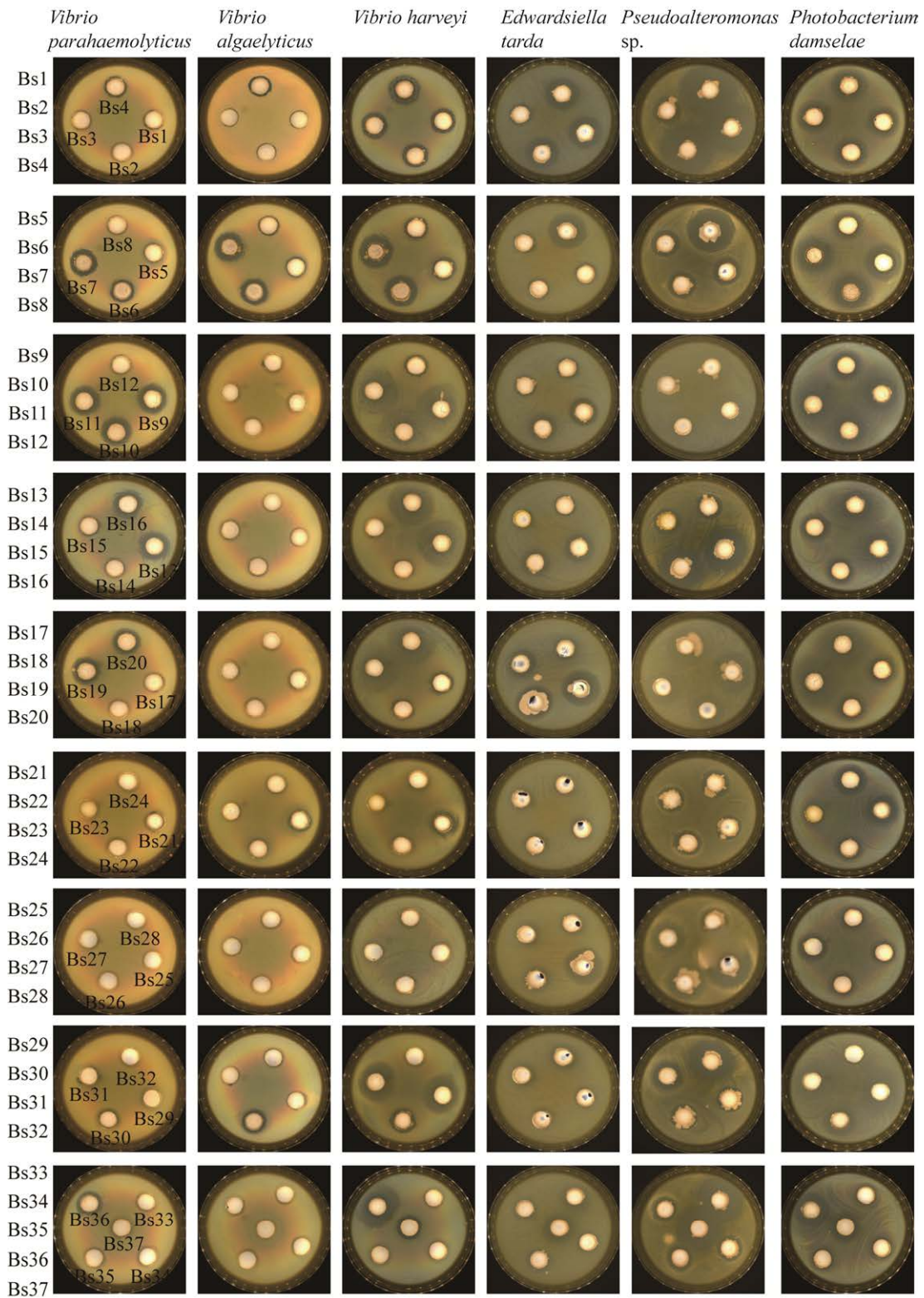


图 6 37 株枯草芽孢杆菌对 6 种病原菌的抑制效果

Figure 6 The antagonist inhibition zone of 37 *Bacillus subtilis* for 6 kinds of pathogen.

作用的有 11 株,对 6 种病原菌均具有良好抑菌效果的有 2 株(菌株 Bs4 和 Bs7)。

从不同种类病原菌角度分析,以是否出现抑菌圈为标准,在 37 株枯草芽孢杆菌中,有 12 株对副溶血弧菌有抑制作用,抑菌圈直径为 13.2–22.0 mm; 6 株对溶藻弧菌有抑制作用,抑菌圈直径为 14.0–20.9 mm; 23 株对哈维氏弧菌有抑制作用,抑菌直径为 16.4–27.4 mm, 28 株对爱德华氏菌有抑制作用,抑菌圈直径为 13.4–25.8 mm; 34 株对美人鱼发光杆菌有抑制作用,抑菌圈直径为 13.6–24.5 mm; 37 株对假交替单胞菌均有良好的抑制作用,抑菌圈直径最大可达 35.7 mm。

## 2.6 枯草芽孢杆菌对凡纳滨对虾的安全性分析

通过药物敏感性、溶血性、蛋白酶和淀粉酶活性、毒力基因携带风险等检测评估,并结合枯草芽孢杆菌对多种病原菌的拮抗作用筛选出一株候选益生性枯草芽孢杆菌 Bs4,其具有分解蛋白酶、淀粉酶的能力,对头孢噻肟、环丙沙星、甲氧苄啶、吡哌酸、克拉霉素、诺氟沙星、氟苯尼考、氟甲喹、复方新诺明、四环素、磺胺嘧啶和舒巴坦等药物均敏感,无溶血活性,且对副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、迟缓爱德华氏菌、假交替单胞菌和美人鱼发光杆菌等 6 种试验选取的病原菌均具有良好的抑制作用,因此将其作为水产养殖益生菌的候选菌株。

通过对凡纳滨对虾进行浸浴感染分析表明,枯草芽孢杆菌 Bs4 对凡纳滨对虾具有高安全性,7 d 内凡纳滨对虾均未出现死亡现象,存活率为 100%,与对照组无差异。因此,枯草芽孢杆菌 Bs4 可作为水产养殖的潜在益生菌菌株。

## 3 讨论与结论

随着使用抗生素的弊端在养殖中的凸显,

抗生素耐药性成为全球健康面临迫在眉睫的挑战之一,自然环境可能是抗生素耐药性传播的潜在储存库<sup>[20]</sup>。同时由于抗生素的过度使用,抗生素耐药基因可能在细菌之间转移、改变甚至获得耐药性,抗生素耐药对人类健康有严重影响,损害抗生素治疗效果,并危害公共健康。因此,在水产养殖过程中应减少抗生素的使用,开发新的非抗生素抑菌药物和替代品显得尤为重要。本研究将菌株的药敏性作为安全性的一个重要指标,对 37 株枯草芽孢杆菌进行抗生素敏感试验表明,枯草芽孢杆菌对舒巴坦、环丙沙星、诺氟沙星、氟甲喹、复方新诺明、克拉霉素、四环素、氟苯尼考等 8 种药物表现为敏感,且有近 60%的菌株 MARI 值小于 0.02。MARI 反映了抗生素可能对人类健康造成的环境污染程度,其值高于 0.2 表明抗生素暴露风险高,低于 0.2 表明抗生素暴露风险低<sup>[21]</sup>。本研究表明枯草芽孢杆菌的抗生素暴露风险较低。Yu 等<sup>[22]</sup>通过肠杆菌基因间保守重复序列研究发现,菌株的遗传类型、耐药表型和基因型之间无显著相关性。Kang 等<sup>[23]</sup>也发现了其相关性较低。

具有产酶性能是益生菌的重要指标之一,产胞外酶活力决定了芽孢杆菌对有机物的分解能力,可以协同动物体内酶,促进营养物质消化与吸收,达到促进机体生长的效果<sup>[24]</sup>。窦春萌等<sup>[25]</sup>从凡纳滨对虾肠道分离筛选到具有强淀粉酶、蛋白酶及脂肪酶活性的 4 株益生菌候选菌株。王成强等<sup>[26]</sup>从石斑鱼肠道中获得具有产纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶能力的 4 株枯草芽孢杆菌。本试验以淀粉酶和蛋白酶这 2 种酶的产酶活力作为指标对不同枯草芽孢杆菌菌株产酶能力进行评估。蛋白酶活性测试结果显示,37 株枯草芽孢杆菌均能在酪蛋白琼脂培养基形成透明圆环,水解圈直径为 8.2–20.4 mm,37 株枯草芽孢杆菌均具有产淀粉酶的能力,水解圈

直径为 10.2–16.8 mm。

溶血素是一种非常常见的毒力因子, 导致宿主贫血等症状, 虽然枯草芽孢杆菌产生的溶血活性低于病原菌, 但在枯草芽孢杆菌用于养殖之前, 有必要降低或者消减其溶血活性。本试验中有 4 株枯草芽孢杆菌出现溶血情况, 分别为菌株 Bs6、Bs7、Bs29 和 Bs31。进一步对枯草芽孢杆菌相关溶血基因进行检测发现, *yhdP*、*yhdT*、*yrkA*、*yqxC*、*yplQ*、*yugS*、*yqhB*、*yjA* 均有检出。溶血表型与检测基因关联分析表明, 未出现溶血现象的枯草芽孢杆菌也含有不同数量的溶血基因, 且产生溶血现象的菌株与其溶血基因携带间无直接相关性。刘杰等<sup>[27]</sup>发现 *yqxC* 可能是引起枯草芽孢杆菌溶血的基因之一。喻江等<sup>[28]</sup>发现敲除 *yplQ*、*yjA* 溶血基因后对菌株的溶血性影响不大。因此不建议将溶血菌株用在养殖过程中, 非溶血菌株更适合用于益生菌<sup>[29]</sup>。目前枯草芽孢杆菌的溶血机制尚不清楚, 还需要进一步研究确定溶血的其他参与者, 以阐明枯草芽孢杆菌溶血的复杂机制。

生物拮抗是在自然条件下达到“以菌治菌”的效果, 从海洋环境中分离出的菌株可以提高对细菌感染的抗病能力<sup>[30]</sup>。枯草芽孢杆菌作为微生态制剂之一, 被广泛应用于水产养殖中。研究表明, 枯草芽孢杆菌具有多重抑菌效果, Cheng 等<sup>[9]</sup>证明枯草芽孢杆菌可以用于预防对虾养殖中的副溶血弧菌和溶藻弧菌。任雨薇<sup>[31]</sup>发现枯草芽孢杆菌可以抑制嗜水气单胞菌。鲁瑞娟<sup>[32]</sup>分离到一株枯草芽孢杆菌对河流弧菌、嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌等 6 种病原菌具有良好抑菌效果。本研究中, 37 株枯草芽孢杆菌均对 2 种及以上病原菌有抑制作用, 有 12 株对副溶血弧菌有抑制作用, 6 株对溶藻弧菌有抑制作用, 23 株对哈维氏弧菌有抑制作用, 28 株对爱德华氏菌有抑制作用, 34 株

对美人鱼发光杆菌有抑制作用, 37 株对假交替单胞菌均有良好的抑制作用, 对 6 种病原菌均具有良好抑菌作用的有 2 株(菌株 Bs4 和 Bs7)。进一步结合药物敏感性、溶血性、蛋白酶和淀粉酶活性、毒力基因携带风险, 筛选出候选益生菌枯草芽孢杆菌菌株 Bs4, 随后通过凡纳滨对虾的安全试验表明, 菌株 Bs4 对凡纳滨对虾具有高安全性, 可作为水产养殖的潜在益生菌菌株。

综上所述, 2009–2021 年从我国海水养殖系统中分离的 37 株枯草芽孢杆菌具有复杂的表型特征, 不同的毒力基因分布, 不同菌株对病原菌的抑制效果存在差异。本研究对水产养殖潜在益生菌深入研究, 并筛选出一株安全无风险的枯草芽孢杆菌, 这对疾病防控及水产养殖产业绿色发展有重要指导意义, 为水产养殖用益生菌制剂的研发提供了数据基础及材料保障。

## REFERENCES

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [2] SANTOS HM, TSAI CY, MAQUILING KRA, TAYO LL, MARIATULQABTIAH AR, LEE CW, CHUANG KP. Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review[J]. Aquaculture International, 2020, 28(1): 169-185.
- [3] AHMADIFAR E, SADEGH TH, DAWOOD MAO, DADAR M, SHEIKHZADEH N. The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquaculture, 2020, 516: 734656.
- [4] DEFOIRD T, SORGELOOS P, BOSSIER P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(3): 251-258.



- [5] RESENDE JA, SILVA VL, FONTES CO, SOUZA-FILHO JA, ROCHA de OLIVEIRA TL, COELHO CM, CÉSAR DE, DINIZ CG. Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system[J]. *Microbes and Environments*, 2012, 27(4): 449-455.
- [6] SELIM KM, REDA RM. Improvement of immunity and disease resistance in the *Nile tilapia, Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 496-503.
- [7] 苏艳丽, 孙盛明, 朱健, 谢骏, 戈贤平. 枯草芽孢杆菌在水产养殖中的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(6): 32-39.  
SU YL, SUN SM, ZHU J, XIE J, GE XP. Advances of *Bacillus subtilis* application in aquaculture[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(6): 32-39 (in Chinese).
- [8] 殷海成, 赵红月, 黄进, 贾峰. 枯草芽孢杆菌对免疫和未免疫黄河鲤鱼免疫功能 and 抗病力的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(7): 1559-1567.  
YIN HC, ZHAO HY, HUANG J, JIA F. Effects of *Bacillus subtilis* on immune function and disease resistance of immunized and unimmunized Huanghe carp (*Cyprinus carpio* Huanghe var.)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(7): 1559-1567 (in Chinese).
- [9] CHENG AC, LIN HL, SHIU YL, TYAN YC, LIU CH. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 270-279.
- [10] SANTOS RA, MONTEIRO M, RANGEL F, JERUSIK R, SAAVEDRA MJ, CARVALHO AP, OLIVA-TELES A, SERRA CR. *Bacillus* spp. inhibit *Edwardsiella tarda* quorum-sensing and fish infection[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(11): 602.
- [11] RAMESH D, SOUISSI S. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* KADR1 and its subcellular components on immune responses and disease resistance in *Labeo rohita*[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 367-377.
- [12] STENFORS ARNESEN LP, FAGERLUND A, GRANUM PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(4): 579-606.
- [13] WANG YG, LEE KL, NAJIAH M, SHARIFF M, HASSAN MD. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 41(1): 9-18.
- [14] 杨泽禹, 廖梅杰, 王印庚, 张正, 韦信贤, 李彬, 荣小军. 地榆醇提取物对对虾致病菌 VP<sub>AHPND</sub> 生长影响及最适内参基因的筛选[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 150-158.  
YANG ZY, LIAO MJ, WANG YG, ZHANG Z, WEI XX, LI B, RONG XJ. Effects on the growth of shrimp pathogen VP<sub>AHPND</sub> and selection of suitable reference genes under different concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. alcoholic extracts[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 150-158 (in Chinese).
- [15] 王凯, 于永翔, 张正, 王印庚, 廖梅杰. 黄连素对海水病原菌的杀灭效果及药效稳定性[J]. *水产科学*, 2019, 38(1): 67-72.  
WANG K, YU YX, ZHANG Z, WANG YG, LIAO MJ. Germicidal efficacy and stability of berberine on pathogens in mariculture[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(1): 67-72 (in Chinese).
- [16] 刘潇, 张正, 王丽芳, 于永翔, 王印庚, 廖梅杰, 谢国骊, 邢婧, 张浩, 王凯, 许悦. 海南地区与环渤海湾美人鱼发光杆菌美人鱼亚种水产动物分离株的表型与遗传特征分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(7): 2101-2111.  
LIU X, ZHANG Z, WANG LF, YU YX, WANG YG, LIAO MJ, XIE GS, XING J, ZHANG H, WANG K, XU Y. Phenotypic and genetic diversity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from aquatic animals in Hainan Province and Bohai Sea region[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 2101-2111 (in Chinese).
- [17] FRANKLIN R, COCKERILL I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement[M]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- [18] MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S, HINDLER JF, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST B, PATERSON DL, RICE LB, STELLING J, STRUELENS MJ, VATOPOULOS A, WEBER JT, MONNET DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and*

- Infectious Diseases, 2012, 18(3): 268-281.
- [19] PAN XL, CHEN XZ, SU XY, FENG Y, TAO Y, DONG ZY. Involvement of SpoVG in hemolysis caused by *Bacillus subtilis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 443(3): 899-904.
- [20] HERNANDO-AMADO S, COQUE TM, BAQUERO F, MARTÍNEZ JL. Antibiotic resistance: moving from individual health norms to social norms in one health and global health[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1914.
- [21] MOHAMAD N, AMAL MNA, SAAD MZ, YASIN ISM, ZULKIPLY NA, MUSTAFA M, NASRUDDIN NS. Virulence-associated genes and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* spp. isolated from cultured marine fishes in Malaysia[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 176.
- [22] YU YX, LIU X, WANG YG, LIAO MJ, TANG MM, RONG XJ, WANG CY, LI B, ZHANG Z. Antimicrobial resistance and genotype characteristics of *Vibrio scopthalmi* isolated from diseased mariculture fish intestines with typical inter-annual variability[J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 924130.
- [23] KANG H, YU YX, LIAO MJ, WANG YG, YANG GP, ZHANG Z, LI B, RONG XJ, WANG CY. Physiology, metabolism, antibiotic resistance, and genetic diversity of Harveyi clade bacteria isolated from coastal mariculture system in China in the last two decades[J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 932255.
- [24] 樊丹, 邓福容, 李绍戊, 卢彤岩, 刘红柏, 王荻. 一株虹鳟源枯草芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(2): 41-49.
- FAN D, DENG FR, LI SW, LU TY, LIU HB, WANG D. Isolation, identification and biological characterization of a *Bacillus subtilis* strain from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition), 2022, 52(2): 41-49 (in Chinese).
- [25] 窦春萌, 左志晗, 刘逸尘, 张亦陈, 耿绪云, 孙金生. 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.
- DOU CM, ZUO ZH, LIU YC, ZHANG YC, GENG XY, SUN JS. Isolation and screening of digestive enzyme producing probiotics from intestine of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(4): 537-546 (in Chinese).
- [26] 王成强, 王际英, 黄炳山, 李宝山. 珍珠龙胆石斑鱼肠道枯草芽孢杆菌的分离鉴定及产酶能力分析[J]. 渔业研究, 2019, 41(5): 366-373.
- WANG CQ, WANG JY, HUANG BS, LI BS. Study on *Bacillus subtilis* from hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) intestine and its zymogenicities[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(5): 366-373 (in Chinese).
- [27] 刘杰, 张琼, 房春红. 枯草芽孢杆菌溶血相关基因 *yqxC* 的表达及功能鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(11): 145-150.
- LIU J, ZHANG Q, FANG CH. Expression and functional characterization of a hemolysis-associated gene *yqxC* from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(11): 145-150 (in Chinese).
- [28] 喻江, 范国权, 李璐, 王旭达, 李琬, 李景鹏. 枯草芽孢杆菌 224 *yplQ* 基因敲除及其对溶血性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(7): 74-78.
- YU J, FAN GQ, LI L, WANG XD, LI W, LI JP. Knockout of *yplQ* gene in *Bacillus subtilis* 224 and influence on hemolysis[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(7): 74-78 (in Chinese).
- [29] NANDI A, DAN SK, BANERJEE G, GHOSH P, GHOSH K, RINGØ E, RAY AK. Probiotic potential of autochthonous bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2017, 9(1): 12-21.
- [30] ZHOU SX, XIA Y, ZHU CM, CHU WH. Isolation of marine *Bacillus* sp. with antagonistic and organic-substances-degrading activities and its potential application as a fish probiotic[J]. Marine Drugs, 2018, 16(6): 196.
- [31] 任雨薇. 枯草芽孢杆菌对嗜水气单胞菌毒力的影响以及群体感应基因 *luxS* 的表达[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017.
- REN YW. The influences of *Bacillus subtilis* on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and the expression of quorum sensing *luxS* gene[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [32] 鲁瑞娟. 一株水产用益生芽孢杆菌的筛选及益生特性研究[D]. 洛阳: 河南科技大学硕士学位论文, 2019.
- LU RJ. Screening and probiotic characteristics of a probiotic *Bacillus* strain for aquatic products[D]. Luoyang: Master's Thesis of Henan University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).