

自制环保酵素对水产病原菌的抑制效果及其发酵菌株的分离鉴定

王 洋, 赵 井, 王竞儒, 罗云龙, 刘 颖, 白东清, 邵 蓬, 李语涵

(天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要: 为探讨自制环保酵素对水产病原微生物的抑制作用, 该研究对其发酵菌株进行了分离。通过比浊法和平板划线法, 确定自制环保酵素对水产病原微生物坎氏弧菌 SP-1 (*Vibrio campbellii* SP-1)、哈维氏弧菌 SP-1 (*V. harveyi* SP-1)、轮虫弧菌 SP-1 (*V. rotiferianus* SP-1) 和嗜水气单胞菌 245 (*Aeromonas hydrophila*) 的最低抑制浓度分别是体积分数为 11.5%、11%、6.2% 和 11%, 最小杀菌浓度分别是体积分数为 16%、16%、16% 和 12%。攻毒保护试验表明, 自制环保酵素无菌上清液可使嗜水气单胞菌对斑马鱼 (*Danio rerio*) 的致死率降低 (90.5±6.49) %。pH、温度、蛋白酶敏感性试验显示自制环保酵素的主要抗菌活性物质为酸性物质, 对加热和蛋白酶处理稳定。进一步从环保酵素中分离主要发酵菌株, 通过 ITS 序列分析鉴定为库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*)。研究结果可为自制环保酵素在水产养殖中对抗细菌性疾病的应用提供理论基础。

关键词: 环保酵素; 抑菌作用; 水产病原菌; 毕赤酵母

中图分类号: S 943

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Inhibitory activity of home-made garbage enzyme against aquatic pathogens and isolation and identification of its fermentation strains

WANG Yang, ZHAO Jing, WANG Jingru, LUO Yunlong, LIU Ying, BAI Dongqing, SHAO Peng, LI Yuhan

(College of Fisheries, Tianjin Agricultural University/Tianjin Key Laboratory of Aqua-ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to evaluate the inhibitory activity of home-made garbage enzyme against aquatic pathogens and to isolate their fermentation strains, we determined the minimum inhibitory concentrations of the home-made garbage enzyme on the aquatic pathogenic microorganisms *Vibrio candida* SP-1, *V. harveyi* SP-1, *V. rotiferianus* SP-1 and *Aeromonas hydrophila* 245 as 11.5%, 11%, 6.2% and 11% in volume fraction by turbidimetric method. The minimum bactericidal concentrations were determined as 16%, 16%, 16% and 12% in volume fraction by flat line scribing method. The challenge test proves that the supernatant of home-made garbage enzyme decreased (90.5±6.49) % of the mortality in zebrafish induced by *A. hydrophila*. The sensitivity tests of pH, temperature and protease prove that the main antibacterial active substances of home-made garbage enzyme were acidic substances that were stable to heating and protease treatment. Furthermore, the primary fermentation strain was separated from the garbage enzyme and identified as *Pichia kudriavzevii* by ITS sequence analysis. The results provide a theoretical basis for applying home-made garbage enzyme in combating bacterial diseases in aquaculture.

Key words: Garbage enzyme; Antibacterial effect; Aquatic pathogens; *Pichia kudriavzevii*

收稿日期: 2020-05-11; 修回日期: 2020-07-14

资助项目: 国家自然科学基金青年项目 (31702360); 天津市科技计划项目 (18YFZCNC01190); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201910061016)

作者简介: 王 洋 (1986—), 女, 博士, 讲师, 从事水产微生物研究。E-mail: 474221161@qq.com

通信作者: 白东清 (1970—), 女, 博士, 教授, 从事水产动物营养与饲料科学研究。E-mail: baidongqing@tjau.edu.cn

环保酵素起源于泰国, 2006年由Rosukon博士利用有机固体废物开发获得。环保酵素是由废弃水果或其果皮、蔬菜、糖(白糖、红糖或蜜糖)和水发酵而成^[1], 为复杂的多物质混合体系, 包含水、发酵菌、蛋白质(酶)、有机酸和无机盐等^[2]。其中, 发酵菌种的差异会导致酵素成分的不同, 这也是酵素值得深入研究的原因之一。环保酵素具有较高的酶活性和抑菌性, 在农业研究中发现, 环保酵素可作为有机肥料^[3-4], 作物土质改良剂^[5], 蔬菜病害^[6]、虫害^[7]防治剂等。在水产养殖中, 具有促进有益藻类生长^[3]、降低养殖污泥中有机物含量^[8-9]、改善养殖水质^[10]、提高水产动物饲料利用率^[4]和增强养殖动物免疫力^[11]等作用。近年来, 环保酵素的应用范围仅局限于马来西亚、日本及中国台湾地区, 而中国大陆地区尚未广泛推行, 应用方面的报道甚少^[12]。对于将环保酵素作为水产病原微生物抑制剂相关方面的研究则更为匮乏。

细菌性疾病一直是制约水产养殖业健康和可持续发展的关键因素之一, 许多水生微生物如嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[13]、维氏气单胞菌(*A. veronii*)^[14]、坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)^[15-17]、轮虫弧菌(*V. rotiferianus*)^[18]、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[19]、副溶血弧菌(*V. parahemolyticus*)^[20]、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)^[21-22]等均可引起水产动物患病, 严重者还可致其死亡。目前, 抗生素、化学药物仍然是治疗水产动物细菌病的最有效措施, 然而由于养殖经济动物体内的药物残留及病原菌耐药性问题, 寻找抗生素及化学药物的安全替代品已成为治疗水产动物细菌病的重要课题。环保酵素中存在大量的酶、益生菌、有机酸等物质, 具有抑制水产病原菌的潜力, 因此, 开展环保酵素对水产病原菌的控制研究十分必要。

本文旨在探讨自制环保酵素对弧菌科4种主要水产病原菌(坎氏弧菌 SP-1、哈维氏弧菌 SP-1、轮虫弧菌 SP-1 及嗜水气单胞菌 245)的体外抑制作用, 初步确定所用的自制环保酵素在抑菌过程中发挥抑菌功能的主要物质。用自制环保酵素短时间药浴的方式评估其对嗜水气单胞菌攻毒斑马鱼(*Danio rerio*)的保护效果, 分离并鉴定发酵后期自制环保酵素中的优势发酵菌株, 为环保酵素的标准化生产及其在水产养殖中的推广应用提

供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

水产病原菌: 坎氏弧菌 SP-1、哈维氏弧菌 SP-1、轮虫弧菌 SP-1、嗜水气单胞菌 245 均分离自天津地区发病鱼, 经过 16S rRNA 基因序列信息鉴定, 保存于天津市水产生态及养殖重点实验室。细菌培养材料: 卢里亚·伯特尼(Luria-Bertani, LB)肉汤、LB琼脂、酵母浸出粉胨葡萄糖(Yeast extract peptone dextrose, YPD)肉汤、YPD琼脂购自北京陆桥技术股份有限公司。自制环保酵素采用萎蔫枯黄但未腐烂的清洁蔬菜、水果, 在可排气发酵桶中自然发酵 12 个月制成。试验用斑马鱼购自天津市西青区张家窝镇水族市场。

多功能酶标仪(4MK2, 赛默飞世尔科技有限公司 Thermofisher); 高速冷冻离心机(YZB/GER 1841-2014, Thermofisher)。

1.2 试验方法

1.2.1 最小抑菌浓度 取环保酵素的上清液, 以 0.22 μm 无菌滤膜过滤去除酵素中的微生物, 制备无菌酵素上清液。采用 96 孔板比浊法, 将 4 株对数末期病原菌以 1% 接种量分别接种至 LB 液体培养基[初始浓度为 $(1\sim3)\times 10^7$ CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$]。添加不同浓度的无菌酵素上清液使其终体积分数介于 2%~14%, 以在 LB 液体培养基中加入与环保酵素同等体积生理盐水的样品作为空白对照组。30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h, 以多功能酶标仪测定 OD₆₀₀ 值, 与未接种微生物的培养基(含相同浓度酵素)相比, 以 OD 值不增加的最低酵素浓度作为最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.2 最小杀菌浓度 将 4 株对数末期病原菌以 1% 接种量分别接种至 LB 液体培养基[初始浓度为 $(1\sim3)\times 10^7$ CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$]。在各病原菌培养液中添加不同体积分数的酵素无菌上清液, 使其终体积分数介于 10%~17%, 加入同等体积生理盐水作为对照组。4 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h, 吸取 10 μL 处理液在 LB 固体平板上划线, 培养 24 h 后观察是否有菌落出现, 以没有菌落出现的最低酵素体积分数为最低杀菌浓度(MBC)。

1.2.3 病原菌攻毒与酵素保护 使用嗜水气单胞菌 245 对斑马鱼进行浸泡攻毒, 以自制酵素对斑马

鱼进行攻毒保护。试验分为对照组、攻毒组与酵素处理组, 每组 3 个平行, 每个平行组有 7 尾体型相近的健康斑马鱼 [体质量 (437±16) mg]。对照组使用无菌水养殖, 攻毒组使用嗜水气单胞菌 245 (1×10^9 CFU·mL⁻¹) 浸泡; 各组在处理 12 h 后, 均将养殖用水更换为无菌水。酵素处理组在病原菌攻毒 12 h 后, 使用体积分数为 8% 的酵素无菌上清液对斑马鱼药浴 30 min, 其余 2 组在无菌水中处理 30 min。药浴结束后, 各组均再次更换无菌水, 禁食暂养。然后开始记录斑马鱼的存活情况, 24 h 后统计各组斑马鱼的总体死亡率。

1.2.4 自制环保酵素活性成分的初步判断 温度敏感性试验: 将自制酵素无菌上清液分别在 60、80、100、121 °C 下加热 30 min, 冷却至室温; pH 敏感性试验: 以 1 mol·L⁻¹ NaOH 和 1 mol·L⁻¹ HCl 无菌溶液将自制酵素无菌上清液 pH 分别调至 5.0、6.0、7.0、8.0; 蛋白酶敏感性试验: 将 2 g·L⁻¹ 的胃蛋白酶溶液以 1:1 比例加入自制酵素无菌上清液, 37 °C 静置 1 h; 以未经任何处理的自制酵素无菌上清液作为对照, 以 96 孔板生长抑制法检测上述处理对自制酵素抑菌活性的影响。

1.2.5 发酵菌株的分离和鉴定 将少量酵素分别在 LB 固体培养基、YPD 固体培养基上均匀涂布, 培养 24 h 后挑取菌落, 采用划线法纯化。记录菌落形态并用光学显微镜观察菌体形态。提取菌种 DNA, 扩增并测定其 ITS1-ITS4 的 DNA 序列, 构建菌株系统发育树。

1.3 数据处理

试验数据采用 Excel 2010 软件计算数据的标准偏差; 用 Origin 8.0 软件绘图; 通过 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析 (SNK, $\alpha=0.05$ 或 0.01)。每项实验重复 3 次, 每次重复包含至少 3 个平行。

表1 自制环保酵素无菌上清液对水产病原菌的致死作用

Table 1 Lethal effects of sterile supernatant of home-made garbage enzyme against aquatic pathogens

病原菌 Pathogen	酵素体积分数 Enzyme volume fraction/%												
	17.0	16.5	16.0	15.5	15.0	14.5	14.0	13.5	13.0	12.5	12.0	11.0	10.0
嗜水气单胞菌 245 <i>A. hydrophila</i> 245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
轮虫弧菌 SP-1 <i>V. rotiferianus</i> SP-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
哈维氏弧菌 SP-1 <i>V. harveyi</i> SP-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
坎氏弧菌 SP-1 <i>V. candida</i> SP-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +. 平板上有菌落生长; -. 无菌落

Note: +. Growth of bacterial colony on agar; -. No colony

2 结果

2.1 自制环保酵素对水产病原菌的最低抑制浓度

自制酵素无菌上清液对 4 种病原菌的生长抑制作用见图 1。低浓度酵素对菌体生长无明显的抑制作用, 但随着酵素浓度提高, 细菌培养液吸光值迅速降低, 表明高浓度酵素可明显抑制菌群生长。不同指示菌开始出现生长抑制的酵素浓度不同, 轮虫弧菌 SP-1 对酵素最敏感, 哈维氏弧菌 SP-1 和坎氏弧菌 SP-1 其次, 嗜水气单胞菌 245 最低。自制酵素无菌上清液对轮虫弧菌 SP-1、坎氏弧菌 SP-1、嗜水气单胞菌 245 及哈维氏弧菌 SP-1 的 MIC 分别是体积分数为 6.2%、11.5%、11% 和 11% 的酵素。

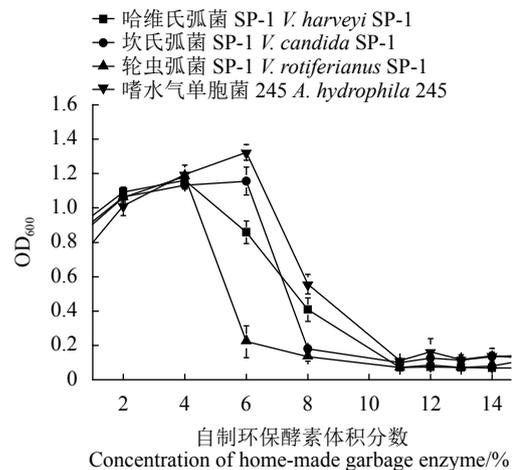


图1 环保酵素无菌上清液对水产病原菌的生长抑制作用
Figure 1 Inhibitory activity of sterile supernatant of garbage enzyme against aquatic pathogens

2.2 自制环保酵素对病原菌的最小杀菌浓度

自制酵素无菌上清液对轮虫弧菌 SP-1、哈维氏弧菌 SP-1、嗜水气单胞菌 245 及坎氏弧菌 SP-1 的致死作用见表 1。自制酵素对嗜水气单胞菌 245 的致死作用较强, 最小致死浓度是体积分数为

12.0% 的酵素。酵素对轮虫弧菌 SP-1、坎氏弧菌 SP-1 和哈维氏弧菌 SP-1 的致死能力稍弱, 最小致死浓度是体积分数为 16.0% 的酵素。

2.3 环保酵素对嗜水气单胞菌感染斑马鱼的保护作用

空白对照组斑马鱼在试验期间死亡率为 0。嗜水气单胞菌 245 对斑马鱼的致死率较高, 试验鱼用 1×10^9 CFU·mL⁻¹ 的嗜水气单胞菌浸泡攻毒 12 h, 换水移除病原菌后 24 h 内全部死亡 (图 2)。使用 8% 自制酵素药浴 30 min 能够显著降低嗜水气单胞菌攻毒斑马鱼的死亡率 [(9.5±6.49)%]。与攻毒组相比, 酵素药浴使嗜水气单胞菌对斑马鱼的致死率显著降低了 [(90.5±6.49)%], $P < 0.01$ 。

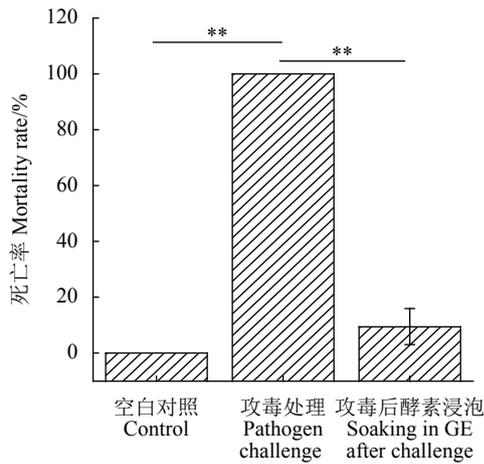


图2 自制环保酵素无菌上清液对嗜水气单胞菌攻毒斑马鱼的保护作用

** 组间数据有显著差异 ($P < 0.01$)

Figure 2 Protective effect of sterile supernatant of home-made garbage enzyme on *Danio rerio* challenged with *A. hydrophila*

** Very significant difference between different columns ($P < 0.01$).

2.4 自制环保酵素的抗菌活性成分敏感性

为分析自制酵素中的有效作用物质, 本研究考察了酵素在不同 pH、温度下, 以及在蛋白酶处理后抑菌效果的变化 (图 3)。在不同温度处理下 (图 3-a), 酵素对 4 种病原菌的抑制率无显著变化 ($P > 0.05$), 表明抑菌物质的热稳定性高。蛋白酶处理未影响酵素对 4 种病原菌的抑菌率 (图 3-b), 表明酵素中未含有抑制 4 种指示菌的蛋白质或肽类物质。将 pH 从酵素的原始 pH (4.0) 调节至接近中性的过程中, 抑菌率逐渐下降 (图 3-c); 当 pH 为 8 时, 酵素对哈维氏弧菌 SP-1 和嗜水气单胞菌 245 完全失去抑菌活性, 但对轮虫弧菌 SP-1 和坎氏弧菌 SP-1 仍有部分抑菌活性。结果表明自制酵素对

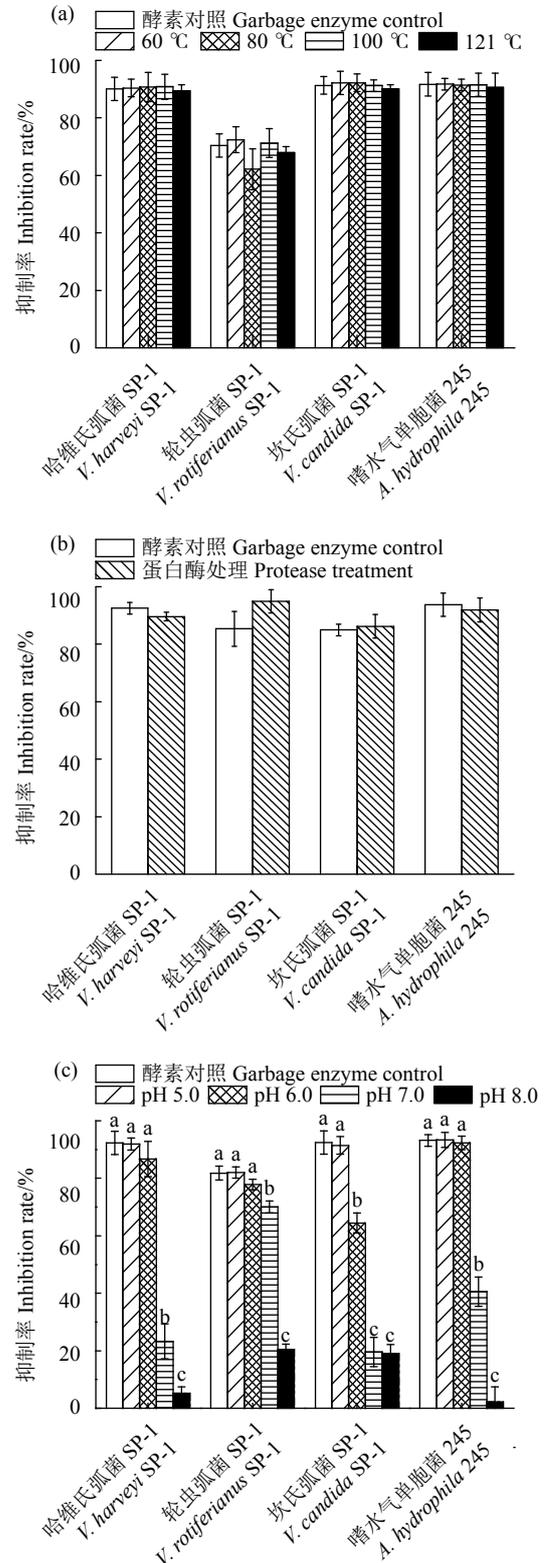


图3 不同温度 (a)、蛋白酶 (b) 和 pH (c) 处理后对酵素的抑菌效果

不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)

Figure 3 Effect of heating (a), protease (b) and pH (c) on inhibitory activity of home-made garbage enzyme against aquatic pathogens

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

水产病原菌的抑制作用存在低 pH 依赖性, 抑菌活性成分主要为酸性物质或在酸性条件下发挥作用。

2.5 环保酵素中发酵菌株的分离和鉴定

为得到抑菌活性物质的产生菌, 同时为环保酵素的标准化生产提供发酵菌株, 从自制酵素中分离

得到 1 株酵母菌, 命名为 bj001。菌株 bj001 在 YPD 培养基上呈乳白色, 菌落大而厚、呈圆形、光滑湿润有黏性, 易被挑起 (图 4-a)。光学显微镜下观察 bj001 菌体形态为香肠状, 宽度 2~3 μm , 长度 5~10 μm (图 4-b)。

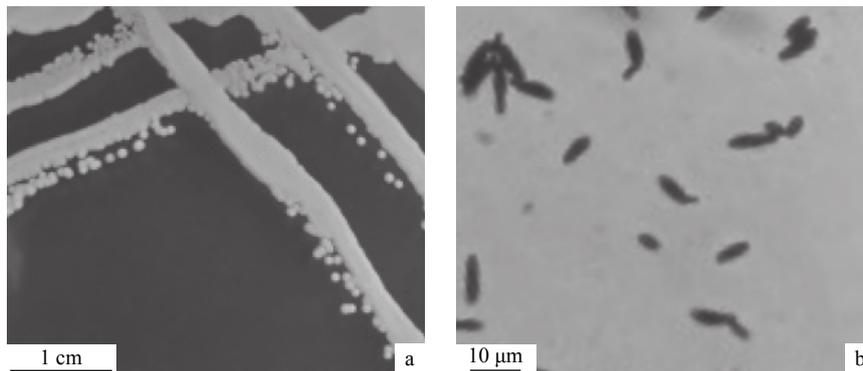


图4 自制环保酵素发酵菌株bj001的菌落和菌体形态

a. bj001 菌落形态; b. bj001 菌体在光学显微镜下的形态 (放大倍数 10×100)

Figure 4 Colony and cell morphology of fermentation strain bj001 from home-made garbage enzyme

a. Colony morphology of bj001; b. Morphological characteristics of bj001 cells under light optical microscope (Magnification 10×100)

提取 bj001 酵母的基因组, 扩增并测定 ITS1~ITS4 的 DNA 序列信息, 与美国国家生物信息中心 (NCBI) 数据库中已发表的序列进行同源性比对, 并依据 ITS1~ITS4 序列同源性建立系统发育树。结果表明 bj001 菌株与毕赤酵母属的库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 菌株 AUMC 10709、CY902、GY1 同源性最高, 与库德毕赤酵母菌株 ATCC 6258 同源性次之 (图 5)。因此鉴定菌株 bj001 为库德毕赤酵母, 并命名为库德毕赤酵母 bj001。

3 讨论

3.1 酵素的抑菌能力

本研究证明了自制酵素对多株水产革兰氏阴性病原菌有良好的抑制和杀灭作用, 对坎氏弧菌 SP-1、哈维氏弧菌 SP-1、轮虫弧菌 SP-1 和嗜水气单胞菌 245 的 MIC 分别是体积分数为 11.5%、11%、6.2% 和 11% 的酵素, MBC 分别是体积分数为 16%、16%、16% 和 12% 的酵素。酵素的抑菌能力在其他研究中也有报道, 如董银卯等^[23] 研究显示, 2% 的膏状酵素对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的抑制率分别为 19.21%、33.2%、38.01%。红茶菌酵素对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有较强的抑制能力^[24]。青梅酵素

对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 有良好的抑制效果^[25]。Neupane 和 Khadka^[26] 利用番木瓜 (*Carica papaya*)、复合水果以及蔬菜制备的不同酵素, 对金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌、志贺氏菌 (*Shigella Castellani*)、铜绿假单胞菌、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 以及大肠杆菌均有不同程度的抑制作用; 这些均与本研究结果相似, 证明酵素对致病菌的广泛抑制潜力。本研究仅考察了自制酵素对水产养殖中 4 种革兰氏阴性病原菌的抑制效果。由于各研究所用的指示菌不同, 因此无法准确比较研究中酵素抑菌性能的高低。

此外, 本研究所采用的自制环保酵素还可作为药物通过短暂药浴来发挥抑菌功效, 显著降低嗜水气单胞菌攻毒斑马鱼的致死率。嗜水气单胞菌是造成水产动物细菌性疾病的重要病原菌之一, 毒性菌株在感染水产动物后往往发病快、死亡率高^[27], 且多数嗜水气单胞菌有很强的广谱耐药性^[28], 难以控制。本研究采用体积分数为 8% 自制环保酵素无菌上清液浸泡 30 min, 可以使嗜水气单胞菌对斑马鱼的致死率降低 (90.5±6.49)%。可见本研究的自制环保酵素有作为药物治疗水产动物嗜水气单胞菌病的潜力。

3.2 酵素的抑菌活性物质

本研究发现自制环保酵素的自然 pH 约 4.0,

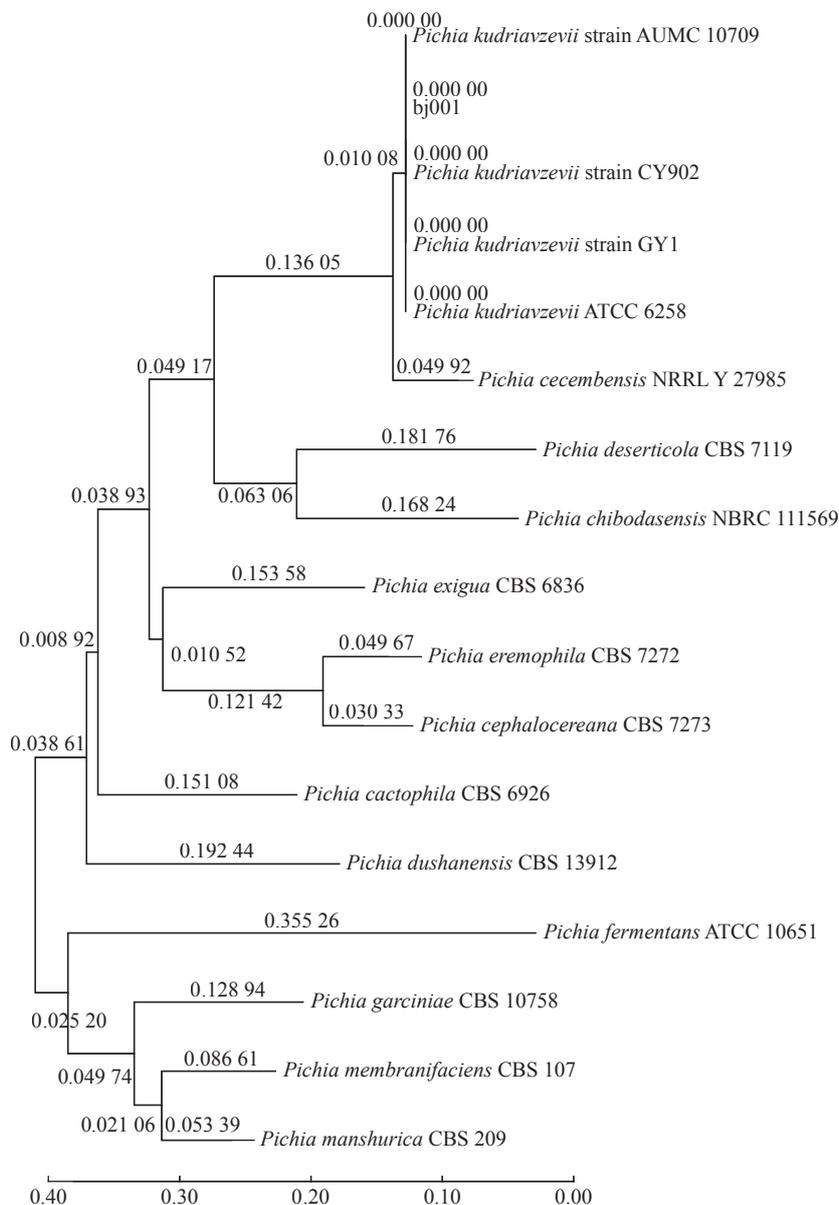


图5 基于ITS序列构建的库德毕赤酵母bj001系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of *P. kudrii* bj001 constructed based on ITS sequence

且抑菌活性主要依赖于低 pH，耐热性好且对蛋白酶不敏感，表明其主要抑菌活性成分是非蛋白类酸性物质。根据报道，可以推测自制环保酵素中的有效抑菌成分为混合的有机酸；有机酸对各类微生物具有广谱抑制能力^[29]。据报道，以果蔬制备的酵素中含有丰富的有机酸，黑加仑酵素的总酸质量浓度可达 $26.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，主要为柠檬酸、苹果酸、草酸、奎宁酸和莽草酸^[30]。蒋增良^[31]测定的以树莓、蓝莓和葡萄为原料制备的天然酵素中有机酸包括酒石酸、莽草酸、乙酸和柠檬酸、丙酮酸等；张梦梅等^[32]检测到市售酵素产品中的有机酸为草酸、苹果酸、乳酸和乙酸。这与本研究中自制环保酵素主

要抑菌成分敏感性的研究结果相吻合。进一步精细分析环保酵素中有效抑菌成分的特性及各物质含量，有利于优化酵素的发酵工艺，并确定环保酵素在水产养殖中的应用方式。

3.3 酵素的发酵菌株

酵素的活性物质由发酵剂发酵蔬菜水果原料产生，因此活性成分的含量与发酵剂种类密切相关^[24, 33-35]。果蔬酵素的发酵通常由多种微生物参与，是一个随时间不断变化的复杂多菌发酵过程。目前，酵素的制作过程主要依赖于发酵原料中的野生微生物群落和自然环境温度，发酵过程较为随机^[36-37]，已从微生物酵素中分离纯化得到的发酵菌

主要为酵母菌和醋酸菌^[38]。凌空等^[39]发现主要发酵菌株随着发酵时间而变化, 发酵初期尚有乳酸菌参与, 发酵到18个月时, 果蔬酵素中的发酵菌株为毛榛毕赤酵母 (*P. mandshurica*)。蒋增良^[31]发现发酵12个月的葡萄酵素中主要发酵菌株为季也蒙毕赤酵母 (*P. guilliermondii*)、德巴列汉逊酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 和浅白隐球酵母 (*Cryptococcus albidus*)。杜丽平等^[40]发现参与木瓜酵素发酵的优势微生物有植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、季也蒙毕赤酵母等。魏东东等^[41]在红树莓酵素中分离鉴定到5株主要发酵菌, 包括酿酒酵母、库德毕赤酵母、盔形毕赤酵母 (*P. manshurica*) 及植物乳杆菌。本研究中, 在自制环保酵素发酵后期(12个月)分离到一株优势发酵菌株, 经ITS序列和系统发育树结果鉴定为库德毕赤酵母, 证实了酵素发酵后期以酵母菌为优势菌。进一步评估该菌株的特性以及制备酵素的能力, 可以为高稳定性和高活性酵素的制备提供理论依据。

4 结论

自制果蔬环保酵素表现出对水产革兰氏阴性病原微生物较强的体外抑制和致死作用, 并能大幅降低由嗜水气单胞菌攻毒所造成的斑马鱼死亡。对自制环保酵素中抑菌活性物质的初步分析表明, 其主要抑菌活性依赖于酸性物质或酸性环境, 有较好的热稳定性, 对蛋白酶不敏感。自制果蔬环保酵素发酵后期主要存活的活性发酵菌为库德毕赤酵母, 该菌株有作为酵素发酵剂的潜力。

参考文献:

[1] ARUN C, SIVASHANMUGAM P. Investigation of biocatalytic potential of garbage enzyme and its influence on stabilization of industrial waste activated sludge[J]. Process Saf Environ Prot, 2015, 94: 471-478.

[2] RASIT N, KUAN O C. Investigation on the influence of bio-catalytic enzyme produced from fruit and vegetable waste on palm oil mill effluent[J]. Environ Earth Sci, 2018, 140(1): 12-15.

[3] 杨涛, 徐维烈. 酵素菌生物有机肥在水产养殖上的应用研究[J]. 河北渔业, 2007(1): 42-44.

[4] 王涛, 王安华. 酵素菌技术主养花鲢示范基地效果初报[J]. 渔业致富指南, 2007(15): 69-70.

[5] 李方志, 王殷, 李丝丝, 等. 环保酵素对土壤钾素的改良效果[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 168-169.

[6] 朱丽梅, 刘艳芝, 王淑霞, 等. 环保酵素防治3种蔬菜病害的初

步研究[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(5): 40-41.

[7] 王丽丽, 湛江华, 柴伟纲, 等. 7种生物酵素对病虫害的室内防治作用初探[J]. 浙江农业科学, 2014(8): 1209-1211.

[8] RASIT N, HWE FERN L, AB KARIM GHANI W A W. Production and characterization of eco-enzyme produced from tomato and orange wastes and its influence on the aquaculture sludge[J]. Int J Civ Eng Technol, 2019, 10(3): 14-30.

[9] RASIT N, MOHAMMAD F S. Production and characterization of bio catalytic enzyme produced from fermentation of fruit and vegetable wastes and its influence on aquaculture sludge[J]. Int J Sci Technol, 2018, 4(2): 12-26.

[10] 杨铿, 蒋魁, 洪敏娜, 等. 活性酵素对工厂化养殖凡纳滨对虾生长及水质的影响[J]. 中国渔业质量与标准, 2019, 9(3): 1-8.

[11] 杨涛. 应用酵素菌技术实现健康生态养虾[J]. 渔业致富指南, 2007(13): 66-67.

[12] 倪兆林. 环保酵素对洱海微囊藻的降解作用及初步应用研究[D]. 大理: 大理学院, 2014: 9.

[13] VIJI V T, DEEPA K, VELMURUGAN S, et al. Vaccination strategies to protect goldfish *Carassius auratus* against *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Dis Aquat Org, 2013, 104(1): 45-57.

[14] RAHMAN M, COLQUE-NAVARRO P, KÜHN I, et al. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(2): 650-655.

[15] ALSINA M, BLANCH A R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species[J]. J Appl Bacteriol, 1994, 76(1): 79-85.

[16] 陈梅, 王奎旗, 徐怀恕. 山东近海主要养殖动物的弧菌检测与病害防治的研究[J]. 齐鲁渔业, 2000, 17(6): 6-8.

[17] 许兵, 纪伟尚, 徐怀恕. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究[J]. 海洋学报, 1993, 15(1): 98-106.

[18] 陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鳎病原菌轮虫弧菌 (*Vibrio rotiferianus*) 的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2012, 6: 147-153.

[19] KIM K H, HWANG Y J, KIM K W, et al. Effects of dietary aloe on chemiluminescent responses of peripheral blood phagocytes and resistance against *Edwardsiella tarda* Ewing and McWhorter 1965 in the cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)[J]. Aquacult Res, 2002, 33(2): 147-150.

[20] 徐海圣, 徐步进. 蟹源副溶血弧菌胞外蛋白酶的纯化与特性分析[J]. 大连海洋大学学报, 2008, 23(4): 247-251.

[21] LIU P C, LEE K K, YII K C, et al. News & notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*[J]. Curr Microbiol, 1996, 33(2): 129-132.

[22] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.

[23] 董银卯, 于晓艳, 潘妍, 等. 微生物酵素抑菌功效研究[J]. 香料香精化妆品, 2008(4): 27-29.

[24] 张虎成, 范海涛, 杨国伟, 等. 红茶菌发酵液抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 890-891.

[25] 王辉, 马秀敏, 张鹰. 青梅酵素的生物活性及体外抑菌作用[J].

- 食品工业科技, 2018, 39(12): 39-43.
- [26] NEUPANE K, KHADKA R. Production of garbage enzyme from different fruit and vegetable wastes and evaluation of its enzymatic and antimicrobial efficacy[J]. Tribhuvan Univ J Microbiol, 2019, 6(1): 113-118.
- [27] 孙智武, 黄燕华, 曹俊明, 等. 硫酸安普霉素对嗜水气单胞菌体外抑菌和体内抗感染研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(5): 33-37.
- [28] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 306-310.
- [29] RICKE S C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials[J]. Poultry Sci, 2003, 82(4): 632-639.
- [30] 樊秋元, 朱丹, 牛广财, 等. 黑加仑酵素有机酸分析及其体外抗氧化性能研究[J]. 中国酿造, 2019, 31(5): 159-163.
- [31] 蒋增良. 天然微生物酵素发酵机理, 代谢过程及生物活性研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2013: 47-52.
- [32] 张梦梅, 刘芳, 胡凯弟, 等. 酵素食品微生物指标与主要功效酶及有机酸分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 195.
- [33] 赵光远, 梁晓童, 陈美丽, 等. 红枣酵素饮料的研制[J]. 食品工业, 2015, 36(9): 124-128.
- [34] 董银卯, 何聪芬, 王领, 等. 火龙果酵素生物活性的初步研究[J]. 食品科技, 2009, 34(3): 192-196.
- [35] 郭爽. 敖东酵素保健功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 7-15.
- [36] 晏殊. 水果酵素自然发酵中优势菌株的分离鉴定及其代谢产物功效特性的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019: 8-18.
- [37] 段晓玲, 王金玲, 吕长山. 树莓果酒酿造酵母的分离、筛选[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 84-88.
- [38] 蒋立文. 红茶菌优势微生物的分离、鉴定及抗菌机理的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007: 13-41.
- [39] 凌空, 周明, 陆路, 等. 果蔬酵素不同发酵周期中微生物的分离鉴定[J]. 中国食品添加剂, 2018, 6(7): 39-45.
- [40] 杜丽平, 刘艳, 焦媛媛, 等. PCR-DGGE 分析木瓜酵素自然发酵过程中微生物的多样性[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 80-87.
- [41] 魏东东, 常曼曼, 阴芳冉, 等. 红树莓酵素发酵过程中优势菌株的分离鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(6): 52-56.