

· 论 著 ·

秀丽隐杆线虫模型评估威尼斯不动杆菌的致病性

李煜^{1,2}, 王雪岩², 胡晓珂³, 杨梦迪¹, 罗环¹, 梁婧¹, 李隆飞¹, 赵金萍¹, 毕洁¹, 陈斌¹, 王如刚¹

1. 北京市疾病预防控制中心职业健康体检中心, 北京 100020; 2. 首都医科大学公共卫生学院;
3. 中国科学院烟台海岸带研究所海岸带生物学与生物资源利用重点实验室

摘要: **目的** 应用秀丽隐杆线虫模型评估可能用作环境修复剂的威尼斯不动杆菌 (Av) 的致病性。**方法** 分别在铺有大肠杆菌 OP50 和 Av 的培养基上培养秀丽隐杆线虫, 通过观察秀丽隐杆线虫的发育、运动、消化功能、寿命和繁殖能力评估 Av 致病性; 同时按照 NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》进行 Av 致病性试验, 比较两种方法的评估结果。**结果** 应用秀丽隐杆线虫模型发现, Av 组与 OP50 组成年秀丽隐杆线虫的体长、体宽、头部摆动频率和身体弯曲频率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); Av 组平均排便循环时间缩短 ($P < 0.05$); Av 组和 OP50 组线虫的生存曲线基本重合, 平均寿命分别为 (13.5 ± 0.4) d 和 (13.7 ± 0.4) d, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Av 组后代总数比 OP50 组增加了 18.7%。NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》评估体系发现, 雌性、雄性小鼠急性经口 LD_{50} 均 > 10 g/kgbw, 属实际无毒; 急性腹腔注射致病性试验结果显示动物未出现中毒体征及死亡, 大体解剖未见异常; Av 对家兔破损皮肤和眼均为无刺激性; 溶血试验结果为阴性; Av 对 7 种不同类别的抗菌药物均敏感, 对 1 种抗菌药物中介。**结论** Av 无致病性; 采用秀丽隐杆线虫模型评价环境修复剂的致病性具有可行性, 可考虑作为致病性评价体系的筛选方案。

关键词: 秀丽隐杆线虫; 威尼斯不动杆菌; 致病性

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2019) 11-1086-05

Evaluation of pathogenicity of *Acinetobacter venetum* by using *Caenorhabditis elegans*

LI Yu*, WANG Xue-yan, HU Xiao-ke, YANG Meng-di, LUO Huan, LIANG Jing, LI Long-fei,
ZHAO Jin-ping, BI Jie, CHEN Bin, WANG Ru-gang

*Occupational Health Examination Center, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100020, China

Abstract: Objective To evaluate the pathogenicity of *Acinetobacter venetum* (Av), which is expected to be used as an environmental remediation agent, using *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). **Methods** The *C.elegans* were cultured on the media loaded with *E.coli* OP50 and Av, respectively. The pathogenicity of Av was evaluated by observing the effects of Av on the growth, movement, digestive function, lifespan and reproduction of *C.elegans*, compared with that of another evaluation system according to NY 1109-2017 *General Biosafety Standard for Microbial Fertilizers*. **Results** By *C. elegans* system, it was found that the body length, width, head thrash frequency, body bending frequency and average lifespan [(13.5 ± 0.4) d vs. (13.7 ± 0.4) d] of adult nematodes in the Av group were not significantly different from those in the OP50 group (all $P > 0.05$); while the average time of defecation cycle in the Av group shortened, the total number of progenies in the Av group increased by 18.7% (all $P < 0.05$). According to NY1109-2017 *General Biosafety Standard for Microbial Fertilizers*, it was found that the oral LD_{50} values for both male and female mice were more than 10 g/kgbw, which was practically non-toxic; the pathogenicity test of acute

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.11.002

基金项目: 国家自然科学基金 (41576156); 北京市自然科学基金 (7152024); 北京市委组织部优秀人才培养项目 (2012A003034000014)

作者简介: 李煜, 硕士, 副教授, 主要从事模式生物毒理学和职业健康检测研究工作

通信作者: 王如刚, E-mail: bjedczw@163.com

intraperitoneal injection showed that the animals did not have signs of poisoning, deaths or any abnormalities in gross anatomy; Av had no irritation to damaged skin and eyes of rabbits; the hemolysis test was negative; Av was sensitive to seven antibiotics and was medium to one antibiotic. **Conclusion** Av is not pathogenic. *C. elegans* can be used in early screening for the pathogenicity of environmental remediation agents.

Key words: *Acinetobacter venetum*; *Caenorhabditis elegans*; Pathogenicity

石油在勘探、开采和运输过程中的各种泄露事故造成的环境污染越来越严重。微生物修复技术是指利用土壤中的土著微生物或人工培养的外源微生物的代谢功能,降解污染物或减小污染物活性,使污染的土壤得到修复。威尼斯不动杆菌(*Acinetobacter venetianus*, Av)因其强大的石油降解能力和重要的生态作用引起关注^[1-3],但在使用Av修复污染前,应先评估其致病性,以保护人和环境免受病原微生物的危害。大多数病原菌毒力、致病机制筛选研究使用哺乳动物^[4-6],如NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》^[7]的致病性实验至少需要60只小鼠和3只家兔,但这不符合动物福利法的“3R”原则,因此无脊椎动物替代法日益受到重视。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)具有透明易于观察、生命周期短、培养成本低等优点,作为模式生物在各个领域得到广泛应用,也应用于微生物致病性及机制研究^[8-10]。本研究应用秀丽隐杆线虫模型评估Av的致病性,同时采用NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》^[7]的致病性试验加以验证。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 Av(生化氧化酶阴性,动力阴性,硝酸盐试验阴性)由中国科学院烟台海岸带研究所提供,挑取斜面上少量菌落于LB培养基中,37℃振荡培养24h。金黄色葡萄球菌ATCC 25923和大肠杆菌ATCC 25922购自中国药品生物制品检定所。大肠杆菌OP50和野生型秀丽隐杆线虫N2品系由北京生命科学研究所提供。抗菌药物药敏纸片和MH琼脂培养基购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.2 秀丽隐杆线虫致病性试验 参考文献^[11-12]。

1.2.1 线虫的培养和同步化 在铺有OP50的NGM培养基上20℃培养秀丽隐杆线虫,同步化方法制备L4期线虫。

1.2.2 线虫体长、体宽测定 分别在铺有OP50和Av的NGM培养基上培养L4期线虫1d和3d后,采用Image M2正置显微镜50×拍摄,用Zen pro 2012软件测量线虫的体长和体宽,每组测量20只。

1.2.3 线虫平均排便循环时间测定 分别在铺有OP50和Av的NGM培养基上培养L4期线虫1d和2d后,镜下观察测定线虫的排便循环时间(两次排便间隔时间),每组计数15只。

1.2.4 线虫头部摆动频率和身体弯曲频率测定 方法参考文献^[13],每组计数15只。

1.2.5 线虫后代数目测定 将L4期线虫分别挑入铺有OP50和Av的NGM培养基上,每皿1只,每24h转一次板,直到线虫不再产卵。转板后继续培养2d,计数孵化出来的线虫,计算每只线虫的后代总数目,每组做6个平行。

1.2.6 线虫寿命测定 将L4期线虫分别挑入铺有OP50和Av的NGM培养基上,每皿30只,每组3皿。实验初始记为0d,以后每隔1d观察线虫存活状态,计数死亡和存活的线虫数,计算存活分数,绘制生存曲线,计算并比较OP50组和Av组线虫的平均寿命。

1.3 NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》致病性试验

1.3.1 实验动物及饲养环境 60只清洁级昆明小鼠(军事医学科学院实验动物中心),体重18~22g,雌雄各半;3只普通级新西兰种家兔(北京金牧羊实验动物养殖有限责任公司)。动物生产许可证号:SCXK(京)2015-0005,室温18~26℃,相对湿度40%~70%。

1.3.2 方法 参照NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》^[7]进行急性经口毒性试验(一次最大限量法)、急性腹腔注射致病性试验、一次破损皮肤刺激试验、急性眼刺激试验、溶血试验和抗菌药物敏感试验。用无菌生理盐水调整Av浓度至 2.0×10^8 CFU/mL作为受试物,急性经口毒性试验将受试物作为原液使用,按0.1 mL/10 gbw经口灌胃;急性腹腔注射致病性试验将受试物稀释20倍使用,按0.1 mL/10 gbw腹腔注射。

1.4 统计分析 采用SPSS 19.0软件统计分析。实验结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,Av组和OP50组线虫指标比较采用 t 检验;采用Kaplan-Meier法进行生存分析,Av组和OP50组生存率比较采用

log-rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 秀丽隐杆线虫致病性试验结果

2.1.1 两组秀丽隐杆线虫体长和体宽比较 L4 期线虫分别在铺有 OP50 和 Av 的 NGM 培养基上培养 1 d 后, Av 组线虫的体长小于 OP50 组 ($P < 0.05$), 体宽差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 培养 3 d 后, 线虫进入成年期, Av 组与 OP50 组线虫的体长和体宽差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组秀丽隐杆线虫体长和体宽比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	体长		体宽	
	1 d	3 d	1 d	3 d
OP50 (n=20)	861 ± 44	1 283 ± 67	50.9 ± 2.8	84.5 ± 3.8
Av (n=20)	813 ± 33	1 273 ± 57	50.3 ± 3.3	85.2 ± 3.2
t 值	3.862	0.469	0.698	0.595
P 值	< 0.001	0.642	0.489	0.555

2.1.2 两组秀丽隐杆线虫平均排便循环时间比较 L4 期线虫培养 2 d 后, Av 组线虫的平均排便循环时间较 OP50 组的短 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组秀丽隐杆线虫平均排便循环时间比较($\bar{x} \pm s, \text{s}$)

组别	平均排便循环时间	
	1 d	2 d
OP50 (n=15)	44.9 ± 7.1	51.9 ± 2.9
Av (n=15)	42.1 ± 2.4	46.2 ± 2.4
t 值	1.476	5.945
P 值	0.150	< 0.001

2.1.3 两组秀丽隐杆线虫头部摆动频率和身体弯曲频率比较 L4 期线虫培养 1 d 和 2 d 后, Av 组与 OP50 组线虫的头部摆动频率和身体弯曲频率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.1.4 两组秀丽隐杆线虫寿命比较 Av 组和 OP50 组线虫的生存曲线基本重合, 见图 1。由于线虫逃逸, Av 组和 OP50 组在 3 个皿上的线虫数分别为 80

表 3 两组秀丽隐杆线虫头部摆动频率和身体弯曲频率比较 ($\bar{x} \pm s, \text{次}/20 \text{ s}$)

组别	头部摆动频率		身体弯曲频率	
	1 d	2 d	1 d	2 d
OP50 (n=15)	33.4 ± 2.6	35.3 ± 2.8	10.0 ± 1.7	10.2 ± 1.3
Av (n=15)	31.4 ± 2.3	34.1 ± 3.4	8.9 ± 1.3	10.5 ± 1.4
t 值	2.060	1.100	1.977	0.546
P 值	0.050	0.281	0.059	0.590

只和 87 只。经 log-rank 检验, Av 组和 OP50 组线虫的平均寿命分别为 (13.5 ± 0.4) d 和 (13.7 ± 0.4) d, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.004, P = 0.952$)。

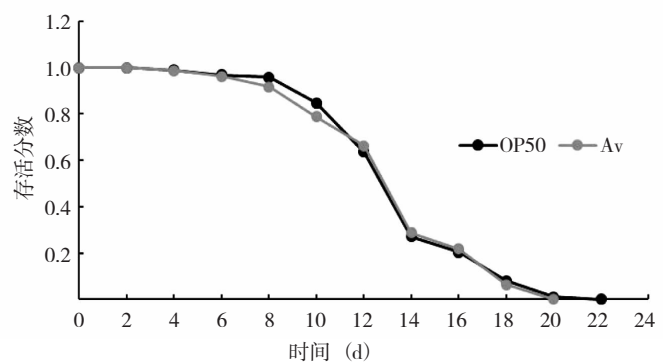


图 1 Av 组和 OP50 组秀丽隐杆线虫的生存曲线

2.1.5 两组秀丽隐杆线虫后代数目比较 Av 组线虫第 1、2 d 产卵后孵出的后代数目及后代总数目均多于 OP50 组 ($P < 0.05$), Av 组后代总数比 OP50 组增加 18.7%。见表 4。

2.2 NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》致病性试验结果

2.2.1 急性经口毒性试验结果 按 10 g/kgbw 对 20 只小鼠 (雌雄各半) 进行经口灌胃染毒试验, 在 14 d 的观察期内, 小鼠生长正常, 未见明显中毒体征, 无死亡。大体解剖未见异常。雌性、雄性小鼠的 LD_{50} 均 $> 10 \text{ g/kgbw}$ 。

2.2.2 急性腹腔注射致病性试验 按 500 mg/kgbw 对 40 只小鼠 (雌雄各半) 进行腹腔注射试验, 在 14 d 的观察期内, 小鼠生长正常, 未见明显中毒体征, 无

表 4 两组秀丽隐杆线虫后代数目比较($\bar{x} \pm s, \text{个}$)

组别	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d	后代总数
OP50 (n=15)	29.0 ± 9.1	195.0 ± 12.7	96.4 ± 9.0	5.2 ± 6.2	1.0 ± 1.0	326.6 ± 19.3
Av (n=15)	50.6 ± 4.6	219.0 ± 15.6	116.4 ± 25.3	2.2 ± 2.5	0.2 ± 0.4	388.4 ± 13.8
t 值	4.729	2.672	1.668	1.001	1.633	5.826
P 值	0.001	0.028	0.134	0.346	0.141	< 0.001

死亡。大体解剖未见异常。

2.2.3 一次破损皮肤刺激试验 家兔背部对照侧和受试物侧皮肤均无红斑及水肿形成。

2.2.4 急性眼刺激试验 家兔对照侧(左)和受试物侧(右)眼均未出现异常。

2.2.5 溶血试验 Av 菌落周围无透明溶血环, 质控菌金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 菌落周围出现透明溶

血环。

2.2.6 抗菌药物敏感试验 质控菌大肠杆菌 ATCC 25922 抑菌环直径均在质控范围内。根据《抗菌药物药敏纸片判断标准》中不动杆菌抑菌环直径判断标准, Av 对氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、左氧沙星、美洛培南、庆大霉素、妥布霉素和四环素敏感, 对头孢他啶中介。见表 5。

表 5 不同药物对 Av 的抑菌环直径检测结果(n=3)

抗菌药物	含量 (μg/片)	Av 抑菌环直径 ($\bar{x} \pm s$, mm)	质控菌抑菌环直径 ($\bar{x} \pm s$, mm)	抑菌环直径判定标准 (mm)		
				耐药	中介	敏感
氨苄西林/舒巴坦	10/10	25.8 ± 0.5	19.1 ± 0.6	≤11	12 ~ 14	≥15
头孢他啶	30	17.8 ± 0.7	25.9 ± 0.6	≤14	15 ~ 17	≥18
环丙沙星	5	22.9 ± 1.0	31.1 ± 0.7	≤15	16 ~ 20	≥21
左氧沙星	5	24.5 ± 1.2	29.8 ± 0.5	≤13	14 ~ 16	≥17
美洛培南	10	23.1 ± 0.9	28.2 ± 0.3	≤13	14 ~ 15	≥16
庆大霉素	10	20.3 ± 0.4	20.6 ± 0.4	≤12	13 ~ 14	≥15
妥布霉素	10	20.5 ± 0.4	20.2 ± 0.7	≤12	13 ~ 14	≥15
四环素	30	15.5 ± 0.4	24.8 ± 0.7	≤11	12 ~ 14	≥15

3 讨论

本研究以线虫常规培养的食物大肠杆菌 OP50 作为参照, 通过秀丽隐杆线虫发育、运动、寿命和繁殖能力评价 Av 的致病性。线虫的寿命是评估细菌致病性的一个重要指标^[11,14], 具体方法是检测线虫在病原菌菌苔上的生存曲线。本研究显示, 在 Av 和 OP50 上生长的秀丽隐杆线虫生存曲线基本重合, 说明秀丽隐杆线虫寿命没有因为 Av 的影响而延长或缩短。近年也有研究将线虫繁殖的后代数目作为评估细菌致病性的指标^[15]。VALLEJO 等^[12]研究发现不同品系鲍氏不动杆菌对小鼠腹腔注射的 LD₅₀ 与线虫后代数目实验得出的毒性顺序一致, 并且后代数目比寿命指标在致病性评估方面更为敏感。本研究显示, Av 组秀丽隐杆线虫后代总数较 OP50 组明显增多, 说明 Av 对线虫无繁殖毒性, 反而增强其繁殖能力。

本研究还观察了 Av 对秀丽隐杆线虫生长发育的影响。培养 1 d 后的 Av 组秀丽隐杆线虫体长小于 OP50 组, 可能不同种类的细菌为秀丽隐杆线虫发育提供的营养有差别或者不同细菌的代谢产物对线虫发育速度有影响^[16-17], 但 Av 组与 OP50 组成成年线虫体长和体宽均无差异, 提示 Av 仍能使线虫发育长大。Av 组秀丽隐杆线虫头部摆动频率和身体弯曲频率与 OP50 组相比差异均无统计学意义, 提示 Av 对线虫的运动能力没有影响。平均排便循环时间是与线虫消

化功能有关的指标, 是基于代谢评价终点的一个非常重要的指标, 随秀丽隐杆线虫寿命增加, 排便循环时间延长^[18]。Av 组秀丽隐杆线虫的平均排便循环时间较 OP50 组明显缩短, 说明 Av 组秀丽隐杆线虫的消化能力要强于 OP50 组。上述结果表明 Av 对秀丽隐杆线虫的发育、运动及消化能力均无影响, 进一步证实了 Av 对秀丽隐杆线虫无致病性。

NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》将菌种安全性分为 4 级, 不同级别的菌种选择不同的试验方法。本株 Av 不在该准则的附录 A 菌种目录中, 根据该准则的 4.1 条规定, “未列入附录 A 中的菌种, 除根瘤菌和乳杆菌外, 其余均需做毒理学实验”, 本研究按照准则中第三级菌种的标准, 对 Av 做了 6 项致病性试验。结果显示, 雌性、雄性小鼠经口 LD₅₀ 均 > 10 g/kgbw, 为实际无毒; 急性腹腔注射致病性试验结果显示动物无异常, 可判定为无致病性; 一次破损皮肤刺激试验和急性眼刺激试验结果均显示无刺激性; 溶血试验为阴性; 受试菌株必须对 2 种以上的抗菌药物敏感方可获应用, Av 对 7 种不同类别的抗菌药物均敏感, 仅对一种抗菌药物中介。因此, 按照该标准判定, Av 是安全的。

综上所述, Av 对秀丽隐杆线虫的发育、运动功能和寿命均无明显影响, 反而增强秀丽隐杆线虫的消化和繁殖能力, 表明 Av 没有致病性, 与 NY 1109—2017《微生物肥料生物安全通用技术准则》中的致病

性试验得出相同的结论。本研究的创新性在于首次使用线虫模型评价环境修复剂的致病性,除使用线虫寿命和繁殖指标外,增加了线虫发育、运动及消化能力指标进行评估,使该致病性评估模型更加完善;但同时也应认识到线虫等低等生物的免疫机制^[11]与哺乳动物有较大差异,尚不能完全取代哺乳动物在病原菌致病性评估中的应用,可考虑作为致病性评价体系的筛选方案。

参考文献

- [1] KOTHARI A, CHARRIER M, WU Y W, et al. Transcriptomic analysis of the highly efficient oil-degrading bacterium *Acinetobacter venetianus* RAG-1 reveals genes important in dodecane uptake and utilization [J/OL]. FEMS Microbiol Lett, 2016, 363 (20) (2016-09-22) [2019-08-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5074533>.
- [2] FONDI M, MAIDA I, PERRIN E, et al. Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus* [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21985.
- [3] LUCKARIFT H R, SIZEMORE S R, FARRINGTON K E, et al. Biodegradation of medium chain hydrocarbons by *Acinetobacter venetianus* 2AW immobilized to hair-based adsorbent mats [J]. Biotechnol Prog, 2011, 27 (6): 1580-1587.
- [4] LAMAS B, MICHEL M L, WALDSCHMITT N, et al. Card9 mediates susceptibility to intestinal pathogens through microbiota modulation and control of bacterial virulence [J]. Gut, 2018, 67 (10): 1836-1844.
- [5] BOEHNKE K F, EATON K A, FONTAINE C, et al. Reduced infectivity of waterborne viable but nonculturable *Helicobacter pylori* strain SS1 in mice [J/OL]. Helicobacter, 2017, 22 (4) (2017-04-24) [2019-08-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/hel.12391>.
- [6] MANN K M, PRIDE A C, FLENTIE K, et al. Analysis of the contribution of MTP and the predicted Flp pilus genes to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis [J]. Microbiology, 2016, 162 (10): 1784-1796.
- [7] 中华人民共和国农业部. 微生物肥料生物安全通用技术准则: NY 1109—2017 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 2-6.
- [8] 郭欣欣, 于新惠, 张颖, 等. 单核细胞增生李斯特菌对秀丽隐杆线虫致病性的研究 [J]. 微生物学杂志, 2015, 35 (4): 7-12.
- [9] 鞠守勇, 陈其国. 秀丽隐杆线虫作为病原菌宿主模型的研究概述 [J]. 动物医学进展, 2018, 39 (7): 108-113.
- [10] 曹玲, 陈丽丹, 肖斌, 等. 秀丽隐杆线虫-产碳青霉烯酶阴沟肠杆菌感染模型的建立及应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43 (4): 444-449.
- [11] BAI Y, ZHI D, LI C, et al. Infection and immune response in the nematode *Caenorhabditis elegans* elicited by the phytopathogen *Xanthomonas* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2014, 24 (9): 1269-1279.
- [12] VALLEJO J A, BECEIRO A, RUMBO-FEAL S, et al. Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii* [J/OL]. Int J Antimicrob Agents, 2015 (2015-07-09) [2019-08-01]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857915002411>.
- [13] HUANG C W, LI S W, HSIU-CHUAN L V. Chronic ZnO-NPs exposure at environmentally relevant concentrations results in metabolic and locomotive toxicities in *Caenorhabditis elegans* [J]. Environ Pollut, 2017, 220 (Pt B): 1456-1464.
- [14] ERMOLAEVA M A, SCHUMACHER B. Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity [J]. Semin Immunol, 2014, 26 (4): 303-309.
- [15] HWANG S B, CHOI J G, WEI S, et al. *In vivo* screening platform for shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using *Caenorhabditis elegans* as a model [J]. PLoS One, 2018, 13 (2): e0193277.
- [16] SAMUEL B S, ROWEDDER H, BRAENDLE C, et al. *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113 (27): 3941-3949.
- [17] LUO H, XIONG J, ZHOU Q, et al. The effects of *Bacillus thuringiensis* Cry6A on the survival, growth, reproduction, locomotion, and behavioral response of *Caenorhabditis elegans* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97 (23): 10135-10142.
- [18] 张孟丽, 束成杰, 张卫明. 1-脱氧野尻霉素对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用 [J]. 食品工业科技, 2018, 39 (21): 280-286.

收稿日期: 2019-06-10 修回日期: 2019-08-01 本文编辑: 徐文璐