

水產益健飼料對養殖魚蝦體內病原菌之抑制效益評估

劉佩玟* · 林佳勳 · 陳建彰 · 謝豐群 · 楊順德

農業部水產試驗所淡水養殖研究中心

摘 要

全球水產養殖業隨著科技進步和市場需求持續增長，但氣候變遷與高密度養殖增加細菌性疾病的風險，本研究探討含益生菌短小芽孢桿菌 (*Bacillus pumilus* D5) 的飼料對抑制水產動物病原菌的效果，試驗對象包括吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*)、金目鱸 (*Lates calcarifer*)、午仔魚 (*Eleutheronema tetradactylum*) 及白蝦 (*Penaeus vannamei*)，樣本來自 10 個養殖場實證場域，試驗飼料使用含 10^6 CFU/g 短小芽孢桿菌 D5 的益健飼料，並定期針對試驗動物肝臟、脾臟、腸道或肝胰臟中的弧菌 (*Vibrio* spp.)、鏈球菌 (*Streptococcus* spp.) 和產氣單胞菌 (*Aeromonas* spp.) 進行菌數監測，同時監測優勢病原菌及其藥物敏感性。結果顯示，益健飼料普遍對所有試驗動物的病原菌有抑制效果，吳郭魚腸道中的鏈球菌和弧菌分別減少 82.20% 和 75.00% 以上，肝臟中的產氣單胞菌減少至少 85.48%；金目鱸肝臟和腸道中的鏈球菌可減少 92.06% 以上，腸道中的弧菌減少 46.60% 以上，肝臟中的產氣單胞菌下降 99.96%；午仔魚腸道中的弧菌 (含發光桿菌 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDSD) 數量少 1 個對數值，鏈球菌數量則未檢測到；白蝦的肝胰臟中弧菌數量在多次採樣中均低於 10^3 CFU/g。優勢病原菌方面，吳郭魚與金目鱸以維隆產氣單胞菌 (*A. veronii*) 為主，午仔魚則以發光桿菌 (PDSD) 為主，白蝦以腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 為主。藥物敏感性結果顯示，試驗組的各種病原菌至少五成以上菌株可對 4 種以上抗生素具敏感性。綜上，使用含短小芽孢桿菌 D5 的益健飼料能夠減少水產動物體內常見病原菌數量，並有助於減少產生抗藥性病原菌的風險。

關鍵詞：益生菌、細菌性病原、益健飼料、抑制能力

前 言

隨著人口增長、健康飲食趨勢的推動，使民眾對水產品的需求日益增加，加上水產養殖技術的進步，水產養殖業產量逐步上升，根據 FAO (2024) 統計，全球水產養殖產量包含藻類養殖達 130.9 百萬噸，較 2013 年成長 13.8%，可見水產品在提供糧食動物性蛋白質方面具有發展潛力。然而，近年因為全球氣候變遷、養殖環境老化及高密度飼養，養殖業者相較過去面臨更多挑戰，其中水產動物疾病問題為重要。

大多數水產細菌性病原屬於機緣性病原，且為環境中的常在菌，近年的高水溫有利於水中病

原菌增長，Reverter *et al.* (2020) 的研究發現，不同水溫下水產動物感染病原菌後的死亡情形，水溫每升高 1°C，死亡率平均增加約 2.82 – 6.00%，而這些病原菌包括產氣單胞菌屬 (*Aeromonas* spp.)、愛德華氏菌屬 (*Edwardsiella* spp.)、鏈球菌屬 (*Streptococcus* spp.)、弧菌屬 (*Vibrio* spp.) 等，其在較高的水溫下更容易滋生並導致更嚴重的疾病爆發，未來全球暖化將會使病原菌問題更加突出，尤其是熱帶和亞熱帶地區。而每種養殖魚介類都有其最適合生長的水溫，水溫若超出動物所能負荷的極限，加上水質不良與環境中存在過多的病原，亦容易造成養殖魚蝦罹患疾病 (Reverter *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022)。高溫條件會對魚蝦的免疫系統產生緊迫，長期的高溫刺激會影響神經內分泌系統以及滲透壓調節，削弱其免疫反應能力，這使得它們對病原菌的抵抗力下降，導致其更容易罹患疾病 (Maulu *et al.*, 2021)。

*通訊作者 / 彰化縣鹿港鎮海埔里 106 號, TEL: (04) 777-2175 ext. 2206; FAX: (04) 777-5424; E-mail: pwliu@mail.tfrin.gov.tw

根據財團法人台灣養殖漁業發展基金會歷年的水生動物病例彙整統計資料，細菌性疾病以弧菌、鏈球菌、產氣單胞菌與奴卡氏菌 (*Nocardia* spp.) 為主，在臺灣常見的弧菌有腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、創傷弧菌 (*V. vulnificus*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、哈威氏弧菌 (*V. harveyi*) 等 (Liu *et al.*, 1996; Tey *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016)；鏈球菌有無乳鏈球菌 (*S. agalactiae*)、海豚鏈球菌 (*S. iniae*)、乳酸鏈球菌 (*Lactococcus garvieae*)，感染鏈球菌的魚隻通常眼凸且白濁 (Liao *et al.*, 2020)，鏈球菌好發季節為夏季 (7–9 月)，冬季增殖速度較慢，但隨著全球暖化影響，水溫上升可能使的鏈球菌的增殖加速，若未做好養殖管理或操作不當，容易使魚隻感染鏈球菌症。產氣單胞菌常見的例如親水性產氣單胞菌 (*A. hydrophilia*) 和維隆產氣單胞菌 (*A. veronii*)，其容易於腸道內增生，造成出血性卡他性腸炎 (catarrhal inflammation)，並經由養殖魚類的腸道、池底沉積物及豐富有機體的池水中快速增殖傳播。

近年來，益生菌 (probiotics) 在水產養殖中的應用愈受到重視，國內外大量研究表明，通過在飼料中添加益生菌或益生素 (prebiotics)，不僅可以有效提升養殖生物的免疫力，還能顯著抑制病原菌的增殖。例如 Park *et al.* (2020) 的研究指出，益生菌可以改善魚隻的整體健康，增強其對病原菌的抵抗力；Cruz *et al.* (2012) 的研究也顯示，益生菌在促進免疫系統功能的同時，能有效減少疾病的爆發。此外，黃等 (2016) 更具體證明，適當使用益生菌飼料能顯著降低細菌性疾病的發生率，並改善抗生素的過度使用問題。

肝臟和脾臟是魚類重要的代謝與免疫器官，近年來，有研究指出在健康魚類內臟中也有細菌存在 (Suzuki, 2018; Pujalte *et al.*, 2003)，而這些細菌出現在應該是無菌的器官中，是因為緊迫導致免疫防禦機制崩潰 (Tort, 2011)，而緊迫因素包括水質差、溫度變化、營養缺乏、過度擁擠、創傷和感染 (Sousa *et al.*, 1999)。Meron *et al.* (2020) 對以色列地中海海岸線的五種常見魚類進行肝臟與腎臟中病原菌 16S rRNA 次世代定序，結果可檢測到三種潛在病原菌，分別為發光桿菌 (*Photobacterium damsela*)、哈威氏弧菌和海豚鏈

球菌，其中病原菌在腎臟中的豐度高於肝臟。

綜合以上，在魚隻經歷緊迫、環境驟變或水質、底質條件不佳時，容易導致魚蝦的免疫系統被削弱，從而增加感染的風險 (Ellis, 2001; Tort, 2011)，雖然可藉由養殖管理的改進減少這些問題，但隨著全球氣候變遷的加劇，大環境的變化難以逆轉，因此需要尋找其他有效的解決方案。

水產業界過去在使用口服益生菌方面，大多是在投餵前以人工或機器輔助方式，將益生菌粉或菌液拌入飼料中，費工又費時，故而水產試驗所自 2021 年整合各研究中心共同開發了一款含有短小芽孢桿菌 (*Bacillus pumilus* D5) 的水產益健飼料 (pro-health aquafeed)，其中短小芽孢桿菌 D5 是朱等 (2016) 自白蝦腸道所分離，其具有 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 等抗菌物質。由抑菌試驗結果顯示，該菌抑制腸炎弧菌、哈威氏弧菌和霍亂弧菌 (*V. cholerae*) 等常見病原弧菌效果佳；此外亦可抑制海豚鏈球菌、無乳鏈球菌、親水性產氣單胞菌以及發光桿菌 (*Ph. damsela* subsp. *damsela*, PDSD) 等常見病原菌 (黃等, 2016; 黃等, 2022)。益健飼料中短小芽孢桿菌 D5 活性至少含有 10^6 CFU/g，且該飼料具有即拆即使用的特性，讓養殖業者不需再額外添加益生菌。2023 年開始相關驗證從實驗室規模逐漸擴散到田間驗證場域，並委請水產養殖業者依照慣行方式投餵益健飼料，而本研究主要目的為探討益健飼料在不同環境與不同養殖業者的操作手法下，對病原菌的抑制成效。

材料與方法

一、試驗材料與試驗場域

本研究所使用之尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*)、金目鱸 (*Lates calcarifer*)、午仔魚 (*Eleutheronema tetradactylum*) 與白蝦 (*Penaeus vannamei*) 樣本是來自於與民間養殖業者共同建置的田間驗證場域，平時委請養殖業者依照各自慣行的養殖操作方式進行投餵管理，再由水試所研究人員定期前往採樣，吳郭魚驗證場域共 3 處，分別位於嘉義布袋 2 處 (第 I 和第 II 處) 和臺南學甲，除了布袋第 II 處僅有試驗組外，其餘皆包含

對照組與試驗組；金目鱸驗證場域共 3 處，分別位於雲林麥寮、臺南學甲和本所淡水養殖研究中心(彰化鹿港)，皆包含對照組與試驗組；午仔魚驗證場域共計 4 處，於同一養殖生產區另尋對照池 4 處，分別位於屏東佳冬和枋寮；白蝦驗證場域共計 2 處，皆位於屏東枋寮，皆僅有試驗組。

二、試驗方法

(一) 飼料備製及投餵

對照組飼料分別為養殖業者慣用之市售吳郭魚、鱸魚、午仔魚及白蝦飼料，試驗組則為委託同品牌飼料公司製作之益健飼料，而益健飼料經檢測均含有 10^6 CFU/g 以上的短小芽孢桿菌 D5，吳郭魚及鱸魚飼料部分另添加 0.1% 腸膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides* B4) 發酵之優格。投餵方式依照各業者習慣之手法進行，以飽食為原則；本所淡水養殖研究中心(彰化鹿港)之驗證場域則以每日投餵魚體重 5%。

(二) 益健飼料控制病原菌成效

1. 標的病原菌菌數監測

本試驗標的病原菌設定為養殖魚蝦常見病原菌，如弧菌屬、鏈球菌屬以及產氣單胞菌屬，每組各取 3 尾正常魚，此處正常魚指正常攝食且無肉眼可見外部病徵的魚，將解剖後秤取其肝臟、脾臟與腸道，將 3 尾魚的不同臟器分別混成 1 管，加入適當體積的 1 倍磷酸鹽緩衝鹽水 (phosphate buffered saline, PBS) 後進行研磨均質，離心後取上清液並以 $1 \times$ PBS 進行 10 倍連續稀釋，再依照欲監測的標的病原菌選擇適當商用培養基，弧菌屬以硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖培養基 (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS, 購自 Dicfo)、鏈球菌屬以鏈球菌培養基 *Streptococcus*, CHROMagar™, 購自 CHROMagar) 以及產氣單胞菌屬以產氣單胞菌培養基 (*Aeromonas* Selective Agar, 購自 Himedia) 培養，製成平板培養基後，取定量上清液後以 L-shape 塗抹棒將其均勻塗抹在培養基表面，依照不同菌種生長速度，於 28°C 下培養 24 - 48 hr 後計算平均菌落數量。

2. 優勢病原菌監測

以滅菌之白金接種環進行臟器三區釣菌，培養基使用胰蛋白酶大豆瓊脂培養基 (tryptone soy agar, TSA, 購自 Dicfo) 並配合不同鹽度之養殖生物添加氯化鈉，於 28°C 下培養 24 - 48 hr 後再分離純化菌株，而在養殖過程若收到養殖業者寄送之病魚，採樣方法同上。

(三) 菌種鑑定

將生長在培養基上的菌株分離並純化，以商用微生物鑑定套組 API 20E 或 API 20 Strep strip (購自 biomérieux) 鑑定，若遇到資料庫鑑定不出來的菌種，則萃取細菌核酸，並委託生技公司以 16S rRNA 定序，最後在 NCBI (national center for biotechnology information) 上進行比對。

(四) 病原菌藥物敏感性測定

使用紙錠擴散法 (disk diffusion method)，參考臨床和實驗室標準化研究所 (the clinical & laboratory standards institute, CLSI) 指引，將純化後的病原菌以 1 倍 PBS 配置成濁度與 0.5 McFarland 標準液相當的菌懸液，並以滅菌棉花棒沾取菌液後均勻塗抹在穆勒辛頓瓊脂 II (*müller-hinton agar II*, MHA, 購自 Dicfo) 或含有 5% 羊血的 MHA 上，而本試驗使用的 10 種抗生素紙錠有：氟滅菌 (flumequine, 30 μ g)、羧四環黴素 (oxytetracycline, 30 μ g)、氟甲磺氯黴素 (florfenicol, 30 μ g)、脫氧羧四環黴素 (doxycycline, 30 μ g)、歐索林酸 (oxolinic acid, 2 μ g)、紅黴素 (erythromycin, 15 μ g)、林可黴素 (lincomycin, 15 μ g)、史黴素 (spiramycin, 100 μ g)、安比西林 (ampicillin, 10 μ g) 與安默西林 (amoxicillin, 25 μ g)，將直徑 6 mm 的紙錠貼在培養基表面上於 28°C 下培養 24 hr 後量測抑菌圈，並參照紙錠生產商提供之 zone size interpretative chart 判定。

(五) 統計分析方法

在標的病原菌菌數監測試驗中，部分吳郭魚、白蝦及午仔魚的養殖業者因場地限制，無法同時設置對照組與試驗組，故其數據僅以平均值呈現(如嘉義布袋吳郭魚驗證場 II、白蝦驗證戶及午仔魚驗證戶)，未進行統計分析；此外，由於每位業者的經營管理策略各異，難以在整個養殖過程中持續取得數據，針對這些場地，本研究以魚蝦收成

Table 1 Bacterial loads in different organs of Nile tilapia from private farm I (Budai, Chiayi)

Organ	Target bacteria	Group	Loads (CFU/g)	Change (%)	p-value
Liver	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	2.22×10^2	-99.55	–
		Experimental	ND		
Spleen	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
Intestine	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	1.00×10^3	-82.2	1
		Experimental	1.78×10^2		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	1.63×10^3	-98.36	0.333
		Experimental	2.67×10^1		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	1.16×10^5	-91.44	0.333
		Experimental	9.95×10^3		

The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

ND (Not Detected) was considered as 1 CFU/g when calculating the relative percentage change.

The symbol '–' indicates that the variance was zero after grouping by Group, making statistical analysis not applicable.

A p-value of less than 0.05 indicates a statistically significant difference.

時為採樣時間點，並以平均菌數呈現（如臺南學甲吳郭魚驗證場及臺南學甲金目鱸驗證場），未進行統計分析；至於其餘養殖業者的細菌數據，則採用 JASP (Jeffrey's Amazing Statistics Program) 軟體以 Mann-Whitney U 檢定進行統計分析，包括嘉義布袋吳郭魚驗證場 I、彰化鹿港淡水養殖研究中心及雲林麥寮驗證場，顯著水準定在 0.05；菌數相對變化百分比公式 (relative percentage change) = (試驗組平均菌數 - 對照組平均菌數) / 對照組平均菌數 × 100%。

結 果

一、益健飼料控制病原菌成效

(一) 吳郭魚標的病原菌菌數監測 (2023 年調查)

1. 嘉義布袋吳郭魚驗證場 I

連續使用益健飼料並在投餵後 1 個月後開始監

測，結果顯示 (Table1)，鏈球菌部分，對照組腸道中平均菌數為 1.00×10^3 CFU/g，試驗組腸道中平均菌數 1.78×10^2 CFU/g，可減少吳郭魚腸道鏈球菌數 82.20%；弧菌部分，對照組腸道中平均菌數 1.63×10^3 CFU/g，試驗組腸道中平均菌數 2.67×10^1 CFU/g，可減少腸道弧菌數 98.36%；產氣單胞菌部分，對照組的肝臟可以培養到菌，但試驗組則未檢測到；在腸道中，試驗組之平均菌數 9.95×10^3 CFU/g，顯示使用益健飼料可分別減少肝臟與腸道 99.55% 與 91.44% 的菌量，統計上不具顯著差異，但可減少 80% 以上菌數。

2. 臺南學甲吳郭魚驗證場

養殖業者連續使用益健飼料 9 個月，於 6 月收成時採樣分析，結果如 Table 2 所示。弧菌部分，對照組腸道中平均菌數為 2.91×10^7 CFU/g，試驗組腸道中平均菌數 7.28×10^6 CFU/g，可減少吳郭魚腸道弧菌數 75.00%；產氣單胞菌部分，對照組與試驗組之肝臟、脾臟與腸道皆可以培養到菌，而

Table 2 Bacterial loads in different organs of tilapia from private farm (Xuejia, Tainan)

Organ	Target bacteria	Group	Loads (CFU/g)	Change (%)
Liver	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	1.53×10^4	-85.48
		Experimental	2.22×10^3	
Spleen	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	4.68×10^3	-97.58
		Experimental	1.13×10^2	
Intestine	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	2.91×10^7	-75.00
		Experimental	7.28×10^6	
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	1.26×10^5	-86.28
		Experimental	1.73×10^4	

ND (not detected) was considered as 1 CFU/g when calculating the relative percentage change.

Table 3 Mean bacterial loads in different organs of Nile tilapia from the experimental group at private farm II (Budai, Chiayi)

	Liver	Spleen	Intestine
<i>Streptococcus</i> spp.	1.07×10^4	1.35×10^4	1.69×10^4
<i>Vibrio</i> spp.	ND	ND	1.52×10^3
<i>Aeromonas</i> spp.	1.07×10^4	4.11×10^1	7.22×10^4

ND : not detected

試驗組各器官之平均菌數分別為 2.22×10^3 CFU/g、 1.13×10^2 CFU/g 和 1.73×10^4 CFU/g，顯示使用益健飼料可分別減少吳郭魚肝臟、脾臟與腸道之產氣單胞菌數 85.48%、97.58% 和 86.28%。

3. 嘉義布袋吳郭魚驗證場 II

此部分所配合之驗證戶已全面使用益健飼料，無對照組做比較，故病原菌數以 1.00×10^3 CFU/g 為閾值，超過此菌數可能對魚蝦健康產生影響。業者連續使用 6 個月，期間進行 3 次採樣，結果顯示 (Table 3)，鏈球菌部分，正常魚肝臟、脾臟、腸道中平均菌數介於 $1.07 \times 10^4 - 1.69 \times 10^4$ CFU/g；弧菌菌數介於 $0 - 1.52 \times 10^3$ CFU/g；產氣單胞菌數則介於 $4.11 \times 10^1 - 7.22 \times 10^4$ CFU/g。

(二) 金目鱸標的病原菌菌數監測 (2023 年調查)

1. 彰化鹿港淡水養殖研究中心

連續使用益健飼料 6 個月，投餵期間進行 4 次採樣，結果顯示 (Table 4)，鏈球菌部分，試驗組肝臟中平均菌數 7.83×10^1 CFU/g、脾臟未檢測到和腸道 8.76×10^5 CFU/g，可分別減少金目鱸肝臟、脾臟與腸道鏈球菌數 99.17%、99.88% 和 92.28%；弧菌部分，試驗組肝臟中平均菌數未檢測到和腸道 1.96×10^1 CFU/g，可分別減少肝臟與腸道弧菌量 99.79% 和 98.28%；產氣單胞菌部分，試驗組肝臟中平均菌數未檢測到，較對照組降低約 99.99% 菌數，然而腸道中的平均菌數 2.40×10^6 CFU/g，反

Table 4 Bacterial loads in different organs of Asian seabass from Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute (Lukang, Changhua)

Organ	Target bacteria	Group	Loads (CFU/g)	Change (%)	p-value
Liver	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	9.39×10^3	-99.17	0.408
		Experimental	7.83×10^1		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	4.88×10^2	-99.79	–
		Experimental	ND		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	2.39×10^4	-99.99	0.183
		Experimental	ND		
Spleen	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	8.67×10^3	-99.99	–
		Experimental	ND		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
Intestine	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	1.10×10^7	-92.06	0.110
		Experimental	8.76×10^5		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	1.14×10^3	-98.28	1.00
		Experimental	1.96×10^1		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	8.44×10^4	+2,740.24	0.343
		Experimental	2.40×10^6		

The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

ND (Not Detected) was considered as 1 CFU/g when calculating the relative percentage change.

The symbol '–' indicates that the variance was zero after grouping by Group, making statistical analysis not applicable.

A p-value of less than 0.05 indicates a statistically significant difference.

而增加了約 2 個對數值，除了腸道產氣單胞菌含量外，其他均可減少 90% 以上菌數。

2. 雲林麥寮金目鱸驗證場

連續使用益健飼料 1 個月後開始監測，期間進行 2 次採樣，結果顯示 (Table 5)，鏈球菌部分，試驗組肝臟中未檢出菌數到和腸道則為 4.55×10^3 CFU/g，相較對照組減少金目鱸肝臟鏈球菌數 99.86%，但在腸道方面，使用第 1 個月菌數 8.97×10^3 CFU/g，相較對照組 7.8×10^2 CFU/g 增加約 1 個對數值，使用 2 個月後腸道鏈球菌數降低為 1.35×10^2 CFU/g，相較對照組 6.7×10^2 CFU/g 可減少 79.85% 菌數；弧菌部分，試驗組肝臟中平均菌數 4.38×10^2 CFU/g、脾臟 1.59×10^3 CFU/g 和腸道 1.19×10^3 CFU/g，可分別減少 87.76%、22.15% 和 46.60%；產氣單胞菌部分，試驗組肝臟中平均菌數 2.11×10^4 CFU/g、脾臟 2.07×10^2 CFU/g 和腸道 1.03×10^4 CFU/g，除肝臟有稍微增加 2.85% 菌數，脾臟與腸道則分別減少 80.22% 和 97.94%，統計上

不具顯著差異，但普遍可減少 80% 以上菌數。

3. 臺南學甲金目鱸驗證場

連續使用益健飼料 4 個月，於收成時進行採樣，結果顯示 (Table 6)，鏈球菌部分，對照組與試驗組各臟器平均菌數皆未檢測到；弧菌部分，試驗組腸道未檢測到，可減少金目鱸腸道菌數 99.42%；產氣單胞菌部分，試驗組肝臟平均菌數未檢測到、脾臟 1.73×10^2 和腸道未檢測到，相較於對照組可分別減 98.85%、71.43% 和 99.94%。

(三) 午仔魚標的病原菌菌數監測 (2024 年調查)

此部分所配合之驗證戶已全面使用益健飼料，故於實證場域鄰近另找其他業者做為對照戶，對照戶與驗證戶各 4 家，病原菌數以 1.00×10^3 CFU/g 為閾值，超過此菌數可能對魚蝦健康產生影響。採樣結果顯示 (Fig. 1)，弧菌部分 (含發光桿菌)，對照戶腸道平均菌數 1.34×10^3 CFU/g，驗證戶平均

Table 5 Bacterial loads in different organs of Asian seabass from private farm (Mailiao, Yunlin)

Organ	Target bacteria	Group	Loads (CFU/g)	Change (%)	p-value
Liver	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	7.20×10^2	-99.86	–
		Experimental	ND		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	3.58×10^3	-87.76	1.00
		Experimental	4.38×10^2		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	2.05×10^4	+2.85	0.645
		Experimental	2.11×10^4		
Spleen	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0	–
		Experimental	ND		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	2.04×10^3	-22.15	1.00
		Experimental	1.59×10^3		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	1.05×10^3	-80.22	1.00
		Experimental	2.07×10^2		
Intestine	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	7.25×10^2	+527.93	1.00
		Experimental	4.55×10^3		
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	2.23×10^3	-46.60	0.825
		Experimental	1.19×10^3		
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	4.99×10^5	-97.94	0.507
		Experimental	1.03×10^4		

The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

ND (Not Detected) was considered as 1 CFU/g when calculating the relative percentage change.

The symbol '–' indicates that the variance was zero after grouping by Group, making statistical analysis not applicable.

A p-value of less than 0.05 indicates a statistically significant difference.

菌數 1.08×10^1 CFU/g，相較未使用益健飼料組別少 1 個對數值，然而在驗證戶肝臟雖有培養到弧菌，但仍控制在 1.00×10^3 CFU/g 以下。鏈球菌部分，對照戶腸道平均菌數為 3.12×10^3 CFU/g，驗證戶則皆未檢測到。

(四) 白蝦標的病原菌菌數監測 (2024 年調查)

此部分所配合之驗證戶已全面使用益健飼料，無對照組做比較，以病原菌數以 1.00×10^3 CFU/g 為閾值，超過此菌數可能對魚蝦健康產生影響。3 – 7 月採樣結果顯示 (Table 7)，驗證戶 I (A 池) 之肝胰臟弧菌數介於 $8.66 \times 10^1 - 9.62 \times 10^2$ CFU/g，驗證戶 I (B 池) 之肝胰臟弧菌數除了 6 月份高達 2.77×10^5 CFU/g 之外，其餘月份肝胰臟弧菌數介於 $1.30 \times 10^2 - 5.48 \times 10^3$ CFU/g，而 6 月蝦樣本送驗微孢子蟲結果呈現陽性。驗證戶 II 弧菌數則介

於 $2.17 \times 10^1 - 2.17 \times 10^4$ CFU/g。

二、優勢病原菌監測

在 2023 年 2 – 11 月的監測期間，吳郭魚與金目鱸驗證場域中，對照組與試驗組的優勢病原菌並無太大差異，皆以產氣單胞菌屬為主，其中又以維隆產氣單胞菌較常分離到；而在吳郭魚驗證場域中，又以類志賀鄰單孢菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 次之。進一步分析選擇性培養基上之菌落，弧菌中以霍亂弧菌較常分離到；鏈球菌則以屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、糞腸球菌 (*E. faecalis*) 和乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 較常分離到。

在嘉義布袋吳郭魚驗證場 II 中，3、6 及 8 月季節變化之際與高水溫期，計有 3 次疾病發生，主要優勢病原菌 3 月為創傷弧菌、6 及 8 月為無乳鏈

Table 6 Bacterial loads in different organs of Asian seabass from private farm (Xuejia, Tainan)

Organ	Target bacteria	Group	Loads (CFU/g)	Change (%)
Liver	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	8.67×10^1	-98.85
		Experimental	ND	
Spleen	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	6.07×10^2	-71.43
		Experimental	1.73×10^2	
Intestine	<i>Streptococcus</i> spp.	Control	ND	0
		Experimental	ND	
	<i>Vibrio</i> spp.	Control	1.73×10^2	-99.42
		Experimental	ND	
	<i>Aeromonas</i> spp.	Control	1.73×10^3	-99.94
		Experimental	ND	

ND (not detected) was considered as 1 CFU/g when calculating the relative percentage change.

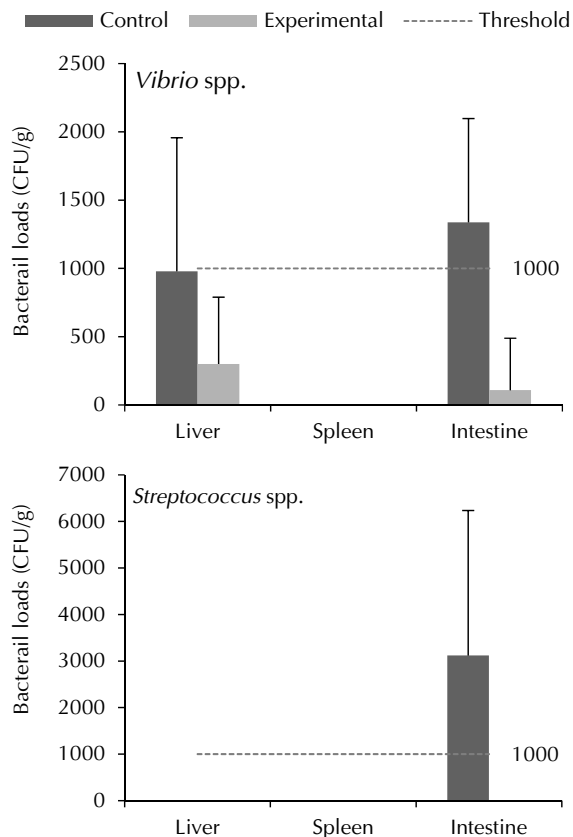


Fig. 1 Bacterial loads (mean $\pm$ SE) in different organs of East Asian fourfinger threadfin from private farms. The threshold for bacterial loads is set at 10^3 CFU/g.

球菌；而在3月的案例中，肝臟平均弧菌數 2.46×10^3 CFU/g；6月案例中肝臟與腸道平均鏈球菌分別為 5.98×10^8 CFU/g 和 2.21×10^8 CFU/g；8月案例中腸道平均鏈球菌為 1.39×10^5 CFU/g。

在2024年3–7月的監測期間，午仔魚驗證場的正常魚體內主要優勢病原菌為發光桿菌 (PDSD) 為主，其次是弧菌例如腸炎弧菌與創傷弧菌；白蝦驗證場的正常白蝦體內主要優勢病原菌以腸炎弧菌為主，亦可培養到歐氏弧菌 (*V. owensii*)；6月嘉義地區金目鱸驗證場之發病魚之主要優勢病原菌為奴卡氏菌。

三、病原菌藥物敏感性測定

收集自投餵益健飼料之驗證場域中分離之常見病原菌，並測定其藥物敏感性 (Fig. 2)。吳郭魚與鱸魚產氣單胞菌屬共收集14株，以脫氧四環黴素 (100%) 抑制效果最佳，其次是氟滅菌 (94.44%)、歐索林酸 (94.44%)、羥四環黴素 (84.44%)、氟甲磺氯黴素 (84.44%)，至少有84.44% 菌株對以上抗生素具敏感性；鏈球菌屬共收集9株，以紅黴素 (100%) 抑制效果最佳，其次氟甲磺氯黴素 (88.89%)、羥四環黴素 (77.78%)、脫氧四環黴

Table 7 *Vibrio* spp. loads in the hepatopancreas of white shrimp from different experimental groups across various months

	March	April	June	July
EXP. I (A)	9.62×10^2	8.66×10^1	—	—
EXP. I (B)	—	5.48×10^3	$2.77 \times 10^5(*)$	1.30×10^2
EXP. II	—	2.17×10^1	1.95×10^2	2.17×10^4

Notes: — (Not tested): Data was not collected for this time point.

(*): Indicates shrimp were infected with *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP).

EXP. I (A): pond A in Farm I (white shrimp private farm).

EXP. I (B): pond B in Farm I (white shrimp private farm).

EXP. II: farm II (white shrimp private farm).

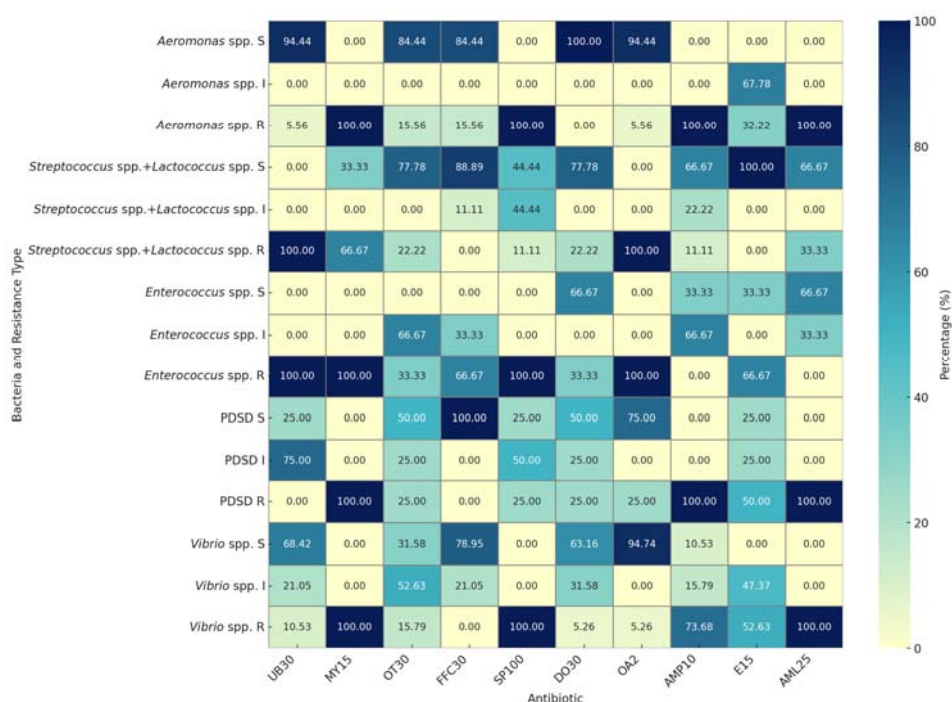


Fig. 2 Antibiotic susceptibility profiles of different pathogenic bacteria. S indicates susceptibility, I indicates intermediate, and R indicates resistance. Percentages represent the proportion of bacterial strains susceptible to each antibiotic.

素 (77.78%)、安比西林 (66.67%) 與安默西林 (66.67%)，至少有 66.67% 菌株對以上抗生素具敏感性；鱸魚腸球菌屬共收集 3 株，以脫氧羧四環黴素 (66.67%) 和安默西林 (66.67%) 之抑制效果最佳，有 66.67% 菌株對二種抗生素具敏感性；午仔魚發光桿菌共收集 4 株，以氟甲磺氯黴素 (100%) 最佳，其次是歐索林酸 (75.00%)、羧四環黴素 (50.00%) 和脫氧羧四環黴素 (50.00%)，50.00% 以上菌株對以上抗生素具敏感性；白蝦弧菌屬共收集 19 株，以歐索林酸 (94.74%) 抑制效果最高，其次是氟甲磺氯黴素 (78.95%)、氟滅菌 (68.42%) 和脫

氧羧四環黴素 (63.16%)，至少有 63.16% 菌株對以上抗生素具敏感性。

討 論

過去，有學者藉由定期調查池水和魚隻體內器官的細菌載量 (bacterial load)，用以了解這些微生物在不同季節和環境條件下的變化，從而為該區域的環境保護和魚類健康管理提供科學依據。肝臟是魚類重要的免疫器官及保菌器官，研究顯示，哈維氏弧菌定殖在石斑魚肝臟中，會誘導肝腸

免疫反應 (gut-liver immune response)，從而顯著干擾魚類腸道細菌群的組成和種間相互作用，改變了腸道微生物調節的功能，並導致魚類死亡 (Deng *et al.*, 2020)。

Abdelhamid *et al.* (2013) 調查埃及曼扎拉湖區的保護區 (Ashtoum El-Gamil) 內的尼羅吳郭魚和鰱魚 (*Mugil cephalus*)，發現皆可在肝臟與腸道中培養出細菌，例如尼羅吳郭魚肝臟總生菌數 1.3×10^6 CFU/g，腸道總生菌數 5.2×10^6 CFU/g，細菌載量隨著季節的變化和不同器官的生理條件而有差異，夏季溫度升高導致細菌載量顯著增加。Ahmad *et al.* (2017) 收集不同水域的鱸魚 (sea bass)、笛鯛 (snapper)、石斑魚 (grouper) 和吳郭魚監測其不同器官內的病原菌載量，發現腎臟與腸道皆可培養出弧菌屬與產氣單胞菌屬，其中腸炎弧菌、霍亂弧菌與創傷弧菌在腎臟介於 $3.4 \times 10^5 - 5.6 \times 10^5$ CFU/g，在腸道則介於 $3.9 \times 10^5 - 7.5 \times 10^5$ CFU/g；親水性產氣單胞菌部分，在腎臟與腸道中則介於 $5.9 \times 10^5 - 8.2 \times 10^5$ CFU/g，藉由監測數據來預測可能的疾病爆發，為水產養殖業提供預防和管理策略，而本研究監測業者所養殖的魚蝦體內的細菌載量，業者可針對培養結果了解魚蝦健康狀況，若細菌載量高於閾值則可以及早做預防管理，以減少魚蝦爆發疾病風險。

拮抗作用或抑制多種病原體的能力是益生菌最重要的特性之一 (Simón *et al.*, 2021)，本研究餵食魚蝦益健飼料的主要目的為避免腸道中的病原菌數量過高，防止病原菌生長狀況進入穩定階段，並降低細菌入侵其他臟器的機會，如此就不會超出魚隻對病原菌的容忍度。而不同食性的魚蝦因為消化道結構、消化酵素和微生物群的不同，導致益生菌應用效果有所差異，例如草食性魚類，食物來源主要為植物或藻類，腸道長度較長，消化酵素以能分解碳水化合物為主，益生菌的應用主要為能夠提升對纖維的分解；肉食性魚類，食物來源主要為動物性蛋白質，腸道長度較短，消化酵素以能分解蛋白質和脂質為主，益生菌的應用主要為改善對蛋白質的消化吸收以及提高免疫力；雜食性魚類，食物來源介於上述兩者，腸道長度中等，益生菌的應用主要為促進微生物相的平衡和提高免疫力 (Nayak, 2010; Wu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016)。

本研究中，益健飼料在抑制金目鱸與吳郭魚上普遍可降低病原菌載量八成以上，然而在降低金目鱸腸道中的鏈球菌和產氣單胞菌的效果不如吳郭魚，推測原因可能有，一是因為金目鱸為肉食性魚類，其腸道較吳郭魚短，飼料停留在腸道中的時間較短，因此短小芽胞桿菌 D5 在腸粘膜上定殖的時間較短或位置不足，二為金目鱸腸道分解酵素與吳郭魚不同，沈 (2018) 以不同分解酵素處理短小芽胞桿菌 D5 的細胞外產物 (extracellular product, ECP)，發現經過 pronase E、proteinase K 和 lipase 後對無乳鏈球菌和腸炎弧菌的抑制活性大幅降低至 50% 以下。而 Jiao *et al.* (2023) 研究指出肉食性魚類鰱魚 (*Siniperca chuatsi*)，其消化道內胰蛋白酶 (trypsin)、胰脂肪酶 (pancrelipase)、腸肽酶 (enteropeptidase) 之活性皆較雜食性魚類高，因此推斷不同食性消化道酵素可能影響其抑菌能力。另外，短小芽胞桿菌可分泌出 kanosamine、bacilysin 及 toxoflavin 等抗菌物質，而抗菌物質對病原菌而言也是一種壓力源，當病原菌受到這些物質刺激後，會引起一些反應，例如促進細菌細胞生理的保護性改變和活化抗性機制等 (Poole, 2012)，因此推測可能造成投餵益健飼料組別短期內出現菌數較高的現象。

淡水魚類的消化道中以腸內菌 (enterobacteria) 中的種類最多，根據文獻指出，養殖尼羅吳郭魚腸道中的優勢菌相主要可分為兩群，其一是類志賀鄰單胞菌；另一是親水性產氣單胞菌 (Sakata *et al.*, 1986)；而養殖鱸魚腸道中以鄰單胞菌屬 (*Plesiomonas* spp.) 與鯨桿菌屬 (*Cetobacterium* spp.) 為優勢菌種 (習, 2021)。本研究在吳郭魚與金目鱸優勢病原菌監測，淡水養殖吳郭魚與金目鱸以產氣單胞菌屬和類志賀鄰單胞菌為主，故使用益健飼料後，金目鱸與吳郭魚之體內優勢菌種並未有太大改變，另以 16S rRNA 進一步鑑定，吳郭魚與金目鱸的產氣單胞菌以維隆產氣單胞菌最常分離到，維隆產氣單胞菌是環境中環境中常在菌，但若環境條件不佳或魚隻免疫力低時仍有造成罹病的可能。Aly *et al.* (2023) 指出，維隆產氣單胞菌會造成尼羅吳郭魚潰瘍症 (ulcerative syndrome)，感染的魚隻體表會出現潰瘍且爛鰭。Ibrahim *et al.* (2024) 在埃及 Ismailia 省的吳郭魚養殖場中，從所收集外觀正常與瀕死的魚

隻中檢出有 18.6% 的維隆產氣單胞菌，且僅從瀕死吳郭魚中檢測到，在親緣分析 (phylogenetic analysis) 顯示，所收集的菌株與來自中國和埃及的其他維隆產氣單胞菌菌株在遺傳上有很高的相似性，表明其具有全球性傳播潛力，又該菌株可攜帶多種毒力基因，以細菌濃度 3×10^8 CFU/ml 的維隆產氣單胞菌注射到健康魚體後，累計死亡率達到 86.7%。

本研究監測外觀正常之吳郭魚與金目鱸腸道中的常態鏈球菌主要有屎腸球菌、糞腸球菌和乳酸乳球菌，糞腸球菌和屎腸球菌為環境菌也可在動物腸道內共存，而因其成長快速與不易受抗生素影響的特色，在過去常被作為益生菌使用。Du *et al.* (2021) 以屎腸球菌粉末飼食白蝦後期幼蟲 (post-larval shrimp)，發現可改變腸道微生物相組成並提高成長與存活率，然而儘管腸球菌具有益生菌的潛力，因其攜帶的毒力因子和抗藥基因可能會導致疾病風險 (Hanchi *et al.*, 2018)，例如以糞腸球菌對尼羅吳郭魚進行攻毒試驗，該菌會造成出血性敗血症，死亡率可達 80%，在組織病理學與穿透式電子顯微鏡 (TEM) 檢查結果，魚隻的心臟與肝臟均出現退化性 (degenerative) 與壞死性病變 (Zahran *et al.*, 2019)；Noroozi *et al.* (2022) 對自水產品中所收集的糞腸球菌進行抗生素抗性分析，發現分離的菌株對多種抗生素表現出高度抗性，例如四環素 (100%)、紅黴素 (100%) 和西福斯汀 (cefoxitin, 89.2%) 等。再者，從法規現狀來看，腸球菌屬的細菌仍未獲得歐洲食品安全局 (european food safety authority, EFSA) 的合格安全假設 (qualified presumption of safety, QPS) 清單，在飼料管理法「可供給家畜、家禽、水產動物之飼料添加物」中，屎腸球菌和糞腸球菌雖有正面表列，但臺灣衛生福利部亦表明該菌應經審慎的安全評估與申請才能應用於食品中。

乳酸乳球菌可在自然環境中生存，在過去通常做為益生菌使用，常被應用於乳製品生產 (Murray, 1990; Wichtel *et al.*, 2003)，不過仍有文獻指出該菌會造成一些水產動物感染乳酸球菌感染症，例如造成淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的乳酸球菌感染症 (Lactococcosis)，病蝦肌肉呈現白濁，一般認為是由而乳酸鏈球菌感染，不過也有案例可在病蝦中分離出乳酸乳球

菌。而將乳酸乳球菌以人工方式感染鱖龍魚與雜交吳郭魚，會使魚隻體表出血、腹脹與肛門紅腫等，並造成魚隻高死亡率 (Chen *et al.*, 2012)。由本研究金目鱸與吳郭魚病原菌抑制結果可知，除了上述可能因食性不同而有所差異外，投餵益健飼料確實可減少腸道與主要免疫器官的細菌載量，其中又以雜食性的吳郭魚應用效果較穩定。

鏈球菌、發光桿菌和弧菌是午仔魚常見病原菌，陳 (2023) 自 2019 年至 2022 年的病例調查結果，細菌性病原以海豚鏈球菌最高佔 50.5%，其次為發光桿菌 (*Ph. damselae* subsp. *piscicida*, PDSP) 23.2%，第三為弧菌屬的 8.1%，且該調查結果發現，午仔魚細菌性病原的總被分離率有不斷增多的趨勢，尤其與水環境溫度變化確實有正向關聯，當水溫較高期 (夏季) 死亡率攀升的同時，鏈球菌的分離率亦較高，而冬季低水溫期間以發光桿菌為主要被分離之細菌性病原，而本研究在監測優勢病原菌部分，以發光桿菌 (PDSD) 為主，其次是弧菌；而從鏈球菌選擇性培養基判斷，對照戶午仔魚鏈球菌主要是海豚鏈球菌，調查結果與陳 (2023) 病例調查相符。而雖然 PDSD 和 PDSP 都可能造成魚隻疾病，但前者是海水中機會性病原，會在免疫受損或表皮受傷的多種宿主中引發疾病，後者則是高度適應性且對魚類專一性高的病原菌 (Baseggio *et al.*, 2022)，本研究所採樣的午仔魚為健康魚隻，且養殖戶未反應有發病情形，故發光桿菌以 PDSD 為主。

TCBS 除了大部分的弧菌可生長外，發光桿菌 (PDSD) 也可培養出來，並呈現綠色菌落，本研究自午仔魚腸道之 TCBS 菌盤分析結果，經鑑定除了弧菌屬外亦包含發光桿菌，在抑制病原菌監測部分，雖本研究的對照戶和驗證戶非同一管理人，較難以比較，然而從結果得知，投餵益健飼料的弧菌屬 (含發光桿菌) 細菌載量普遍低於對照戶，鏈球菌部分甚至未檢測到。又從黃等 (2016) 洋菜擴散法抑菌試驗可知，短小芽胞桿菌 D5 可抑制腸炎弧菌、霍亂弧菌、海豚鏈球菌、無乳鏈球菌以及發光桿菌 (PDSD) 等，益健飼料應用於業界午仔魚養殖現場確實可降低病原菌。

造成白蝦弧菌感染症的路原有溶藻弧菌、坎氏弧菌、對蝦弧菌 (*V. penaeicida*)、創傷弧菌、熱帶魚弧菌 (*V. damsela*)、腸炎弧菌以及哈威氏弧

菌，而弧菌的存在會受到水質參數條件的影響，如溫度、pH 值、鹽度、溶氧和養殖水體中的營養含量等，當弧菌數量超過 10^4 CFU/ml 可能會導致白便綜合症和弧菌病 (Supono *et al.*, 2019)。Hoa *et al.* (2023) 研究顯示，以滅菌的營養培養基中加 1.5% 氯化鈉浸泡白蝦，正常的白蝦肝胰臟中的總弧菌數約 4.49×10^6 CFU/ml；Thakur (2004) 自改良過的草蝦集約養殖池中發現病蝦肝胰臟中的總弧菌數為 8.3×10^6 CFU/g，高於健康草蝦 2.6×10^6 CFU/g，由以上可知肝胰臟內的弧菌數量受環境影響，而本研究的白蝦皆為正常健康，肝胰臟中總弧菌數除了 6 月有驗到微孢子蟲 (enterocytozoon hepatopenaci, EHP) 陽性而導致弧菌數較高外，其餘月份幾乎都低於 10^4 CFU/ml，根據 Aranguren Caro *et al.* (2021) 研究指出，EHP 和腸炎弧菌菌株之間具協同關係，導致了白便綜合症 (white feces syndrome, WFS) 的表現，因此可解釋本研究在 EHP 陽性的白蝦肝胰臟中總弧菌數較高，而在養殖業者適當處理後，肝胰臟內的弧菌數也隨之下降。

根據陳等 (2022) 研究成果，投餵益健飼料可降低吳郭魚養殖過程中的用藥週期 23 – 55%，總用藥量/飼料量相對比例降低 40 – 86%。然而，雖已知使用益健飼料可以減少抗生素使用量，但在減少細菌抗藥性部分，則需經過長時間的管理與用藥習慣的改變才得以改善。本研究結果顯示，廣效型抗生素如安比西林和安默西林，中廣效型抗生素如林可黴素、史黴素和紅黴素，因在魚病上主要用來治療鏈球菌，故在抑制產氣單胞菌效果不佳之外，在氟滅菌、經四環黴素、氟甲磺氯黴素、脫氧經四環黴素、歐索林酸皆有八成菌株對其具敏感性；而氟滅菌和歐索林酸主要用來治療產氣單胞菌與愛德華氏菌，因此對於鏈球菌抑制效果不佳，然而在可治療鏈球菌的林可黴素、史黴素上，僅三至四成鏈球菌屬菌株對其具敏感性；而自午仔魚養殖池採集之發光桿菌，僅二種抗生素可對八成以上菌株具敏感性，在魚病上可用來治療發光桿菌的氟滅菌僅約二成五菌株具敏感性，安默西林和安比西林則幾乎零；白蝦弧菌部分，經四環黴素主要用來治療弧菌與產氣單胞菌，但本研究僅 31.58% 菌株對其具藥物敏感性。

腸球菌的部分，除了對主要治療革蘭氏陰性

菌的抗生素不具藥物敏感性外，林可黴素、史黴素、氟甲磺氯黴素等可用來治療鏈球菌的抗生素皆無法對一成的菌株具敏感性，由本研究調查結果顯示，腸球菌屬具藥物敏感性的抗生素比鏈球菌少，僅二種抗生素能對六成菌株具敏感性。過去，在腸球菌的抗藥性相關研究發現，其具有多重抗藥性，而屎腸球菌和糞腸球菌是萬古黴素耐藥性最常見的腸球菌類型，尤其在醫院環境中普遍存在 (Cetinkaya *et al.*, 2000)，因此由本研究抑制病原菌結果顯示，益健飼料可以減少病原菌的數量，亦可降低抗藥性基因跨菌種間的水平轉移之風險。

結 論

各養殖場的病原菌情況會因地區、季節及管理方式的不同而有所變化，且影響微生物數量的因素極為複雜，儘管本研究在統計分析中未顯示顯著差異，但結果顯示，餵食含有 10^6 CFU/g 短小芽孢桿菌 D5 的益健飼料可普遍減少魚蝦體內病原菌的數量，尤其在雜食性的吳郭魚上應用效果更為穩定。除了對常見病原菌具有抑制作用，益健飼料還能降低糞腸球菌和屎腸球菌的數量，從整體來看，這有助於減少抗藥性細菌的生成。

參考文獻

- 朱惠真, 黃美瑩, 劉旭展, 曾亮瑋, 潘崇良, 張錦宜 (2016) 自海水蝦篩選抗水產病原弧菌之拮抗菌. 水產研究, 24 (1): 37-50.
- 沈佳穎 (2018) 探討 *Bacillus pumilus* D5 抑制水產養殖病原菌之能力及其抗菌物質特性分析. 國立臺灣海洋大學食品科學系 碩士論文, 72 pp.
- 習孟祖 (2021) 鹽度對金目鱸 (*Lates calcarifer*) 腸道之菌相、細胞激素基因表現與組織構造的影響. 國立中興大學生命科學系 碩士論文, 66 pp.
- 陳婉資 (2023) 養殖午仔魚主要細菌性病原鑑定及疾病研析. 國立屏東科技大學獸醫學系所 碩士論文, 84 pp.
- 陳建彰, 劉佩紋, 謝豐群, 黃美瑩, 周瑞良, 蘇慧敏, 郭裔培, 楊順德 (2022) 淡水經濟魚種益健飼料最適應用研究 (II). 2023年度研究報告, 52.
- 黃美瑩、朱惠真、廖哲宏、曾福生、林泓廷 (2022) 水產病原弧菌之拮抗菌-*Bacillus pumilus* D5 抗菌物質之探討. 水產研究, 30 (2): 15-29.
- 黃美瑩、朱惠真、陳力豪、劉旭展、曾亮瑋、潘崇良、

- 張錦宜 (2016) 飼料中添加益生菌 *Bacillus pumilus* D5 對於白蝦成長、免疫反應及抗腸炎弧菌效率之影響。水產研究, 24 (2): 57-69.
- Abdelhamid, M. A., M. I. El-Barbary, and M. E. Mabrouk (2013) Bacteriological status of Ashtoum El-Gamil protected area. Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 17 (3): 11-23.
- Ahmad, A., O. M. F. Al-Khozai, A. A. Sharad, and G. Usup (2017) Isolation, identification and distribution of potentially pathogenic bacteria associated with selected water bodies and fish organs in different locations in Peninsular Malaysia. Int. J. Adv. Sci. Tech. Res., 7 (1): 323-342.
- Aly, S. M., M. E. Abou-El-Atta., H. S. El-Mahallawy., A. Elasad., F. A. ElAbyad and N. Elbanna (2023) . *Aeromonas veronii* and ulcerative syndrome in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their associated factors. Aquac. Int., 1-15.
- Aranguren Caro, L. F., H. N. Mai, R. Cruz-Florez, F. L. A. Marcos, R. R. R. Alenton, and A. K. Dhar (2021) Experimental Reproduction of White Feces Syndrome in Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). PLoS ONE, 16 (12): e0261289.
- Baseggio, L., O. Rudenko, J. Engelstädter, and A. C. Barnes (2022) The evolution of a specialized, highly virulent fish pathogen through gene loss and acquisition of host-specific survival mechanisms. Appl. Environ. Microbiol., 88 (14): e00222-22.
- Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall (2000) Vancomycin-resistant Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 13 (4): 686-707.
- Chen, M. H., S. W. Hung., C. L. Shyu., C. C. Lin., P. C. Liu., C. H. Chang., W. Y. Shia., C. F. Cheng., S. L. Lin., C. Y. Tu., Y. H. Lin and W. S. Wang (2012) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. Res. Vet. Sci., 93 (2): 581-588.
- Cruz, P. M., A. L. Ibáñez., O. A. M. Hermosillo., and H. C. S. Ramírez (2012) Use of Probiotics in Aquaculture. ISRN Mic., 2012 (916845): 13.
- Cruz-Florez, F. L. A. Marcos, R. R. R. Alenton, and A. K. Dhar (2021). Experimental reproduction of White Feces Syndrome in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). PLoS ONE, 16 (12): 1-14.
- Deng, Y., Y. Zhang, H. Chen, L. Xu, Q. Wang, and J. Feng (2020) Gut-liver immune response and gut microbiota profiling reveal the pathogenic mechanisms of *Vibrio harveyi* in pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀). Front. Immunol., 11: 607754.
- Du, S., W. Chen, Z. Yao, X. Huang, C. Chen, H. Guo, and D. Zhang (2021) *Enterococcus faecium* are associated with the modification of gut microbiota and shrimp post-larvae survival. Anim. Microbiome, 3: 88.
- Ellis, A. E. (2001) Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. Fish Shellfish Immunol., 11 (4): 287-294.
- FAO (2024) The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in Action. FAO Fisheries Report No. 0683, Rome, 225 pp.
- Hanchi, H., W. Mottawea, K. Sebei and R. Hammami (2018) The Genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns - An update. Front. Microbiol., 9: 1791.
- Hoa, T. T. T., M. S. Fagnon, D. T. M. Thy, T. Chabrilat, N. B. Trung, and S. Kerros (2023) Growth performance and disease resistance against *Vibrio parahaemolyticus* of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed essential oil blend (Phyto AquaBiotic). Animals, 13 (3320): 1-12.
- Ibrahim, G. A., M. Mabrok, K. J. Alfifi, M. Alatawy, A. S. Al-otaibi, A. M. Alenzi, A. N. Abdel Rahman, R. M. S. El-Malt, S. A. Ibrahim, R. M. El-Tarabili, and A. M. Algammal (2024) Pathogenicity, resistance patterns, virulence traits, and resistance genes of re-emerging extensively drug-resistant (XDR) *Aeromonas veronii* in *Oreochromis niloticus*. Aquac. Int., 32: 6987-7006.
- Jiao, F., L. Zhang, S. M. Limbu, H. Yin, Y. Xie, Z. Yang, Z. Shang, L. Kong, and H. Rong (2023) A comparison of digestive strategies for fishes with different feeding habits: digestive enzyme activities, intestinal morphology, and gut microbiota. Ecol. Evol., 13: 1-14.
- Liao, P. C., Y. L. Tsai., Y. C. Chen., and P. C. Wang., S. C. Liu and S. C. Chen (2020) Analysis of *Streptococcal* infection and correlation with climatic factors in cultured tilapia *Oreochromis* spp. in Taiwan. Appl. Sci., 10 (11): 4018.
- Liu, H., X. Guo, R. Gooneratne, R. Lai, C. Zeng, F. Zhan, and W. Wang (2016) The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. Sci. Rep., 6: 24340.
- Liu, P. C., K. K. Lee., Y. K. Ching., G. H. Kou and S. N. Chen (1996) News & Notes: isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol., 33 (2): 129-132.
- Maulu, S., O. J. Hasimuna, L. H. Haambiya, C. Monde, C. G. Musuka, T. H. Makorwa, B. P. Munganga, K.

- J. Phiri, and J. D. Nsekanabo (2021). Climate change effects on aquaculture production: Sustainability implications, mitigation, and adaptations. *Front. Sustain. Food Syst.*, 5: 1-15.
- Meron, D., N. Davidovich, M. Ofek-Lalzar, R. Berzak, A. Scheinin, Y. Regev, R. Diga, D. Tchernov, and D. Morick (2020) Specific pathogens and microbial abundance within liver and kidney tissues of wild marine fish from the Eastern Mediterranean Sea. *Microb. Biotechnol.*, 13 (3): 770-780.
- Murray, B. B. (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3 (1): 46-65.
- Nayak, S. K. (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.*, 41 (11): 1553-1573.
- Noroozi, N., H. Momtaz and E. Tajbakhsh (2022) Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from seafood samples. *Vet. Med. Sci.*, 8 (3): 1104-1112.
- Park, Y., H. Kim., S. Won., A. Hamidoghli., Md T. H., I. Kong and S. Bai (2020). Effects of two dietary probiotics (*Bacillus subtilis* or *licheniformis*) with two prebiotics (mannan or fructo oligosaccharide) in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquac. Nutr.*, 26 (2): 316-327.
- Poole, K. (2012) Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.*, 20 (5): 227-234.
- Pujalte, M. J., M. Ortigosa, M. C. Macián, and E. Garay (2003) *Vibrio* species associated with molluscan microbiota. *Aquat. Living Resour.*, 16 (3): 401-405.
- Reverter, M., S. Sarter., D. Caruso., J. C. Avarre., M. Combe, E. Pepey., L. Pouyaud., S. Vega-Heredía., H. de Verdal and R. E. Gozlan (2020) Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nat. Commun.*, 11 (1): 1870.
- Sakata, T. and Y. Koreeda (1986) A numerical taxonomic study of the dominant bacteria isolated from tilapia intestines. *Bull. Jap. Socie. Sci. Fish.*, 52 (9): 1625-1634.
- Simón, R., F. Docando, N. Nuñez-Ortiz, C. Tafalla, and P. Diaz-Rosales (2021) Mechanisms used by probiotics to confer pathogen resistance to teleost fish. *Front. Immunol.*, 12: 653025.
- Sousa, A. de J., J. da Costa Eiras, M. Jose, T. Ran-zani-Paiva, and A. C. Alexandrino (1999) Bacteriology of wild grey mullets, *Mugil platanus* Gunther, from Cana-neia, Sao Paulo State, Brazil. *Rev Bras Zool.*, 16: 1065-1069.
- Sun, B., B. Sun, B. Zhang and L. Sun (2022) Temperature induces metabolic reprogramming in fish during bacterial infection. *Fro. Imm.*, 13: 1010948.
- Supono, Wardiyanto, E. Harpeni, A. H. Khotimah, and A. Ningtyas (2019) Identification of *Vibrio* sp. as cause of white feces diseases in white shrimp *Penaeus vannamei* and handling with herbal ingredients in East Lampung Regency, Indonesia. *AAFL Bioflux*, 12 (2): 417-425.
- Suzuki, K. (2018) Stress and immune function in fish: A review focusing on bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 83: 190-202.
- Tey, Y. H., K. J. Jong., S.Y. Fen and H.C. Wong (2015) Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in the aquacultural environments of Taiwan. *J. Food Prot.*, 78 (5): 969-976.
- Thakur, A. B., R. B. Vaidya, and S. A. Suryawanshi (2004) *Vibrio* abundance in modified extensive culture ponds of *Penaeus monodon*. *Indian J. Fish.*, 51 (2): 147-152.
- Tort, L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35 (12): 1366-1375.
- Wichtel, M. E., S. G. Fenwick., J. Hunter., A. Stephenson., D. Martin and J. J. Wichtel (2003) Septicaemia and septic arthritis in a neonatal calf caused by *Lactococcus lactis*. *Vet. Rec.*, 153 (1): 22-3.
- Wu, S., G. Wang, E. R. Angert, W. Wang, W. Li, and H. Zou (2012) Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS One*, 7 (3): e30440.
- Wu, Y. S., T. Y. Tseng and F. H. Nan (2016) Beta-1,3-1,6-glucan modulate the non-specific immune response to enhance the survival in the *Vibrio alginolyticus* infection of Taiwan abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Fish Shellfish Immunol.*, 54: 556-563.
- Zahran, E., H. A. Mahgoub, F. Abdelhamid, J. R. Sadeyen, and E. Risha (2019) Experimental pathogenesis and host immune responses of *Enterococcus faecalis* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 512: 734319.

Evaluation of Pro-Health Aquafeed's Efficacy in Inhibiting Internal Bacterial Pathogens in Farmed Fish and Shrimp

Pei-Wen Liu*, Chia-Hsun Lin, Chien-Chang Chen, Feng-Chun Hsieh and Shuenn-Der Yang

Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The global aquaculture industry's expansion, driven by technological advancements and increasing market demand, faces heightened risks of bacterial diseases, exacerbated by climate change and high-density farming practices. This study investigated the efficacy of pro-health aquafeed containing the probiotic *Bacillus pumilus* D5 in inhibiting pathogenic bacteria in farmed aquatic animals. We selected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Asian seabass (*Lates calcarifer*), East Asian fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*), and white shrimp (*Penaeus vannamei*) from 10 private aquaculture farms. An experimental diet containing *B. pumilus* D5 at 10^6 CFU/g was regularly administered, and bacterial loads of *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., and *Aeromonas* spp. were monitored in the liver, spleen, intestine, or hepatopancreas of the animals. We also identified dominant pathogens and assessed their antibiotic susceptibility. Results consistently showed that the pro-health aquafeed inhibited pathogens across all tested species. In Nile tilapia, intestinal *Streptococcus* spp. and *Vibrio* spp. decreased by over 82.20% and 75.00%, respectively, while liver *Aeromonas* spp. dropped by at least 85.48%. Asian seabass exhibited reductions of over 92.06% for *Streptococcus* spp. in liver and intestine, more than 46.60% for intestinal *Vibrio* spp., and 99.96% for liver *Aeromonas* spp. For East Asian fourfinger threadfin, intestinal *Vibrio* spp. (including *Photobacterium* spp.) was reduced by one log, and *Streptococcus* spp. was undetectable. White shrimp consistently maintained *Vibrio* spp. loads below 10^3 CFU/g in the hepatopancreas across multiple samples. *A. veronii* predominated in Nile tilapia and Asian seabass. *Ph. damsela* subsp. *damsela* (PDSD) was the main pathogen in East Asian fourfinger threadfin, and *V. parahaemolyticus* was dominant in white shrimp. Notably, over 50% of pathogenic strains from the experimental group demonstrated susceptibility to at least four antibiotics. In conclusion, diets supplemented with *B. pumilus* D5 effectively reduce common pathogens in aquatic animals, thereby mitigating the risk of antibiotic-resistant pathogen emergence.

Key words: probiotics, bacterial pathogens, pro-health aquafeed, inhibitory capacity

*Correspondence: No. 106, Haipu Ln., Lukang Township, Changhua County 505, Taiwan. TEL: (04) 777-2175 ext. 2206; FAX: (04) 777-5424; E-mail: pwliu@mail.tfrin.gov.tw