

# 益生菌篩選及其在蝦苗培育之應用研究初報

郭錦朱<sup>1</sup>、鄭新鴻<sup>1</sup>、劉冠甫<sup>1</sup>、張錦宜<sup>2</sup>、賴俊吉<sup>3</sup>  
許月娥<sup>1</sup>、楊佳諺<sup>1</sup>、陳凰琴<sup>1</sup>、洪昆龍<sup>1</sup>、陳紫娛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>水產試驗所東港生技研究中心、<sup>2</sup>水產試驗所水產養殖組

<sup>3</sup>國立高雄第一科技大學環境與安全衛生工程系

益生菌 (probiotics) 係指藉由抗菌化合物的分泌與作用、附著空間的競爭、免疫功能的調節、微生物相平衡的改善而促使宿主成長與健康之活微生物。益生菌的篩選，通常有四種評估標準，一為附著能力，二為拮抗病原的能力，三為免疫力，四為對宿主成長與活存的影響 (Balcazar et al., 2006; Vine et al., 2006)。近年來，益生菌在水產養殖的應用研究，有直接加入養殖池或飼料或經中間媒介 (如豐年蝦、輪蟲) 投餵魚蝦貝類，已證實對疾病預防、環境改善以及養殖生物的成长與健康具顯著效益；目前相繼發表的

益生菌種類眾多，包含酵母菌 (*Debaryomyces*、*Phaffia*、*Saccharomyces*)、格蘭氏陽性菌 (*Bacillus*、*Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Micrococcus*、*Streptococcus*、*Weissella*) 及格蘭氏陰性菌 (*Aeromonas*、*Alteromonas*、*Photobacterium*、*Pseudomonas*、*Vibrio*) 等 (Verschuere et al., 2000; Gatesoupe, 1999)。本研究擬評估產氫發酵廢液在水產養殖應用之可行性，結果如表所示；發酵廢液中接種哈維弧菌、鏈球菌及光桿菌的濃度在 2—4 cfu/ml 時，於培養初期具抑制作用，24

產氫發酵廢液分別與哈維弧菌(*Vibrio harveyi*)、鏈球菌(*Streptococcus iniae*)、光桿菌(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)一起培養之競爭排除力

| 處理組                                        | 培養時間(h) | 病原菌  |     |     | 發酵廢液 |
|--------------------------------------------|---------|------|-----|-----|------|
|                                            |         | 哈維弧菌 | 鏈球菌 | 光桿菌 |      |
| 對照組                                        | 0       | +++* | +++ | +++ | ±    |
|                                            | 4.5     | +++  | +++ | +++ | +    |
|                                            | 24      | +++  | +++ | +++ | +++  |
| 發酵廢液中接種病原菌<br>2-4 × 10 <sup>4</sup> cfu/ml | 0       | +++  | ±   | ±   | -    |
|                                            | 4.5     | +++  | +++ | +++ | -    |
|                                            | 24      | +++  | +++ | +++ | -    |
| 發酵廢液中接種病原菌<br>2-4 cfu/ml                   | 0       | ±    | ±   | ±   | -    |
|                                            | 4.5     | +    | +   | +   | -    |
|                                            | 24      | +++  | +++ | +++ | -    |

\* 菌落量；±：0-6 cfu；+：<200 cfu；++：>200 cfu & <400 cfu；+++：>400 cfu

小時後則完全無效；顯然發酵廢液可能含微量的抑菌物質，且其中的菌相可能增長緩慢或相互拮抗。因此，將發酵廢液塗抹於培養基，依不同的外部形態，篩得 3 株候選益生菌的單離菌株。

## 益生菌的鑑定與評估

候選益生菌之單離菌株經 16S rRNA 鑑定，確定皆為枯草桿菌，分別為 *Bacillus foraminis* (圖 1)、*B. fusiformis* (圖 2) 及 *B. cereus biovar toyoi*，其中 *B. cereus biovar toyoi*

接種於血液培養基具溶血特性 (圖 3)。三株候選益生菌進行生體外拮抗病原的競爭排除力評估 (圖 4—6)，經與鏈球菌一起培養，再定期採樣觀測菌相。結果發現，*B. cereus biovar toyoi* 對鏈球菌的拮抗力最強，*B. fusiformis* 次之，顯然這二株菌具備作為益生菌之潛能。



圖 3 候選益生菌 *Bacillus cereus biovar toyoi* (右圖為該菌在血液培養基具溶血特性)



圖 1 候選益生菌 *Bacillus foraminis*



圖 4 候選益生菌 *Bacillus foraminis*(B)與鏈球菌(S)一起培養未呈優勢



圖 2 候選益生菌 *Bacillus fusiformis*



圖 5 候選益生菌 *Bacillus cereus*(B)與鏈球菌(S)一起培養呈優勢



圖 6 候選益生菌 *Bacillus fusiformis*(B)與鏈球菌(S)一起培養呈優勢

## 益生菌在蝦苗培育之應用

將生體外具拮抗病原能力的候選益生菌 *B. cereus biovar toyoi* 與 *B. fusiformis*，每天分別加入草蝦苗培育水中；供試草蝦自眼幼蟲第 1 期 (Z1) 培育至後期幼蟲第 1 期 (P1)。結果發現，每天投餵 *B. cereus biovar toyoi* 者，蝦苗的活存率僅 2%，明顯低於對照組的 73%與 *B. fusiformis* 添加組的 89%；由監測培育水的菌相，得知 *B. cereus biovar toyoi* 增長迅速，第 2 天已增殖為強勢的優勢菌種，而 *B. fusiformis* 在繁殖水中亦為優勢種，不過一直維持在適當的密度 (圖 7)；因此，推估 *B. cereus biovar toyoi* 可能增長太快或添加量太多，以致嚴重威脅蝦苗的活存空間或必須的物化元素。

鑑於 *B. fusiformis* 對草蝦苗的培育成效優於 *B. cereus biovar toyoi*，於是將其應用於白蝦的繁殖，自 Z1 培育至 P1，處理方式分為每天及隔天添加二種。結果發現，每天添加組成效最佳，隔天添加組次之，活存率分別為 88%與 55%，皆與對照組的 41%有顯著

差異。顯然培育草蝦與白蝦苗時添加 *B. fusiformis*，有提高蝦苗活存效果，*B. fusiformis* 確為益生菌。至於 *B. cereus biovar toyoi* 雖對草蝦苗的活存具不良影響，不過，仍可進一步評估在不同應用方式下成為益生菌的可能性。

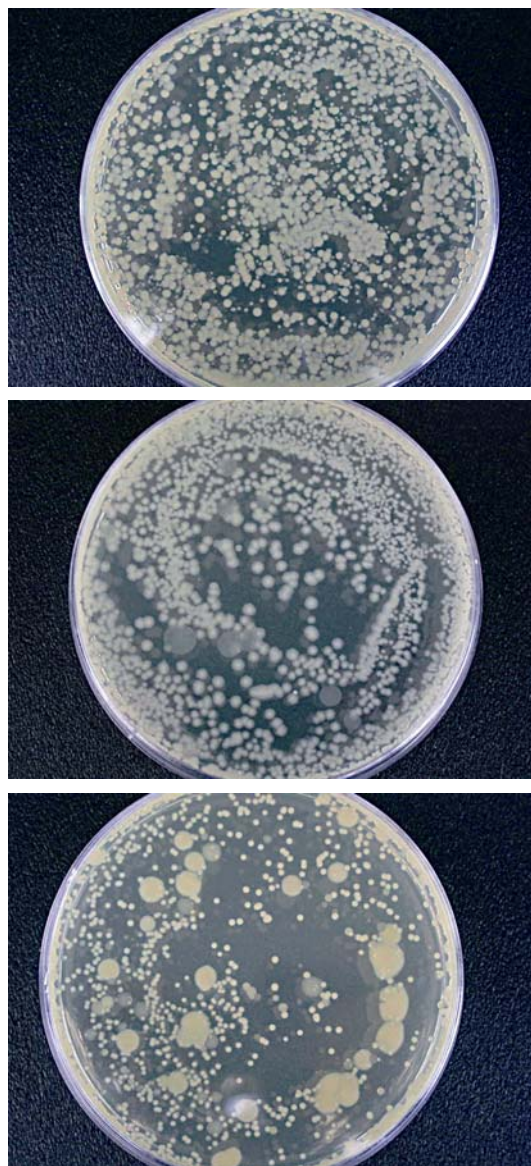


圖 7 草蝦苗培育水之菌相：上為對照組；中為 *Bacillus cereus biovar toyoi* 添加組；下為 *B. fusiformis* 添加組