

益生菌在水產養殖上的應用

朱惠真、黃美瑩、鄧晶瑩、許晉榮

水產試驗所水產養殖組

前言

隨著水產養殖迅速發展，水產動物的病害問題層出不窮，傳統抗生素治療雖快速且積極有效，但長期使用會形成嚴重的負面效應，不僅造成病原菌對抗生素產生抗藥性，抗生素本身也會因為殘留在環境中而造成污染，可能會藉由食物鏈的累積而影響人體健康。近年來水產品屢屢因為藥物殘留導致出口受阻，讓業者蒙受重大損失。基於此，國內外研究單位積極研發可以取代藥物來預防治療的物質，例如利用抗菌勝肽提高魚蝦的抗病能力，發展專一性的疫苗或是投放益生菌(probiotics)等(韓等, 2016)。益生菌一詞目前多半採用 1974 年 Parker 的定義，指的是一群有利於腸道微生物平衡的細菌，延續 Parker 的定義，Fuller 在 1989 年提出益生菌是指活的微生物飼料添加物，它能夠促進宿主腸內微生物菌相平衡，進而對宿主產生正面效益。Salminen 等 (1999) 將益生菌定義為對宿主健康有益的微生物或其細胞組成物。

益生菌在醫學上的應用

李等 (2010) 指出，益生菌在醫學上的功能包括：(1)調節腸胃功能：對於腹瀉便秘等腸道疾病，有預防與治療的效果，例如乳酸桿菌 GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG) 就有這種功能；(2)增強腸道免疫力：可以刺激胸腺和脾臟等免疫器官，激發體液免疫以及細胞免疫；(3)抑制過敏反應：調節機體免疫反應，防止過敏性疾病的發生以及減緩遺傳性過敏反應，益生菌的免疫調節功能主要通過激活巨噬細胞，提高抗發炎反應細胞並增強自然殺手細胞和免疫球蛋白的活性而產生；(4)保護心血管系統：研究發現，乳酸菌在厭氧的條件下以及環境中有膽鹽及高膽固醇時，益生菌細胞可以直接吸收膽固醇而降低其含量，另外在餵食高膽固醇豬隻的實驗中也發現，添加乳酸桿菌 RP32 能有效減緩豬隻血液中膽固醇的含量 (Gillil et al., 1985; 張等, 2015)。乳酸菌等益生菌在生長的過程中，菌體本身含有的膽鹽水解酶 (bile salt hydrolases, BSHs)，可以催化氨基酸或牛磺酸結合膽鹽水解，並分解成為游離膽酸和胺基酸 (Begley et al., 2006)，另膽鹽水解酶還有保護菌體細胞免受膽鹽毒害，進而提高細胞自身存活率。有關於益生菌降血壓的作用機制，有報告指出，牛奶中的乳酸菌細胞壁分

泌蛋白酶 (protease) 將牛奶蛋白降解為寡肽 (oligopeptide)，再由細胞勝肽酶 (intercellular peptidases) 將其分解為短鏈勝肽，其中包括可產生抑制血管緊張素轉化酶活性抑制勝肽 (angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, ACEI)，在原發性高血壓大鼠和高血壓患者體內表現出降血壓的作用 (Ricci et al., 2010; Wang et al., 2008)。

益生菌在水產養殖上的應用

一、益生菌在提昇免疫力之應用

以益生菌的應用種類來說，陸上生物比較常使用的益生菌是以乳酸菌為主，相對而言，水產上可以使用的益生菌種類就較為豐富，包括格蘭氏陰性菌及格蘭氏陽性菌或是其它非微生物卻有益生菌功能的有機物如噬菌體、微藻類和酵母菌等 (Hai, 2016)。格蘭氏陽性菌在水產上主要用為益生菌的種類為芽孢桿菌類 (*Bacillus* spp.)，其次為乳酸球菌屬 (*Lactococcus* spp.)、乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus* spp.) 及鏈球菌屬 (*Streptococcus* spp.)。格蘭氏陰性菌則主要為產氣性單孢菌屬 (*Aeromonas* spp.) 及假單胞菌屬 (*Pseudomonas* spp.)。溶源性噬菌體 (lysogenic phages) 可以將有毒害性的菌種轉型為無毒害性的菌種 (Rao and Lalitha, 2015)。以往的研究顯示，這些益生菌有的可以刺激水產生物的非特異性抵抗力 (nonspecific resistance)，例如虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 飼食含丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 之飼料，可以提高對弧菌的抵抗力及增加吞噬細胞的活性

(Balcazar et al., 2006)。芽孢桿菌類也被發現具有激活草蝦 (*Penaeus japonicus*) 免疫系統的能力 (Rengpipat et al., 2000)。利用杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*) 所培養的豐年蝦可以減少水中致病性弧菌 (*Vibrio campbellii* 和 *Vibrio proteolyticus*) 的感染 (Marques et al., 2006)。Swain 等 (2009) 利用海豹鏈球菌 p180 (*Streptococcus phocae* p180) 成功的降低哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 對草蝦的感染。Tseng 等 (2009) 添加枯草芽孢桿菌 E20 (*Bacillus subtilis* E20) 的飼料餵養白蝦 (*Litopenaeus vannamei*)，結果發現，餵食添加益生菌組之血球酚氧化酶 (phenoloxidase) 的活性較控制組高出 1.3–2 倍；以溶藻弧菌攻擊白蝦後，白蝦巨噬細胞吞噬作用活性和清除效率較控制組明顯增高 10–22% 及 38–84%，顯示在白蝦飼料當中添加 *B. subtilis* E20 具有良好免疫激活的效果。

二、益生菌在水質改善上的應用

氨氮分子會造成 DNA 的斷裂並使細胞膜破壞，以硝化細菌屬 (*Nitrobacteriia* spp.) 的假單胞菌和芽孢桿菌組成的複合益生菌，可以經由各益生菌之間的協同作用而顯著降低氨氮含量及亞硝酸鹽濃度 (Cha et al., 2013)。張等 (2010) 將 3 種不同的複合式益生菌施用於菲擬醫蛭 (*Hirudinaria manillensi*)，分析這些益生菌對其活存率及環境耐受性的影響。結果發現 EM 複合益生菌 (硝化細菌、酵母菌、枯草芽孢桿菌、乳酸菌和光合細菌所組成) 在降低氨氮和亞硝態氮含量的效果優於複合益生菌 T1 (由亞硝化細菌、硝化細菌、反硝化細菌所組成)，顯示由數種硝化細菌所組成的複合益生菌降解氨氮

的能力並沒有加成作用，而 EM 複合益生菌彼此之間的共生或協同關係，反而提高其降解氨氮能力，換言之，複合益生菌的種類及比例是很重要的關鍵。另外，硫化物對水產動物具有一定的毒性，陳等 (2016) 指出，益生菌在分解硫化物質時以硫化物氧化酶最為重要。目前已有文獻證實以 *B. subtilis*、沼澤紅假單胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)、乾酪乳桿菌 (*Lactobacillus casei*) 和啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 組成的複合益生菌對於降解養殖池水中的硫化物具有極佳效果 (朱，2011)。

三、益生菌應用於魚類生殖

益生菌通除了用於促進魚類的免疫以及健康外，有機體的生殖及代謝也有關係。有些益生菌可以產生細胞外分泌型的酵素，如蛋白酶、澱粉酶、脂解酶、纖維素酶等，可以促進有機體的代謝以及營養物質的吸收 (Dutta and Ghosh, 2015)。Avelle 等 (2012) 就指出，*L. rhamnosus* 可以促進消化酵素的分泌而促進斑馬魚的成長。Abasali 和 Mohamad (2010) 研究顯示，益生菌 *Lactobacillus* sp. 可以提高劍尾魚 (*Xiphophorus maculatus*) 的性腺指數 (gonadosomatic index, GSI)、促進性腺的肥滿度、提高魚苗的活存率以及增加魚苗的體重。

益生菌的發展趨勢與展望

目前本所研發的益生菌 *Bacillus pumilus* D5 (簡稱 D5) 是從 4 種海水魚、蝦樣品中分離純化之 84 個菌株中的一株，它具有抑制溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、腸炎弧菌

(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 及創傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 等 6 種常見水產病原菌之能力，同時也可抑制大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) (圖 1) (朱等，2016)。一般建議使用的益生菌應該以不具抗生素抗性的菌種為宜，本所自白蝦中分離出的 D5 菌株在所測試的 15 種抗生素中，只有對 lincomycin 具有抵抗能力，對其他 14 種抗生素均有敏感性 (朱等，2016)，符合益生菌應該以不具抗生素抗性的菌種為宜之規範。在飼料中添加本菌餵食白蝦 8 週後，雖然對於白蝦的成長無明顯效益，卻可提高蝦子的免疫力，白蝦血液中酚氧化酶活性及呼吸爆 (oxygen burst) 均提高，以腸炎弧菌做攻擊性試驗，也發現投餵 D5 的白蝦之活存率較高 (圖 2) (黃等，2016)。

益生菌未來可朝向下列方向開發：(1)針對不同養殖階段、品種或是環境 (耐高溫、耐高鹽) 研發高效能的益生菌；(2)探討可發揮最高效益的複合菌最適配比；(3)開發可促進魚介類營養吸收的益生菌，尤其未來可能以植物性蛋白源取代魚粉，如何提高水生動物對非魚粉的替代飼料之吸收，將是日受重視的研究方向。商業化的微生物製劑在養殖上是具有開發潛力的，目前已經有很多不同型態的微生物製劑或是複合型的益生菌被研發出來，但是在養殖上的應用仍然效益不彰，主要是因為養殖業者不知道如何正確的使用，也不清楚每種益生菌適用的養殖種類，因此加強養殖業者的相關知識，以取代

抗生素的使用顯然是必需的。另外，益生菌對魚類生理方面的功效是一個剛發展的領域，其機制還待深入研究，未來如能有效的

應用在經濟魚種上，必定能促使養殖產業更進一步的發展。

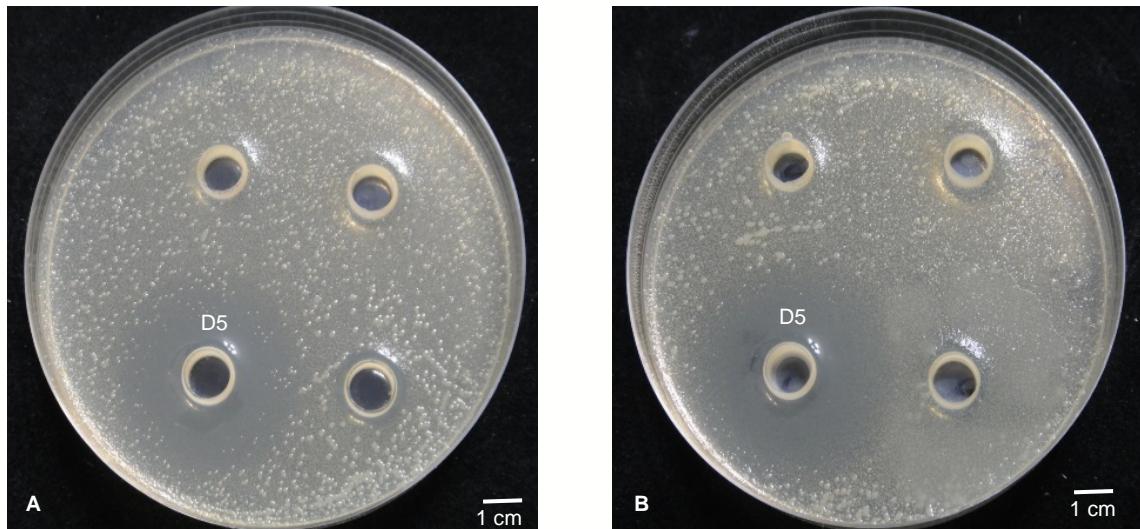


圖 1 *Bacillus pumilus* D5 抑制弧菌的能力 (A：腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 的抑菌圈達 3 mm；B：哈維氏弧菌 (*V. harveyi*) 的抑菌圈達 5 mm)

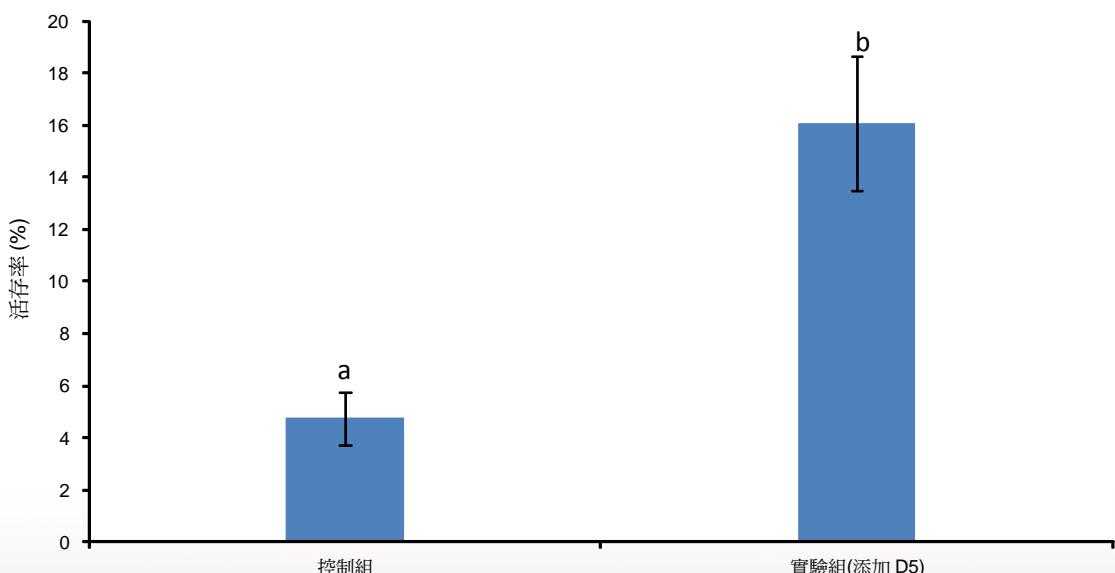


圖 2 將蝦飼料混合 *Bacillus pumilus* D5 投餵白蝦 8 週後，以腸炎弧菌進行攻擊性試驗，結果顯示有助於提高白蝦之存活率 ($p < 0.05$)