

## 魚蝦腸道益生乳酸菌的篩選及其特性研究

藍惠玲\* · 吳建威 · 陳文君 · 謝孟真 · 吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

### 摘 要

在全世界逐漸減少抗生素使用下，從預防醫學角度，發展益生菌作為添加物來誘導強化魚、蝦自體的防禦力，可以提高對抗感染與疾病的能力已成為一種趨勢。本研究之目的為評估魚蝦腸道中乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 作為益生菌 (probiotics) 之可行性。自石狗公 (*Sebastes marmoratus*)、赤鯨 (*Dentex tumifrons*)、草蝦 (*Penaeus monodon*) 及胭脂蝦 (*Aristeus virilis*) 等的腸道篩選分離出四株乳酸菌，鑑定屬於 *Enterococcus* sp., *Lactobacillus sakei*, *L. farciminis*, *Leuconostoc* sp.。四株菌皆具有耐酸性 (pH 3.0)、耐膽鹽性 (0.4% bile salt)、耐鹽性 (3% NaCl) 之能力，也具有吸附鯉魚上皮細胞和人類腸道 Caco-2 細胞之能力；於十三株弧菌屬病原菌之抑菌試驗，對副溶血弧菌、溶藻弧菌、鰻弧菌等皆具有拮抗性，針對十一種抗生素藥敏試驗，對於氯黴素及四環素具有敏感性 (即無抗藥性)。此外，也顯示具有清除 ABTS 自由基及超氧陰離子、螯合亞鐵離子等抗氧化性。

關鍵詞：乳酸菌、益生菌、抑菌、腸道吸附、抗氧化性

### 前 言

我國的水產養殖產業鼎盛，惟採用高度集約養殖，水產動物較易受病毒、細菌、原蟲的侵襲而死亡。其中，弧菌屬 (*Vibrio* spp.) 細菌感染常導致魚蝦疾病叢生，經濟損害嚴重 (Defoirdt and Boon, 2007)。根據聯合國農糧組織 FAO (Food and Agriculture Organization) 的統計，全世界水產養殖因疾病的損失約 US\$ 30 億 (Subasinghe, 2001)。通常業者使用抗生素和化學藥劑控制疫情，但藥物長期使用會導致養殖環境惡化、藥物殘留及抗藥菌 (antibiotic resistant bacteria) 等後遺症，並產生食用安全上的問題 (Sambasivam *et al.*, 2003; Cabello, 2006)。歐盟自 2006 年即禁止使用抗生素作為動物飼料的添加劑，因此如何提高養殖魚蝦類本身的抗病力愈顯重要。

近年來微生物生態療法受重視，包括利用營養調整、抗菌調整、腸內菌群促進物質和活菌製

劑等，來恢復和穩定原有的菌相平衡而抵抗病原菌 (宋等, 2007; Panigrahi and Azad, 2007)，因此，開發益生菌及疫苗之病害防治技術與產品，應用在水產養殖業的需求日趨殷切 (Pauly and Christensen, 2002; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008)。Ringø and Gatesoupe (1998) 指出 *Carnobacterium* (*C.*)、*Lactobacillus* (*L.*)、*Leuconostoc* (*Leu.*) 與 *Streptococcus* (*S.*) 等乳酸菌是健康魚類腸道之菌叢。前田 (2009) 指出分離自斑節蝦腸道的 *L. plantarum* 及 *Pediococcus pentosaceus* 可抑制弧菌病原菌 *Vibrio* (*V.*) *penaеicida* 的增殖。佐藤 (2008) 指出 *Enterococcus* (*E.*) *faecalis* 可作為魚類成長促進劑。Nikoskelainen *et al.* (2003) 指出，以 *L. rhamnosus* 投餵虹鱒 4 週，免疫力明顯提高。José *et al.* (2007) 指出，篩選自成蝦腸道之 *V. alginolyticus*、*Bacillus* (*B.*) *subtilis*、*Roseobacter* (*R.*) *gallaeciensis* 及 *Pseudomonas* (*P.*) *aestumarina* 等四株菌投餵白蝦四週，存活率及抗病力均高於對照組。Das *et al.* (2010) 指出，以海洋來源的 *Streptococcus* sp. 投餵豐年蝦及草蝦，可提高成長率及抑制病原菌之效果。最近，Aditya *et al.* (2008)

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: hllan@mail.tfrin.gov.tw

清楚地指出投餵益生菌作為消化道內乳酸菌叢之調整，預期可作為疾病預防的手段。Verschuere *et al.* (2000) 提出，因應水產養殖的特性，益生菌可透過餌料直接飼餵動物，或施用於水體藉由改善養殖環境而發揮作用。目前水產養殖使用之益生菌多來自於陸生動植物，在水產生物體內的作用機制及適用性仍不明瞭。因此，本研究針對四種魚蝦腸道進行乳酸菌菌株的分離，測定其作為益生菌所需的特性（酸、膽鹽耐受性、吸附性及抗菌活性）以及分類鑑定。在全世界逐漸減少抗生素的使用趨勢下，本研究的目的希望藉由篩選魚蝦腸道的益生菌，俾供應用於水產養殖之可行性探討。

## 材料與方法

### 一、材料

#### (一) 試驗用魚蝦

試驗用魚蝦取樣自臺灣省基隆市之和平島、碧砂漁港魚市場購得之石狗公 (*Sebastes marmoratus*)、赤鯨 (*Dentex tumifrons*)、胭脂蝦 (*Aristeus virilis*) 以及獲自行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心之草蝦 (*Penaeus monodon*)。

#### (二) 細胞株

C2BBel 細胞株 BCRC 60182 (human colon adenocarcinoma, clone of Caco-2) 購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心；魚類的上皮細胞 (epithelioma papillosum cyprinid, EPC) 由國立臺灣海洋大學水產養殖學系周信佑教授提供。

#### (三) 抑菌測試用菌株

選擇魚蝦病原菌十四株，包括 *Aliivibrio salmonicida* BCRC 12844、*Listonella (Lis.) anguillarum* BCRC12908、*Lis. anguillarum* AC-90-2722、*Lis. anguillarum* AC-91-2722、*V. alginolyticus* BCRC 12829、*V. alginolyticus* AL-90-E-9、*V. alginolyticus* 90061、*V. harveyi* BCRC12907、*V. harveyi* AF-00-356、*V. parahaemolyticus* BCRC 12865、*V. parahaemolyticus*

AC-93-2866-HP、*V. parahaemolyticus* P-896-2、*V. parahaemolyticus* AC-91-564-a2、*V. vulnificus* TG 617 等，由行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組張錦宜博士提供。

### (四) 藥敏試驗用抗生素

包括安比西林 (ampicillin, 10 µg)、氯黴素 (chloramphenicol, 30 µg)、紅黴素 (erythromycin, 15 µg)、建它黴素 (gentamicin, 10 µg)、康黴素 (kanamycin, 30 µg)、新黴素 (neomycin, 30 µg)、諾伯黴素 (novobiocin, 30 µg)、多黏菌素 (polymyxin B, 300 U)、鏈黴素 (streptomycin, 10 µg)、四環素 (tetracycline, 30 µg) 和梵谷黴素 (vancomycin, 30 µg) 等十一種抗生素 [(BD/BBL(difco):(OXOID)]，紙錠之直徑為 6 mm。

### 二、方法

#### (一) 魚蝦腸道中乳酸菌之篩選

依照 Kelly *et al.* (1996) 的方法進行篩選。採集之魚蝦樣品以 75% 酒精擦拭體表，在無菌操作條件下取出腸道，和 10 倍量 (v/w) 無菌生理食鹽水攪碎均質，取 0.1 mL 均質液至 MRS (difco) 培養液中增殖，於 37°C 培養 24 h 後，觀察記錄生長的乳酸菌菌落。勾取菌落接種培養，再以 MRS 培養基進行劃線分離，反覆操作單離篩選出乳酸菌。單離之菌株以菌種保存管置於 -80°C 保存。

#### (二) 乳酸菌種屬之鑑定

參照 Benson (2002) 及 Johnson and Case (2004) 之方法，將分離純化的菌株先藉由鏡檢形體觀察、革蘭氏染色、觸酶 (catalase) 反應等生化指標測定，完成初步屬別的分類。其次，進一步進行總 DNA 的萃取 (Anderson and McKay, 1983) 及 16S ribosomal RNA 基因序列的鑑定 (Weisburg *et al.*, 1991)。16S rRNA 基因序列以通用引子 (16S\_F:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 及 16S\_R:5'-GGTTACCTTGTTACGACGACTT-3') 經 PCR 方式擴增 (黃等, 2007)。定序結果利用 BLAST 程式與 GenBank 資料庫的基因進行比對，選取相似度最高的物種作為細菌鑑定之依據。有關生物資訊學的運算係使用 Accelrys Gene v2.5 套裝軟體進行分析，系統發生樹 (phylogenetic tree)

**Table 1** The dependability of the bacterium concentration and absorbance at 600nm

Isolated	Equation	Correlation coefficient
F1	$Y = 1.0799X + 7.1499$	$R^2 = 0.9828$
F2	$Y = 1.3786X + 6.9158$	$R^2 = 0.9969$
P1	$Y = 0.9099X + 7.8892$	$R^2 = 0.9301$
P2	$Y = 0.3214X + 7.7500$	$R^2 = 0.9643$

\*Y: CFU/ML; X: absorbance at 600 nm

的建構採用 Neighbor-joining method，以電腦計算而得 (張等, 2009)。

### (三) 益生性乳酸菌之特性測試

#### 1. 耐酸性試驗

參考家富 (2006) 將乳酸菌活化培養至 MRS 培養基中，於 37°C 培養 24 h 後，調整 OD<sub>600nm</sub> 介於 0.8 ~ 1.0，取 0.1 mL 菌液分別和 0.9 mL 經 6 N HCl 調整為 pH 1.0、2.0 與 3.0 之 100 mM KCl [含 0.04% pepsin (sigma); pH 1.0、2.0 及 3.0] 混合，於 37°C 培養 3 h 後，轉接至 MRS 培養基，於 37°C 培養 24 h 後，讀取 OD<sub>600nm</sub> 之吸光值。

#### 2. 膽鹽耐受性試驗

參考家富 (2006) 方法，將乳酸菌活化培養至 MRS 培養基中，於 37°C 培養 24 h 後，調整 OD<sub>600nm</sub> 介於 0.8 ~ 1.0，取 0.1 mL 至 MRS 培養液 [添加 1 mL 之 25% pancreatin (sigma) 與 0.1 ~ 0.4% bile salt (sigma)]，經 24 h 培養後，轉接至 MRS 培養基中，於 37°C 培養 2、4、6、24 h 後，測定 OD<sub>600nm</sub> 之吸光值。

#### 3. 耐鹽試驗

採用家富 (2006) 方法作部分修飾。乳酸菌培養液經離心 (10000 x g, 10 min)，沉澱物以生理食鹽水 (0.85% NaCl) 2 次洗淨，調整為 OD<sub>600nm</sub> = 0.1 之懸濁液。取 0.1 mL 至氯化鈉濃度 (0.85%、1.5% 及 3%) 調整的 MRS 培養液中，於 37°C 培養 24、48 h 後，測定 OD<sub>600nm</sub> 之吸光值。

#### 4. 上皮細胞吸附性試驗

參照張 (2008) 的方法，Caco-2 細胞株以

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培養基 (含 10% fetal bovine serum) 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 濃度下培養 7 天，待形成單層膜後進行 Caco-2 吸附試驗。新鮮培養之乳酸菌調整 OD<sub>600nm</sub> 至 0.6 ~ 0.7，取 1.5 mL 菌液離心 10 min，並以磷酸鹽緩衝液 (PBS, pH 7.4) 清洗菌體一次後，以 1 mL PBS 緩衝液懸浮並加入 1 mL 之 MRS 培養液，再加入 2 mL 之 DMEM 混勻。將培養後之 Caco-2 細胞株以 PBS 緩衝液清洗，加入 2 mL 含菌液及 DMEM 之混合液，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 濃度下培養 2 h，再以 PBS 緩衝液清洗，加入甲醇固定細胞後，以革蘭氏染色法進行染色，在顯微鏡油鏡下觀察。

#### 5. 弧菌屬病原菌抗菌活性試驗

修飾自家富 (2006) 方法，首先進行乳酸菌及弧菌屬病原菌培養，各於 MRS 及 Marine broth (MB; difco) 中常規培養，培養液經離心 (10000 x g, 10 min)，沉澱物 2 回洗淨，調整為 OD<sub>600nm</sub> = 0.1 之懸濁液。試驗區 MB 培養基 0.6 mL，乳酸菌上清液 0.7 mL，再加入弧菌屬病原菌細胞懸濁液 0.1 mL，25°C 培養 24、48、72 h 後，以分光光度計測定 600 nm 吸光值。

抗菌活性 (抑制率%) =  $[1 - (\text{乳酸菌} + \text{弧菌吸光值}) / \text{弧菌吸光值}] \times 100$

測定及製作各乳酸菌之菌數與 OD 值之迴歸方程式 (Table 1)。

#### 6. 乳酸菌對抗生素的敏感性試驗

採用 Kirby-Bauer method 紙錠擴散法 (disk diffusion susceptibility testing) (Bauer *et al.*, 1966)，取 100 μL 菌液均勻塗抹於 MRSA 上，靜置 10 min 後，在培養基表面貼附直徑 6 mm 抗生

**Table 2** Characteristics of the isolated LAB strains

Strain	Gram stain <sup>1</sup>	Morphological character	Spore <sup>2</sup>	Oxygen	Motility <sup>2</sup>	Oxidase <sup>1</sup>	Catalase <sup>1</sup>
F1	+	spherical	-	facultative	-	-	-
F2	+	spherical	-	facultative	-	-	-
P1	+	spherical	-	facultative	-	-	-
P2	+	spherical	-	facultative	-	-	-

<sup>1</sup>+: positive reaction; -: negative reaction

<sup>2</sup> -: lack

素之紙錠，續於 37°C 培養 24 h，以刻度尺測量抑制圈大小。參照臨床與實驗室標準協會 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 的標準 (M100-S15, 2005) 進行判定，依標準將受試菌之感受性分為具抗藥 (resistant, R)、中度敏感 (intermediate susceptible; I) 及敏感 (susceptible; S) 等級，R 表示該藥物無法有效抑制此株細菌生長，I 表示該藥物在此劑量下不能有效抑制此株細菌生長，S 則表示該株細菌對此藥物並無抗藥性。

#### (四) 抗氧化能力分析

乳酸菌以 MRS 培養 24 h 並經離心後，取其上清液進行抗氧化分析。

##### 1. 清除 ABTS 自由基能力

部分修飾 Awika *et al.* (2003) 的試驗方法。將 0.1 mL 之 80 mM ABTS、0.1 mL 之 30 mM potassium persulfate 及 0.8 mL 去離子水混合，室溫下暗處放置反應 16 h 誘發 ABTS<sup>+</sup> 自由基產生，測定 730 nm 吸光值，以生理食鹽水稀釋調整 730 nm 吸光值介於 0.8~1.0，取稀釋液 250  $\mu$ L 和乳酸菌上清液 5  $\mu$ L 混合，在室溫每隔 1 h 測定 730 nm 吸光值的變化，吸光值越高表示其抗氧化能力越高。

##### 2. 超氧歧化酶活性測定

參照 Ukeda *et al.* (2002) 方法，以 SOD 測定套組 (SOD determination Kit 19160, Fluka) 進行 SOD 活性測定。因超氧歧化酶可將超氧自由基還原成過氧過氫與氧離子，主要係利用 WST (water-soluble tetrazolium salt) 與氧離子反應後生成 WST-1 formazan 之原理，在 450 nm 有吸光反應。取乳酸菌上清液 20  $\mu$ L，先後加入 20  $\mu$ L 去離子水、200  $\mu$ L 之 WST 溶液、20  $\mu$ L 稀釋液及 20  $\mu$ L

酵素液混合，於 37°C 靜置 20 min 後，以酵素免疫分析儀測定 450 nm 吸光值。

SOD 活性 (抑制率%) =  $\frac{【(未加樣品之控制組 - 未加樣品之空白組) - (樣品組 - 加樣品之空白組)】}{(未加樣品之控制組 - 未加樣品之空白組)} \times 100$ 。

##### 3. 螯合亞鐵離子能力測定

採用 Dinis *et al.* (1994) 的方法，取 0.1 mL 乳酸菌上清液，加入 3.7 mL 去離子水與 0.1 mL 之 2 mM FeCl<sub>2</sub> 溶液，反應 3 min 後，加入 200  $\mu$ L 之 5 mM ferrozine 混合反應 10 min，測定 562 nm 吸光值。吸光值愈低，表示樣品的亞鐵離子螯合能力愈強。

螯合亞鐵離子能力 (%) =  $\frac{【(空白組吸光值 - 樣品組吸光值)}{空白組吸光值} \times 100$ 。

##### 4. 清除超氧陰離子 (superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 能力

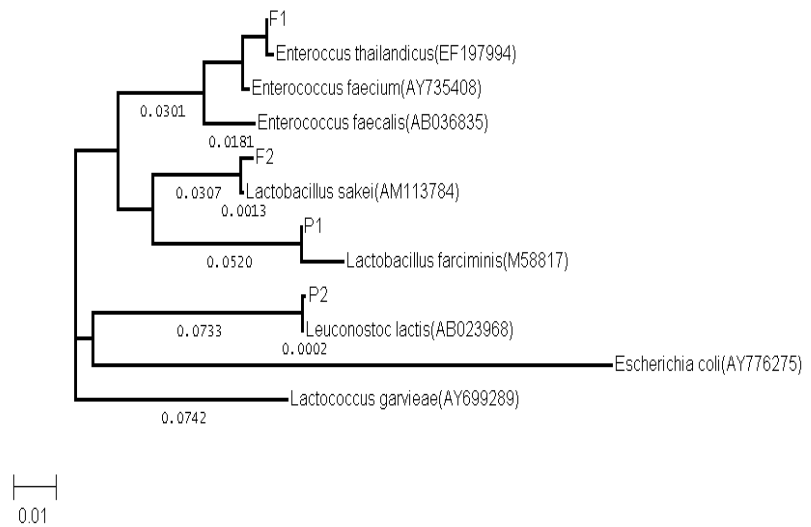
參考 Kirby and Schmidt (1997) 之方法作部分修飾。96 孔盤每 well 加入 50  $\mu$ L 之乳酸菌上清液，再加入各 50  $\mu$ L 之 80  $\mu$ M PMS、624  $\mu$ M NADH 及 200  $\mu$ M NBT 等溶液混合，震盪 20 sec 並室溫靜置 15 min 後，以酵素免疫分析儀測定 560 nm 吸光值，持續記錄 10 min。吸光值愈低，表示試驗樣品清除超氧陰離子之效力愈強。

## 結 果

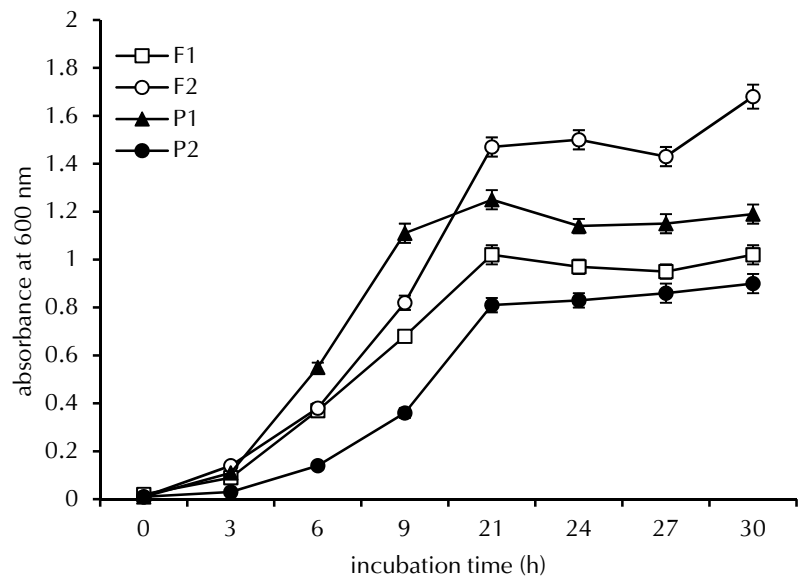
### 一、乳酸菌篩選與鑑定

自石狗公、赤鯨、草蝦及胭脂蝦腸道的內容物作為篩選菌株的對象，以 MRS 培養基初步篩選乳酸菌株，其結果共計挑出分離九個菌落，進

**Fig. 1** Phylogenetic tree of four isolated LAB strains based with other relevant species. This tree was inferred from 16S rRNA partial gene sequence with neighbor-joining method.



**Fig. 2** Growth curves of the four isolated LAB strains.



一步繼續進行純化培養及分析菌種的基本特性。通過革蘭氏染色和觸酶試驗得到四株類乳酸菌株，編號為 F1、F2、P1、P2，其菌體形態等特性如 Table 2 所示，外形多數呈球狀，革蘭氏陽性，不具觸酶及氧化酶活性和運動性，無內孢子，好氧與厭氧環境下均會生長。

根據 16S rDNA 部分序列分析及 API 鑑定系統比對的結果，所分離四株菌的歸屬為 *Enterococcus* (*E.*) sp. strain (F1)、*L. sakei* (F2)、*L. farciminis* (P1) 及 *Leuconostoc* sp. strain (P2)，分離株與此等最接近菌屬相似性在 99% 以上。此外，使用 Neighbor-joining 方法進行類群分析，繪出的樹狀圖 (Fig. 1) 亦顯示相似之同源性結果。

## 二、分離乳酸菌之特性

### (一) 生長曲線

四株乳酸菌在 MRS 培養液於 37°C 培養 30 h 的生長變化 (Fig. 2)。各菌株於 3 h 後即進入對數生長期，6 h 後開始有菌體細胞沉澱，約 9 h (P1) 進入平穩期，培養 21 h 後乳白色菌體沉澱明顯增加。由菌體生長曲線斜率可以發現，四株乳酸菌的生長速率大抵是 P1 > F2 > F1 > P2。

### (二) 酸、膽鹽及鹽度耐受性

對胃酸及膽汁的耐受性亦為選擇具潛在性益生菌的重要指標。在體外試驗模擬消化道的環境下，測試四株乳酸菌對 pH (pH 1.0 ~ 3.0)、膽鹽濃度 (0.1 ~ 0.4%) 和鹽度 (0.0 ~ 3.0%) 的耐受能力

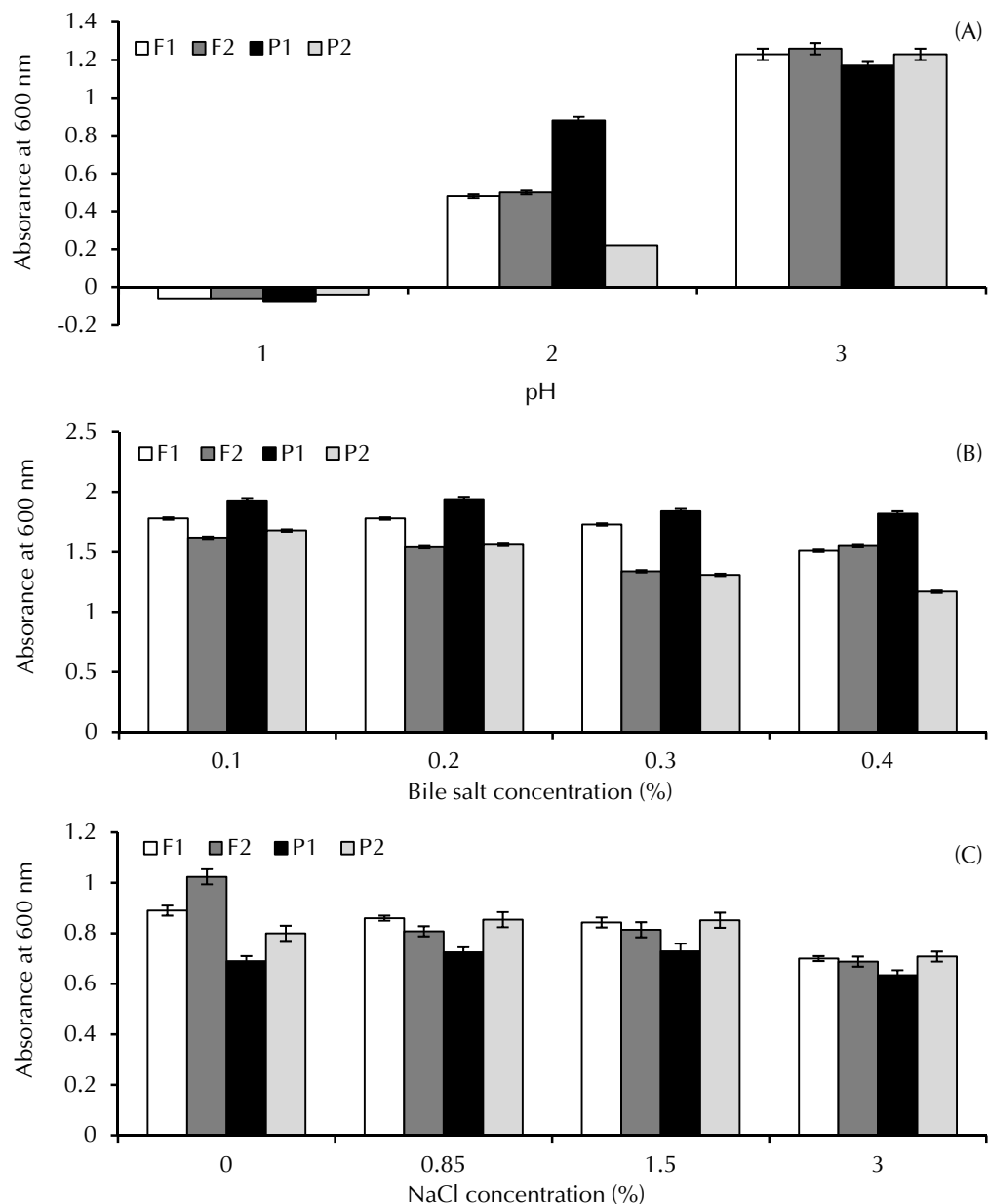
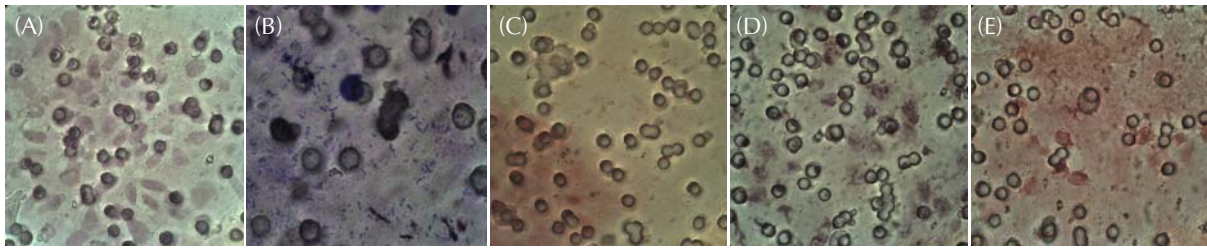


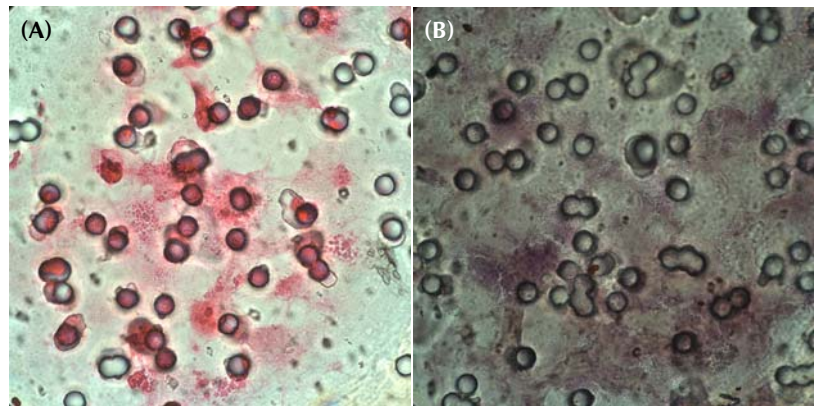
Fig. 3 The pH, bile salt, and NaCl tolerances of the four isolated LAB strains.

(Fig. 3)。在耐酸性試驗 (Fig. 3A)，於 pH 1.0 時四菌株均無法存活，在 pH 升至 3.0 時則生長良好。顯示 F1、F2、P1、P2 等四種菌株對 pH 3.0 或以上即有很好耐受性。在耐膽鹽性試驗 (Fig. 3B)，將菌液分別加到含 0.1 ~ 0.4% 膽鹽及對照組 MRS 培養液中，分別培養 2、4、6 及 24 h，觀察其各菌株菌數變化，結果顯示，菌液經由不同濃度膽鹽處理後，各菌株經 6 及 24 h 培養後，經連續稀釋各菌株之  $OD_{600nm}$  均大於 1，換算菌數皆高於  $10^7$  CFU/mL，各菌株對於不同膽鹽濃度 (0.1 ~ 0.4%) 均具耐受能力，尤以 P1 菌株之耐受性較佳。未來

將乳酸菌添加至水產飼料應用，會面臨有淡至海水之養殖水域，因此也測定對鹽度的耐受性，培養液中添加 0.85%、1.5% 及 3.0% 氯化鈉，經 24、48 h 培養，隨著鹽度提高，F1、F2、P1、P2 等菌株的菌數量稍為下降，顯示 F1、F2、P1、P2 等菌株具良好之耐鹽性 (Fig. 3C)。由上述之結果顯示，魚蝦腸道來源之四菌株可存活於 pH > 2.0 的酸性環境，F1 的耐酸性能比 F2、P1、P2 強。亦可在 0.4% 膽鹽環境生長，P1、F1 的耐膽鹽性能比 F2、P2 高；其中 F1 對酸及膽鹽耐受性皆佳。四株乳酸菌並可於不同鹽度的海水中增殖。



**Fig. 4** The adhesion results of LAB to Caco-2 cell monolayer examined by light microscopy (magnification 1000 x). A: Without LAB adhesion to Caco-2 cell monolayer as control; B: Adhesion of F1 to Caco-2 cell monolayer; C: Adhesion of F2 to Caco-2 cell monolayer; D: Adhesion of P1 to Caco-2 cell monolayer; E: Adhesion of P2 to Caco-2 cell monolayer.



**Fig. 5** The adhesion results of LAB to Epithelioma papillosum cyprinid (EPC) cell monolayer examined by light microscopy (magnification 1000 x). A: Without LAB adhesion to EPC cell monolayer as control; B: Adhesion of P1 to EPC cell monolayer.

### (三) 上皮細胞吸附能力

選用人類 Caco-2 細胞及鯉魚上皮細胞株 (EPC) 進行對四株乳酸菌之吸附試驗。如 Fig. 4 所示，以不添加乳酸菌作為對照組，由革蘭氏染色並以顯微鏡觀察比較的結果，F1、F2、P1、P2 等四菌株對於 Caco-2 細胞都有一定的吸附能力。和不添加乳酸菌之鯉魚上皮細胞株作對照 (Fig. 5)，顯示 P1 菌株的吸附能力佳，但 F1 等菌株則黏附鬆散。乳酸菌吸附具有增加定殖抗力和防止優勢菌易位的生理意義，因此，F1、F2、P1、P2 等四菌株具吸附 Caco-2 細胞能力，符合此益生菌特性。

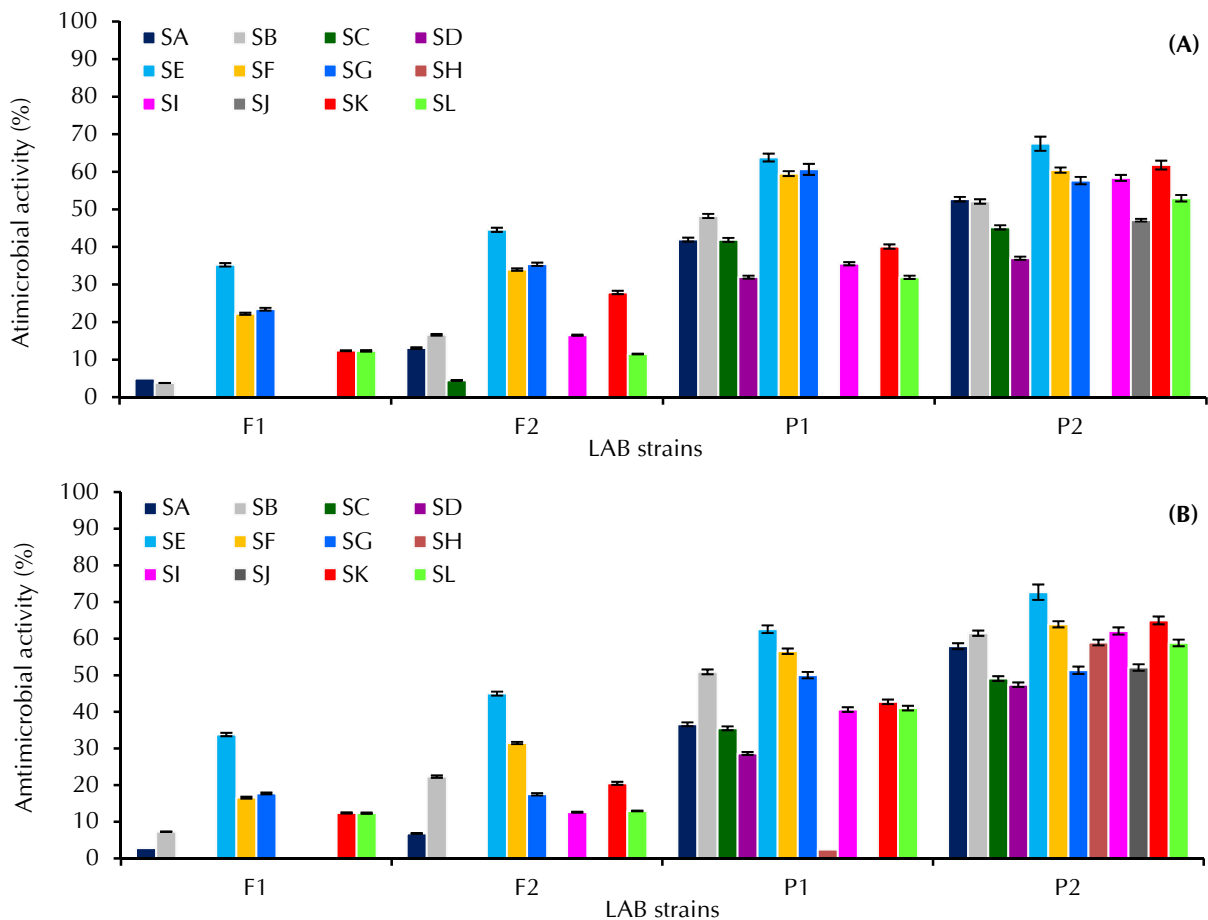
### (四) 抑制弧菌屬病原菌能力

本試驗使用溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、鰻弧菌 (*V. anguillarum*) 等十三株弧菌屬病原菌，利用培養 24 h 之菌體上清液進行抗菌試驗 (Fig. 6)。結果顯示，F1、F2、P1、P2 等四菌株與十三株弧菌屬病原菌共培養 24 h (Fig. 6A)、培養 48 h (Fig. 6B) 培養 72 h (數據未顯示於圖表) 均具有不等的抑制能

力。各菌株對於副溶血弧菌、溶藻弧菌、鰻弧菌等三株主要的病原菌表現出較強的抑菌作用，F1 菌株對於副溶血弧菌、溶藻弧菌、鰻弧菌等三株病原菌，抑制率依序為 35.3 ~ 33.8%、16.6 ~ 22.2%、2.8 ~ 7.3%。F2 菌株抑制率依序為 42.0 ~ 45.0%、27.5 ~ 34.0%、16.6 ~ 23.5%。P1 的抑制率依序為 62.6 ~ 63.8%、56.6 ~ 59.5%、48.3 ~ 50.9%。P2 的抑制率依序為 67.5 ~ 72.7%、60.5 ~ 63.9%、52.1 ~ 62.6%。其中，又以 P2 及 P1 菌株對副溶血弧菌、溶藻弧菌、鰻弧菌等三株主要的病原菌抑菌能力較高。

### (五) 對抗生素之藥敏性

其次，探討四株乳酸菌對常用的 11 種抗生素之抵抗能力，根據 CLSI 標準 (M100-S15, 2005) 判定其抗藥 (R)、中度敏感 (I) 及敏感 (S) 等抗藥性等級，結果彙整於 Table 3。試驗所使用之抗生素有 ampicillin (AM)、chloramphenicol (C)、erythromycin (E)、gentamicin (GM)、kanamycin (K)、neomycin (N)、novobiocin (NY)、polymyxin B (PB)、streptomycin (S)、tetracycline (TE) 和 vancomycin



**Fig. 6** Antimicrobial activity of the isolated LAB strains against vibrio pathogens. SA: *V. alginolyticus* 90061; SB: *Lis. anguillarum* AC-91-2722; SC: *V. alginolyticus* AL-90-E-9; SD: *Lis. anguillarum* BCRC12908; SE: *V. parahaemolyticus* P-896-2; SF: *V. alginolyticus* BCRC12829; SG: *V. parahaemolyticus* BCRC12863; SH: *V. salmonicida* BCRC12844; SI: *V. parahaemolyticus* BCRC12865; SJ: *V. vulnificus* TG617; SK: *V. parahaemolyticus* AC-91-564-a2; SL: *V. parahaemolyticus* AC-93-2866-HP; SM: *Lis. anguillarum* AC-90-2722.

(VA)。顯示 F1、F2、P1、P2 表現出不同程度的藥敏性，四菌株對於 GM、K、N、NY、PB、S 等均有耐藥性；對於 TE 卻均表現為敏感。此外，對 AM 僅有 P2 表現敏感；而 C 除 P1 具耐藥性外，其餘 3 株菌皆表現為敏感。對 E 除 P1 具耐藥性外，F1 中度敏感，P2 及 F2 皆表現敏感。P1 與 F1 對 VA 表現敏感，而 P2 和 F2 則具耐藥性。綜而言之即是 F1、F2 對於 8 種抗生素有耐藥性，P1 對於 9 種抗生素有耐藥性，而 P2 對於 7 種抗生素有耐藥性；各菌株表現為多重耐藥菌，進一步探討對不同抗生素的耐受濃度，應可繼續作為益生菌來開發利用。

### 三、抗氧化能力

以 MRS 培養 24 h 並離心後的上清液，測定

其抗氧化性 (Table 4)。結果顯示，F1、F2、P1、P2 等四菌株的超氧陰離子清除能力較佳，清除率達 93.3 ~ 94.5%。螯合亞鐵離子能力亦介於 64.0 ~ 94.5%。清除 ABTS 自由基能力介於 38.0 ~ 84.0%。超氧歧化酶活性介於 51.2 ~ 59.4%。綜合以上之結果，得知四株乳酸菌具有相當程度的抗氧化能力。

## 討 論

### 一、魚蝦腸道益生乳酸菌篩選與鑑定

益生菌廣泛之定義為『單或混合之微生物菌株，應用於動物或人體，藉以改善宿主腸道菌相平衡、有益於宿主健康之特性』(FAO/WHO, 2002)。在人類與陸上動物，益生菌的應用著重在乳酸菌的使用，最具代表性的包括雙叉桿菌



**Table 3** Antimicrobial disk susceptibility tests of the isolated LAB strains

Antibiotics	Disk potency	Standards <sup>1</sup>			Strains							
		Zone diameter (mm)			F1		F2		P1		P2	
		R <sup>2</sup>	I	S	Inhibition zone (mm)/ susceptibility result							
Ampicillin	10 µg	≤13	14-16	≥17	0	R	0	R	10	R	25	S
Chloramphenicol	30 µg	≤12	13-17	≥18	20	S	25	S	12	R	20	S
Erythromycin	15 µg	≤13	14-17	≥18	14	I	21	S	13	R	30	S
Gentamicin	10 µg	≤12	13-14	≥15	0	R	0	R	0	R	10	R
Kanamycin	30 µg	≤12	13-17	≥18	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomycin	30 µg	≤12	13-16	≥17	0	R	0	R	0	R	12	R
Novobiocin	30 µg	≤17	18-21	≥22	13	R	15	R	11	R	10	R
Polymyxin B	300 U	≤8	9-11	≥12	0	R	0	R	0	R	0	R
Streptomycin	10 µg	≤11	12-14	≥15	0	R	0	R	0	R	0	R
Tetracycline	30 µg	≤14	15-18	≥19	34	S	22	S	30	S	24	S
Vancomycin	30 µg	≤9	10-11	≥12	20	S	0	R	20	S	0	R

<sup>1</sup>CLSI, approved standard M100-S15 (2005).

<sup>2</sup>Resistant (R), Intermediate Susceptible (I), Susceptible (S).

**Table 4** Antioxidant activities of the isolated LAB strains

	F1	F2	P1	P2
Scavenging ABTS radical (%)	55.3 ± 0.6 <sup>1</sup>	52.0 ± 0.0	84.0 ± 0.0	38.0 ± 0.0
SOD (%)	56.2 ± 1.6	51.7 ± 1.3	51.2 ± 0.9	59.4 ± 1.6
Scavenging Superoxide anion radical (%)	93.4 ± 0.2	93.3 ± 0.1	94.5 ± 0.2	93.4 ± 0.2
Chelating Ferrous ion (%)	87.8 ± 1.4	64.0 ± 1.8	94.5 ± 0.1	88.7 ± 0.2

<sup>1</sup>Data are mean ± SD (n = 3).

*Bifidobacterium* (B.) 及乳酸菌 (*L.*、*S.*、*C.*)。美國飼料管理官方協會 (Association of American Feed Control Officials, 2000) 年鑑公布 43 種益生菌可作為飼育用，乳酸菌亦占其中之多數，主要有 *C.*、*S.*、*E.*、*Leu.*、*L.* 等屬。益生菌在魚蝦類養殖的利用，主要是增強免疫力，生產抗菌物質以抑制外來病原菌，從預防感染的觀點，可改善水產動物消化道內的細菌相而達到控制疾病的效果 (片桐, 2010; 前田, 2010)。目前應用於水產養殖的益生菌多來自於陸生動物，由於益生菌的效果與其來源關係密切，理想的菌種為分離自同種生物的腸道 (Verschuere *et al.*, 2000)。Strøm and Olafsen (1990) 指出鱈魚仔魚腸道中乳酸菌 *L.* 約佔總菌相的 10%。而 *C.*、*L.*、*Leu.* 與 *S.* 等屬乳酸菌是健康魚類腸道之優勢菌叢 (Ringø and Gatesoupe, 1998)。Hoshino (2007) 指出，鯉及鱒魚類消化管內的優勢

乳酸菌，在夏季為 *Lactococcus lactis*，在冬季為 *L. raffinolactis*。在本研究，從赤鯨、石狗公、胭脂蝦及草蝦等的腸道，所分離得到的四株乳酸菌，鑑定屬於 *Enterococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus* 等屬。

## 二、乳酸菌之特性分析

乳酸菌作為益生菌需具備的特性，包括屬於正常的腸內菌群、能產生抗菌物質、耐酸及耐膽鹽之能力，以及可吸附上皮細胞等 (Nikoskelainen *et al.*, 2001; Ouwehand *et al.*, 2002)。應用於水產養殖方面之益生菌，大多以水懸浮液或添加入飼料經口餵食，因而需要能夠耐受消化道的低 pH、高濃度膽鹽和消化酶作用，進而才能定殖、存活於胃腸道黏膜並發揮作用 (Verschuere *et al.*, 2000;

Irianto and Audtin, 2002; Vine *et al.*, 2004), José *et al.* (2006) 也指出膽鹽會破壞微生物的細胞膜。多數魚類其胃與腸區別並不明確, 海水魚空腹時胃液可能為弱酸性或中性, 但是攝食食物後鹽酸的分泌使 pH 值降低至 2.0, 低 pH 環境對乳酸菌有抑制作用 (施, 1994)。Zarate *et al.* (2000) 指出在 pH 3.0 時, 四株乳酸菌菌株活力有降低趨勢, 降低至 pH 2.0 時, 均明顯活力減弱。Adolfo *et al.* (2004) 自淡水魚類篩選出五十五株 *L.*, 其中 *L. plantarum* 44a 對於 pH 2.0、2.5 及 3.0 都具有高耐受性。益生菌要能發揮作用, 須存活並定殖於腸道黏膜。此外, 鹽度的耐受性關係同時應用於淡水或海水養殖魚類。基於此, 本研究亦針對篩選之乳酸菌進行對 pH 1.0~3.0、0~0.4% 膽鹽及 0~3% 鹽度的耐受性, 顯示四株乳酸菌 (F1、F2、P1、P2) 均對 pH 3 及 0.4% 膽鹽濃度具有耐受性, 且可於 3% 鹽度下增殖。

當菌株抵達腸道後, 須對腸道具有吸附能力以避免因腸道的蠕動被排出體外, 因此吸附特性被認為是作為益生菌發揮生理作用的基礎及屏障。但由於體內吸附試驗較難進行, 一般體外試驗常利用腸道細胞株與試驗菌共培養, 觀察菌株對細胞的吸附量, 進而確定其吸附能力。通常用於研究細菌-細胞相互作用的細胞株有 Caco-2、HT-29 等, 此等細胞於體外繼代培養後具有向正常分化的特性。乳酸菌是否吸附至腸道黏膜表面, 會影響腸胃道菌相平衡, 抑制細胞的連結及細胞被致病菌入侵 (Vine *et al.*, 2004)。不能吸附於腸道黏膜, 只能作為穿越菌, 而不能在腸道內定殖並進一步增生 (Boureau *et al.*, 2000)。針對益生菌胃腸環境耐受能力研究, 評估其能否耐受胃腸道環境並定殖於腸道黏膜, 對於益生菌的篩選具有重要的指標意義。乳酸菌吸附具有增加定殖抗力和防止優勢菌的易位之生理意義, 因此, F1、F2、P1、P2 等四菌株具吸附 Caco-2 細胞及鯉魚上皮細胞能力, 符合此益生菌特性。

益生菌的作用機制是通過調控宿主體內微生物群落的平衡, 增殖有益細菌為優勢菌群, 抑制有害細菌。多數魚類的消化器官及免疫機能並不十分發達, 且深受生存環境 (水) 的影響。以益生菌飼育草蝦的研究中, 益生菌可明顯提高其吞噬細胞的吞噬能力, 同時提高酚氧化酵素與抗菌物質的活性 (Rengpipat *et al.*, 2000)。從海水、淡水

和養殖水體中分離鑑定出 100 餘種弧菌, 其中的多數是致病菌 (Austin, 2010)。本研究利用分離之乳酸菌的培養上清液, 以弧菌病原菌進行 24~72 h 抗菌活性試驗, 結果顯示對於溶藻弧菌、副溶血弧菌、鰻弧菌具有抑制作用。益生菌維持腸道菌相之平衡, 是以競爭排除及抗菌作用來對抗病原微生物, 但不同乳酸菌菌株產生之抑菌物質有所差異。Vazquez *et al.* (2005) 以九株乳酸菌進行對魚源致病菌的抑制作用, 顯示主要係因產生有機酸而起抑菌作用。Campos *et al.* (2006) 報告分離自 *Scophthalmus maximus* 之乳酸菌則是透過產生細菌素抑制病原菌生長。

魚類的疾病防治上, 抗生素為常用之水產藥物。但抗生素使用會直接影響魚類的腸道菌群組成, 進而影響魚類的正常生理活動。另外, 濫用抗生素產生抗藥菌亦為一大問題。Li *et al.* (2004) 針對常見乳酸菌對八大類三十種常用抗生素之藥敏試驗中指出, 常用的乳酸菌 *B. longum*、*L. acidophilus*、*L. plantarum*、*L. casei* 及 *E. faecalis* 對於 TE 及 C 均敏感。本研究以四株魚蝦腸道來源的乳酸菌對十一種抗生素的藥敏感進行檢測, 結果顯示 F1、F2、P1、P2 表現出不同程度的藥敏性。四菌株對於 TE 均表現為敏感, P2、F1、F2 菌株對於 C 皆表現為敏感。與 Li *et al.* (2004) 的結果相似。初步的探討各菌株對常用抗生素的表現, 以作為後續選育的參考。由此, 選用較不帶抗藥因子的益生菌, 應考量作為指標評估。

### 三、抗氧化能力分析

氧化壓力 (oxidative stress) 可能也引起魚體的病變, 愈多的研究關注於如何提昇魚蝦類生體內的抗氧化能力 (片桐, 2010)。具有益生功能的乳酸菌不僅可調節腸道菌相平衡及免疫功能, 近來也發現其具有抗氧化的生理功能。雖然生物體本身有抗氧化的防禦系統, 但並不能完全有效的防禦或修復氧化作用帶來的損傷。因此研發生物源的抗氧化劑對於生物體內自由基的清除、保護細胞和組織免受損傷成為必要。本研究檢測 F1、F2、P1、P2 四菌株對於清除 ABTS 自由基及超氧陰離子能力、螯合亞鐵離子及超氧歧化酶活性, 綜合測定之結果, 顯示這四株乳酸菌具有相當的抗氧化能力, 具有潛在的應用價值。

## 結 論

益生菌的篩選、應用和作用機制的研究，成為海洋微生物研究的重點，其中綠色環保的魚用益生物質的研發正成為當前熱門的研究課題。益生菌的應用可以調節和改善養殖環境微生態平衡，減少養殖動物突發性病害的發生，提高養殖動物的免疫力，增強其抗病能力，因此成為國內外研究的重點。本研究自魚蝦腸道篩選四株乳酸菌，除表現出耐酸、耐膽鹽的特性，並於體外試驗能拮抗溶藻弧菌、副溶血弧菌及鰻弧菌等病原菌，且具有對四環素、氯黴素等抗生素之敏感性，有作為水產益生菌之潛力。此外，四株乳酸菌兼具有清除超氧離子、螯合亞鐵離子等抗氧化能力，可作為魚蝦生理壓力的調節劑。乳酸菌被歸類為安全食用的 (generally recognized as safe, GRAS)，值得繼續探討益生性乳酸菌取代抗生素的可行性，作為在生物體內應用的微生物製劑。

## 謝 辭

本報告係為執行行政院農業委員會水產試驗所97年度 (97農科-15.2.2-水-A1(2)) 及98年度 (98農科-10.3.1-水-A4(2)) 科技計畫之部分成果，弧菌菌株及菌種鑑定分析樹承水產養殖組張錦宜博士提供與指導，細胞吸附試驗顯微照相承水產養殖組曾福生博士指導，以及謝孟真及陳佩真小姐在試驗上之協助，謹此敬致謝忱。

## 參考文獻

- 片桐孝之 (2010) 益生菌作為防疫對策之可行性. 養殖, 2: 40-44.
- 宋青巖, 潘寶海, 孫冬岩, 王春安 (2007) 微生態調節劑在水產養殖中的應用研究進展. 新飼料, 4: 19-22.
- 佐藤秀一 (2008) 含有魚類成長促進劑之餌料組成物以及養殖魚的生產方法. 日本專利, JP 2008-194001A.
- 施琮芳 (1994) 魚類生理學. 水產出版社, 台灣基隆, 118-132.
- 前田稔 (2009) 斑節蝦腸內容物分離之益生性乳酸菌. 日本專利, JP 2009-159955A.
- 前田稔 (2010) 益生菌作為疾病防除之可行性. 養殖, 7: 64-67.
- 家富俊平 (2006) 有用乳酸菌的分離及在水產養殖的應用之基礎研究. 日本三重大學生物資源研究所碩士學位論文, 日本三重, 15-17.
- 黃美瑩, 張錦宜, 張慎恩, 洪珮馨, 林金榮 (2007) 深層海水中乳酸菌的分離與鑑定. 水產研究, 15(1): 45-54.
- 張效銘 (2008) 益生性乳酸菌之篩選及穿梭載體系統之建構. 大同大學生物工程系所博士學位論文, 台灣台北, 183 pp.
- 張錦宜, 黃美瑩, 吳嘉哲, 林富家, 王文政, 林金榮 (2009) 台東附近海域不同深度海水中的好氣及兼氣性異營細菌組成. 水產研究, 17(1): 25-38.
- Aditya, K-W., K. Heinrich, L. M. Josie and G. Lewis (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274:1-14.
- Adolfo, B., R. Hartemink, J. W. Schrama and F. M. Rombouts (2004) Screening of Lactobacilli from fish intestines to select a probiotic for warm freshwater fish. Bio. Microflora, 23(1): 21-30.
- Anderson, D. G. and L. L. McKay (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol., 46:549-552.
- Association of American Feed Control Officials (2000) 2000 Official Publication, Association of American Feed Control Officials Inc. West Lafayette, IN 47971, U.S.A., 444 pp.
- Austin, B. (2010) Vibrios as causal agents of zoonoses. Vet. Microbiol., 140: 310-317.
- Awika, J. M., L. W. Rooney, X. Wu, R. Prior and L. Cisneros-Zevallos (2003) Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. J. Agric. Food Chem., 51: 6657-6662.
- Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45(4): 493-496.
- Benson, H. J. (2002) Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology (8th ed.). McGraw-Hill Co., Inc., NY, U.S.A., 90, 104-109, 129-159 pp.
- Boureau, H., L. Hartmann and T. Karjalainen (2000) Models to study colonization and colonization resistance. Microb. Ecol. Health Dis., S2: 247-258.
- Cabello, F. C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for

- human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137-1144.
- Campos, C. A., O. Rodrigues and P. Calo-Mata (2006) Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundlii* strains isolated from turbot. *Food Res. Int.*, 39: 356-364.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2005) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard M100-S15. Wayne, PA, U.S.A.
- Das, S., L. R. Ward and C. Burke (2010) Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305: 32-41.
- Defoirdt, T. and N. Boon (2007) Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: Luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.*, 25(10): 472-479.
- Dinis, T. C. P., V. M. C. Madeira and L. M. Almeida (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315: 161-169.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO expert consultation report. London Ontario, Canada.
- Hoshino, T. (2007) Probiotics for cultured fish. *BIO INDUSTRY*, 24(9):47-53. (in Japanese).
- Irianto, A. and B. Audtin (2002) Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.*, 25: 633-642.
- José, L. B., B. Ignacio, R. Z. Imanol, D. Cunningham, D. Vendrell and L. M. José (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, 114: 173-186.
- José, L. B., R. L. Tyrone and D. P. Cunningham (2007) Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebrate pathology*, 96: 147-150.
- Johnson, T. R. and L. C. Case (2004) Laboratory Experiments in Microbiology (7th ed.). Pearson Education, Inc., San Francisco, U. S. A., 35-37, 103-105.
- Kelly W. J., R. V. Asmundson and C. M. Huang (1996) Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Int. Food Microbiol.*, 33: 209-218.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan and L. Gibson (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.
- Kirby, A. J. and R. J. Schmidt (1997) The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs-1. *J. Ethnopharmacol.*, 56: 103-108.
- Li, P. L., W. H. Pan, Y. N. Lu, Z. J. Jiang, C. W. Ma and C. Zhang (2004) Antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria commonly used in microecologies. *J. China Agric. Univ.*, 9(1): 16-20. (in Chinese)
- Nikoskelainen S., A. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen and E. M. Lilius (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunol.*, 15: 443-452.
- Nikoskelainen S., S. Salminen, G. Bylund and A. Ouwehand (2001) Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2430-2435.
- Ouwehand C., S. Salminen and E. Isolauri (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 279-289.
- Panigrahi A. and I. S. Azad (2007) Microbial intervention for better fish health in aquaculture: The Indian scenario. *Fish Physiol. Biochem.*, 33: 429-440.
- Pauly, D. and V. Christensen (2002) Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, 418: 689-693.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasaveta (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.
- Ringø, E. and F. J. Gatesoupe (1998) Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- Sambasivam, S., R. Chandran and S. A. Khan (2003) Role of probiotics on the environment of shrimp pond. *J. Environ. Biol.*, 24(1): 103-106.
- Strøm, E. and J. A. Olafsen (1990) The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. *In Microbiology in Poecilotherm* (R. Lesel ed.), Elseviers, Amsterdam, Holland. 181-185.
- Subasinghe, R. P. (2001) Aquaculture development, health and wealth. *In Aquaculture in the Third Millennium: Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third*

- Millennium (R. P. Subasinghe *et al.*, eds.), Bangkok and FAO, NACA, 167-191.
- Ukeda, H., H. Moriyama, D. Kawana, Y. Katayama, K. Nakabayashi and M. Sawamura (2002) Application of Novel Assay Methods for Superoxide Anion-Scavenging Activity to Food Samples. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 49(1): 25-31. (in Japanese)
- Vazquez, J. A., M. P. Gonezalez and M. A. Murado (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149-161.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655-671.
- Vine, N. G., W. D. Leukes and H. Kaiser (2004) In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231: 145-152.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-703.
- Zarate, G., A. Perez-Chaia, S. Gonzales and G. Oliver (2000) Viability and  $\beta$ -galactosidase activity of dairy probiotic bacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J. Food Prot.*, 63: 1214-1221.

## Characterization and Isolation of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Fish and Prawn Intestine

Huei-Ling Lan<sup>\*</sup>, Chien-Wei Wu, Wen-Chun Chen, Meng-Chen Hsieh and  
Chwen-Herng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

The tendency of use of antibiotics is declining worldwide. From the perspective of disease prevention, the method is to use probiotics as a feed additive to induce the defense ability of fish and shrimp against the infection and disease. This study aims to evaluate the probiotic properties of four lactic acid bacteria (LAB) which were isolated from the intestinal gut of *Sebastiscus marmoratus*, *Dentex tumifrons*, *Penaeus monodon*, and *Aristeus virilis*. Those LAB were identified as *Enterococcus* sp. (F1), *Lactobacillus sakei* (F2), *Lactobacillus farciminis* (P1) and *Leuconostoc* sp. (P2). They all showed tolerance under the conditions of pH 3.0, 0.4% bile salt, and 3% NaCl, and could adhere to epithelioma papillosum cyprinid and Caco-2 cells. All strains demonstrated inhibitory effects against *Vibrio* pathogens (*V. alginolyticus*; *V. parahaemolyticus*; *V. anguillarum*), and were susceptible to chloramphenicol and tetracycline. Furthermore, the antioxidant activity of LAB showed effects on scavenging ability of ABTS radical, superoxide anion and chelating ability on ferrous ions.

**Key words:** lactic acid bacteria, probiotics, antimicrobial activity, adherence, antioxidant activity

---

\*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2463-2677; E-mail: hllan@mail.tfrin.gov.tw