

光合菌及枯草桿菌對點帶石斑吋苗蓄養之應用

吳育甄^{1*} · 林峰右¹ · 李佳芳² · 黃致中¹ · 葉信利¹

¹ 行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

² 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘 要

石斑魚養殖過程中，因魚隻代謝產物及殘餌使水體逐漸累積大量氨態氮、亞硝酸及有機物而影響蓄養環境之水質，導致魚隻產生疾病，因此水質環境的改善及減少病原菌感染機會是提高養成的重要關鍵。本研究主要探討光合菌 (*Rhodovulum sulfidophilum*) 及枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 對數種病原菌之抑制能力，以及分別添加於點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 養殖環境中，對池水水質改善及石斑魚吋苗成長之影響。*In vitro* 試驗結果顯示，光合菌及枯草桿菌濃度為 10^4 CFU/ml 時，對病原菌 *Vibrio alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus* 有抑制能力。定期添加 10^4 CFU/ml 光合菌及枯草桿菌於石斑魚養殖池水中，試驗組氨態氮及亞硝酸濃度皆較對照組低，且較為穩定。本試驗所獲得之結果可應用於點帶石斑吋苗蓄養，可以達到抑制病原菌，減少疾病發生，同時還能降低水中氨態氮及亞硝酸濃度，穩定水質，以提供良好的養殖環境，達到提高點帶石斑育成率及收益之目的。

關鍵詞：益生菌、光合菌、枯草桿菌、石斑魚

前 言

益生菌 (probiotics) 按照 Lilly and Stillwell 兩位學者在 1965 年的定義為：「可分泌促進另一生物成長物質，並增加健康效益的微生物」(Cruz *et al.*, 2012)；2002 年，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 及聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 將益生菌定義為「活的微生物，當足量給予時，會對宿主健康有益處」。益生菌多與宿主生物共生或存在於環境中，由於它們對宿主生物有助益，至今已被人類廣泛使用。

益生菌應用在水產養殖的主要功能包括：1. 穩定養殖池水水質，分解水中有機物質，消除氨態氮及亞硝酸，改善水質 (劉等, 1997; 陳等, 2004)；2. 抑制病原菌，作為生物防制，預防疾病

的發生，減少藥物的使用 (陳等, 2002)；3. 作為營養來源，益生菌含有豐富營養，並成為腸道之益生菌，促進成長 (Keysami *et al.*, 2007)；4. 提升魚隻非特異性免疫力，增加吞噬細胞的活性 (Sakai *et al.*, 1995)，並激活蝦類的免疫系統 (Rengpipat *et al.*, 2000)。多篇研究報告指出，益生菌如 *Bacillus* spp.、*Lactobacillus* spp.、*Nitrosomonas* spp.、*Cellulomonas* spp.、*Nitrobacter* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Rhodoseudomonas* spp.、*Nitrosomonas* spp. 及 *Acinetobacter* spp.，可作為飼料添加物，促進魚隻成長，抑制病原微生物，預防疾病等，或可控制養殖池水中的病原微生物並穩定水質 (Prabhu *et al.*, 1999; Shariff *et al.*, 2001; Irianto and Austin, 2002; Farzanfar, 2006)。

近年來，水產養殖逐漸朝向高密度集約的養殖方式發展，因此維持良好的水質環境則成為水產養殖成功與否的重要因素，然而高密度集約養殖過程中，隨著養殖生物的生長，代謝廢物的大量累積，以及未食用的飼料及殘餌分解腐敗，往往會導致水質惡化，以致環境不佳，所產生的有

*通訊作者 / 台南市七股區三股里海埔四號, TEL: (06) 788-0461 轉 228; FAX: (06) 788-1597; E-mail: yijane0817@yahoo.com.tw

機物質廢物，經生物代謝及微生物分解，使水中大量累積氨態氮、亞硝酸及硫化氫等有毒物質，導致養殖生物滲透壓的調節失衡，降低血球細胞攜氧運輸功能，病原菌則可能因此對魚隻產生病害，使得養殖生物相繼爆發各種疾病 (Chen and Liu, 1990; Chen and Kou, 1992; Prabhu *et al.*, 1999)。養殖魚、蝦、貝類因疾病大量死亡的結果，導致產量下降，進而造成各國養殖產業的重大經濟損失 (Kautsky *et al.*, 2000)。以往傳統養殖中，疾病控制及治療多依賴抗生素等化學物質的使用，這些抗菌藥物的施用常會使得病原菌產生抗藥性，抗藥性基因通過遺傳物質的互換在細胞間移轉，讓更多的病原菌因此產生更強的抗藥性，使得疾病更加難以控制及治療 (Skjermo and Vadstein, 1999; Sze, 2000; Jana and Jana, 2003)。連帶的，也產生食品安全及環境污染等疑慮，讓許多的養殖產品受到大眾的質疑。隨著環境保護觀念日漸重視，水產養殖模式逐漸朝向生態平衡，以益生菌作為控制疫病的措施開始被思考與使用，施用益生菌於水產養殖是目前被推廣的環保養殖方法。

在水產養殖所使用的益生菌中，光合菌 (*Rhodovulum sulfidophilum*) 和枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 都是經常被使用的菌種。光合菌可利用光產生能量，生長在厭氧及兼性厭氧的環境，具有固氮、脫氮、固碳及硫化物氧化能力 (Madigan, 2004)，添加在養殖池水環境中，可去除水中氨態氮及硫化氫，改善水質，預防疾病 (Chien and Liang, 1994) 及作為飼料營養來源 (Watanabe *et al.*, 1998)。枯草桿菌則可產生對環境耐受性強的孢子，為需氧或兼性厭氧之桿菌，應用在廢水處理及農業生產病害防治都有不錯的效果 (Priest, 1993)。有研究報告指出，河魴養殖過程中，在水體中加入枯草桿菌可增加存活率及產量 (Queiroz and Boyd, 1998)；蝦類養殖研究中，以枯草桿菌培養豐年蝦後，再將豐年蝦投餵草蝦苗後，可提高蝦苗存活率並促進蝦苗生長 (Keysami *et al.*, 2007)。

石斑魚為水產養殖發展之重要的高經濟魚種，然而養殖過程中常遭受到細菌及病毒的侵襲，因養殖所抽取引用之海水常有病原微生物存在，加上高密度養殖造成水質環境不佳，以及養殖過程中人為操作對魚隻所產生緊迫 (stress)，以

致疾病的發生。經研究發現，自罹病之石斑魚可分離出 *Vibrio* sp.、*V. alginolyticus*、*V. carchariae* 等病原菌，造成石斑魚養殖過程中高死亡率及經濟損失等問題 (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995; Yii *et al.*, 1997)。本試驗使用的益生菌具有穩定及改善養殖池水水質、作為餌料提供營養價值、降低池中病原菌含量，增加養殖生物抗病能力的特性 (郭等, 2003; Cruz *et al.*, 2012)，本試驗目的在探討光合菌及枯草桿菌兩株益生菌對石斑魚常見之病原細菌抑制能力，並進一步瞭解點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 吋苗養殖過程中益生菌添加的時間點及使用量，建立正確有效使用兩種益生菌的方法，期盼能達到減少養殖環境中病原微生物的量，同時穩定及控制水質環境，強化魚隻之抗病能力，有效降低疾病發生，以達成提高石斑魚中間育成率及增進產業之收益

材料與方法

一、光合菌及枯草桿菌培養及定量

取自行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心分離之光合菌，以 NS 培養液 [yeast extract 0.05 g、sodium malate (sodium succinate) 0.5 g、NH₄Cl 0.1 g、mineral salts solution 10 ml, distilled water 90 ml, adjust pH to 7.0 ~ 7.5]，於 28°C 進行培養 7 天，以波長 540 nm 測定菌液吸光值為 2 時，將菌液 10 倍連續稀釋 10¹ ~ 10⁹，每 10 倍稀釋菌液分別取 100 μl 塗於 NS 平板培養基 [yeast extract 0.5 g、sodium malate (sodium succinate) 5 g、NH₄Cl 1 g、agar powder 15 g、mineral salts solution 100 ml, distilled water 900 ml, adjust pH to 7.0 ~ 7.5]，放入培養箱培養至隔夜後計算菌落數，以確立光合菌之濃度。

取自行政院農業委員會水產試驗所分離之枯草桿菌，以 Nutrient 培養液 (3% NaCl)，於 30°C 進行培養 48 h，以波長 540 nm 測定吸光值，將菌液 10 倍連續稀釋 10¹ 至 10⁹ 後，每 10 倍稀釋菌液分別取 100 μl 塗於 Nutrient agar 平板培養基 (3% NaCl)，放入培養箱培養至隔夜後計算菌落數，以確立枯草桿菌之濃度。

二、光合菌及枯草桿菌對 *Vibrio alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus* 及 *Aeromonas hydrophila* 病原菌之抑制

參考 Kirby-Bauer method 紙錠擴散法 (disk diffusion susceptibility testing) 但作部分修飾 (Bauer *et al.*, 1966)。取自行政院農業委員會水產試驗所分離之 *Vibrio alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus* 及 *Aeromonas hydrophila* 四株病原菌，分別挑選病原菌株單一菌落，於 TSB (Difco) 培養液中培養 24 h，以波長 540 測定菌濃度為 10^8 CFU/ml 後，以 10 倍稀釋至 10^4 至 10^8 ，分別塗抹 100 μ l 菌液於 MHA (Difco) 平板培養基上，再於 MHA 平板上打 5 個直徑 5 mm 的小洞，分別加入 50 μ l 以 10 倍連續稀釋 10^4 至 10^8 CFU/ml 之光合菌或桿草菌菌液，每個試驗組為三重覆，於 30°C 培養 24 h，測量並紀錄光合菌及枯草桿菌抑制病原菌之抑菌圈直徑大小。

三、以光合菌及枯草桿菌體內注射點帶石斑試驗

為了測試本實驗用的光合菌與枯草桿菌對石斑魚苗之安全性，進行本試驗。取自行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心點帶石斑，經篩選大小為 3.6 ± 0.3 cm，體重 1.29 ± 0.14 g 經馴養 1 個月後，分 4 組於 3 t 水體之室外水泥池 ($390 \times 145 \times 70$ cm) 中進行試驗，每組 10 隻放於加蓋箱網中 ($30 \times 30 \times 36$ cm)，各三重覆。試驗分為光合菌、枯草桿菌、光合菌加枯草桿菌等三組，分別腹腔注射 0.05 ml 菌液 (10^4 CFU/g body weight)，對照組則注射 0.9% saline。觀察 15 天，記錄魚苗死亡數量。

四、光合菌及枯草桿菌對點帶石斑魚水質及蓄養影響

試驗之點帶石斑購自高雄縣茄萣鄉，蓄養於 3 t 之室外水泥池 ($390 \times 145 \times 70$ cm) 內，經 7 天馴化，每日投餵魚體重 2% 人工配合飼料。試驗魚隻體長範圍為 15.0 ± 0.5 cm，體重 44.6 ± 3.5 g，分對照組、光合菌 (10^4 CFU/ml) 與枯草桿

菌 (10^4 CFU/ml) 等三組進行試驗，每組各三重覆。每個水泥池放養 100 隻點帶石斑於箱網 ($1200 \times 900 \times 60$ cm) 中。光合菌及枯草桿菌組於第 1、7、14 天分別添加菌液，依據本試驗之光合菌及枯草桿菌對數種病原菌之抑制力評估結果，使水體總菌量達 10^4 CFU/ml。每日於早上 9 時餵食魚體重的 2% 人工配合飼料，記錄每日實際攝食量，每日測量水溫、pH 值、亞硝酸及氨態氮，實驗 2 週結束後，記錄體長及體重。氨態氮值利用 phenolhypochloride 法測定， NH_4^+ 在鹼性作用下會轉成 NH_3 ， NH_3 與 phenol 形成 indophenol blue，再以 sodium nitroprusside 放大其反應效果，經分光光度計以波長 640 nm 測定之 (陳, 1983)；亞硝酸及氨態氮值測定均利用分光光度計測定，亞硝酸的量是利用測試水在酸性溶液中與 sulfanilamide 形成 diazonium 化合物，再與 N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine 形成粉紅色的 azo 化合物，於波長 520 nm 下測定之 (陳, 1983)。

五、統計分析

活存率及魚隻增重實驗結果以變異數分析法 (analysis of variance, ANOVA) 測定增中效益是否顯著，若效益達顯著水準 ($P \leq 0.05$)，再以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 進行組間平均值檢定。

結果

一、光合菌及枯草桿菌對 *Vibrio alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus* 及 *A. hydrophila* 病原菌之抑制效果

光合菌及枯草桿菌對 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus* 及 *A. hydrophila* 等病原菌之抑制性試驗結果如 Table 1 及 Table 2 所示。兩種益生菌對前 3 種弧菌有抑制力，但對 *A. hydrophila* 無抑制力。

光合菌濃度 $10^4 \sim 10^7$ CFU/ml 對 *V. alginolyticus* $10^5 \sim 10^8$ CFU/ml 抑制圈範圍為 ($8 \sim 11$) ± 0.6 mm；光合菌濃度 $10^4 \sim 10^8$ CFU/ml 對 *V. anguillarum* $10^5 \sim 10^7$ CFU/ml 抑制圈範圍為

Table 1 Inhibition zones (mm) (mean of triplicate) of different concentrations of photosynthetic bacteria *Rhodovulum sulfidophilum* against different concentrations of *Vibrio alginolyticus* (*V. al.*), *V. anguillarum* (*V. an.*), *V. parahaemolyticus* (*V. p.*), and *Aeromonas hydrophila* (*A. h.*)

Concentration (CFU/ml)	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>																			
	10 ⁸				10 ⁷				10 ⁶				10 ⁵				10 ⁴			
	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>
10 ⁸	0	0	0	0	9±0.6	0	0	0	8±0.6	0	0	0	7±0.6	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁷	0	0	0	0	11±0.6	12±1.0	0	0	7±0.6	11±1.0	0	0	7±0.6	10±1.0	0	0	8±0.6	10±0.6	0	0
10 ⁶	0	0	0	0	11±0.6	18±2.0	8±1.0	0	9±0.6	18±1.0	9±1.0	0	9±0.6	14±1.0	7±1.0	0	9±0.6	12±0.6	0	0
10 ⁵	0	10±0.6	9±1.0	0	11±0.6	15±2.0	9±0.6	0	10±0.6	21±2.0	11±1.0	0	10±0.6	20±2.0	8±0.6	0	9±0.6	19±1.0	7±0.6	0

Table 2 Inhibition zones (mm) (mean of triplicate) of different concentrations of *Bacillus subtilis* against different concentrations of *Vibrio alginolyticus* (*V. al.*), *V. anguillarum* (*V. an.*), *V. parahaemolyticus* (*V. p.*), and *Aeromonas hydrophila* (*A. h.*)

Concentration (CFU/ml)	<i>Bacillus subtilis</i>																			
	10 ⁸				10 ⁷				10 ⁶				10 ⁵				10 ⁴			
	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>	<i>V. al.</i>	<i>V. an.</i>	<i>V. p.</i>	<i>A. h.</i>
10 ⁸	0	14±1.0	8±0.6	0	0	0	8±0.6	0	0	0	7±1.0	0	0	0	6±1.0	0	0	0	0	0
10 ⁷	0	20±1.0	7±1.0	0	0	14±0.6	6±0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁶	13±1.5	26±2.0	14±1.0	0	0	18±0.6	13±0.6	0	0	10±0.6	10±1.0	0	0	9±1.0	8±0.6	0	0	8±0.6	0	0
10 ⁵	11±0.6	28±2.0	12±2.0	0	0	18±0.6	10±1.0	0	0	14±0.6	10±1.0	0	0	13±0.6	8±0.6	0	0	12±1.0	7±0.6	0
10 ⁴	15±1.0	30±2.0	11±1.0	0	8±0.6	19±0.6	9±0.6	0	7±0.6	15±0.6	14±2.0	0	7±1.5	14±2.0	11±1.0	0	7±0.6	13±1.0	11±1.0	0

(10 ~ 21) ± 2.0 mm；光合菌濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml 對 *V. parahaemolyticus* 10⁵ ~ 10⁶ CFU/ml 抑制圈範圍為 (7 ~ 11) ± 1.0 mm，其中光合菌濃度 10⁶ CFU/ml 時對 *V. anguillarum* 濃度 10⁵ CFU/ml 抑制能力最佳，最大抑制圈範圍達 21 ± 2.0 mm。光合菌抑制力並非隨濃度升高而增加，光合菌濃度在 10⁸ CFU/ml 時，僅對低濃度 10⁵ CFU/ml 的 *V. anguillarum* 及 *V. parahaemolyticus* 產生 10 ± 0.6 mm 及 9 ± 1.0 mm 的抑制圈；對 *V. alginolyticus* 無抑制力。光合菌濃度降至 10⁷ CFU/ml 則對濃度 10⁵ ~ 10⁸ CFU/ml 的 *V. alginolyticus* 產生 (9 ~ 11) ± 0.6 mm 抑制圈、對濃度 10⁵ ~ 10⁷ CFU/ml 的 *V. anguillarum* 產生 (12 ~ 18) ± 2.0 mm 抑制圈，

以及對濃度 10⁵ ~ 10⁶ CFU/ml 的 *V. parahaemolyticus* 產生 (8 ~ 9) ± 0.6 mm 抑制圈。光合菌濃度降至 10⁴ CFU/ml 時對 *V. alginolyticus* 濃度 10⁵ ~ 10⁷ CFU/ml 抑制圈範圍 (8 ~ 9) ± 0.6 mm；對 *V. anguillarum* 濃度 10⁵ ~ 10⁷ CFU/ml 抑制圈範圍 (10 ~ 19) ± 1.0 mm；對 *V. parahaemolyticus* 濃度 10⁵ CFU/ml 抑制圈 7 ± 0.6 mm，有微弱抑制力。由結果顯示，光合菌濃度 10⁴ CFU/ml 抑制病原弧菌能力較濃度 10⁸ CFU/ml 佳，對於抑制病原弧菌的能力並非隨濃度升高而有較強的表現。

枯草桿菌濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml 對 *V. alginolyticus* 10⁴ ~ 10⁶ CFU/ml 抑制圈範圍為 (7 ~ 15) ± 1.5 mm；枯草桿菌濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml

Table 3 Survival rate of grouper after *in vivo* injection of *Rhodovulum sulfidophilum* and *Bacillus subtilis*

Injection material	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	0.9% saline
Survival rate (%)	100	96.7 ± 5.8	100	96.7 ± 5.8

對 *V. anguillarum* 抑制圈範圍為 (8 ~ 30) ± 2.0 mm；枯草桿菌濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml 對 *V. parahaemolyticus* 抑制圈範圍為 (6 ~ 12) ± 2.0 mm。枯草桿菌濃度 10⁸ CFU/ml 對 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. parahaemolyticus* 三株病原弧菌抑制圈範圍最大，抑制病原弧菌的能力隨濃度下降而降低。枯草桿菌濃度 10⁸ CFU/ml 時，對 *V. alginolyticus* 濃度 10⁴ ~ 10⁶ CFU/ml 有抑制力，抑制圈範圍 (11 ~ 15) ± 1.5 mm。枯草桿菌濃度降至 10⁴ ~ 10⁷ CFU/ml 以下時，僅對 *V. alginolyticus* 濃度 10⁴ CFU/ml 有抑制力，抑制圈範圍 (7~8) ± 1.5 mm；枯草桿菌濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml 對 *V. anguillarum* 濃度 10⁴ ~ 10⁶ CFU/ml 抑制圈範圍為 (8 ~ 30) ± 2.0 mm，當枯草桿菌濃度降至 10⁴ CFU/ml 時對濃度 10⁶ CFU/ml 以下的 *V. anguillarum* 才有抑制力，抑制圈範圍為 8 ~ 13 ± 1.0 mm；枯草桿菌濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml 對 *V. parahaemolyticus* 濃度 10⁴ ~ 10⁸ CFU/ml 抑制圈範圍為 6 ~ 14 ± 2.0 mm，隨枯草桿菌濃度隨著濃度下降，抑制能力也隨之下降，其中枯草桿菌濃度降至 10⁴ CFU/ml 時，對濃度 10⁵ CFU/ml 以下的 *V. alginolyticus* 才具有抑制力。枯草桿菌對病原弧菌抑制能力隨濃度下降抑制圈也隨之減小。

二、點帶石斑體內注射光合菌及枯草桿菌試驗

石斑魚注射 10⁴ CFU/g body weighty 的光合菌及枯草桿菌於點帶體內結果在 Table 3 顯示，點帶石斑魚注射 10⁴ CFU/g body weight 光合菌、枯草桿菌及混合兩益生菌後，魚隻存活率分別為 100%、96.7 ± 5.8% 及 100%，對照組為 96.7 ± 5.8%，三組試驗組與對照組並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

三、光合菌及枯草桿菌對點帶石斑魚水質及蓄養之影響

石斑魚養殖池水添加光合菌或枯草桿菌試驗期間監測養殖池水中氨態氮濃度結果 (Fig. 1a)，第 1 次添加光合菌組添加第 2 天水中氨態氮濃度值為 3.67 ± 0.21 ppm，第 1 次添加枯草桿菌組之養殖池水氨態氮濃度值為 2.33 ± 0.1 ppm，對照組為 3.0 ± 0.08 ppm，添加光合菌組之氨態氮濃度略高於對照組，至添加後第 3 天 3 組養殖池水氨態氮濃度皆為 3.0 ± 0.19 ppm；第 4 天時添加光合菌組之氨態氮濃度為 2.67 ± 0.26 ppm，低於對照組的 3.0 ± 0.15 ppm，但添加枯草桿菌組池水中氨態氮濃度則上升至 3.67 ± 0.31 ppm。至添加益生菌第 5 天之後，光合菌組氨態氮濃度則又漸漸上升至 3.67 ± 0.1 ppm，枯草桿菌則下降至 2.17 ± 0.26 ppm 組，但皆較對照組低，至第 6 天兩試驗組及對照組氨態氮濃度達最高。至第 7 天時，兩試驗組分別再添加第 2 次光合菌或枯草桿菌，池水氨態氮濃度分別為 3.67 ± 0.24 ppm 及 3.0 ± 0.19 ppm。試驗在第 10 天時添加光合菌組氨態氮濃度降低至 1.17 ± 0.11 ppm，之後氨態氮濃度漸漸升高；添加枯草桿菌組第 11 天氨態氮濃度降低至 1.0 ± 0.31 ppm，第 12 天達最低，為 0.5 ± 0.32 ppm，而後氨態氮濃度漸漸升高。於第 14 天第 3 次添加益生菌，光合菌組第 15 天時氨態氮濃度下降至 1.67 ± 0.14，枯草桿菌組則上升至 2.0 ± 0.21 ppm，皆低於對照組 4.0 ± 0.21 ppm。

試驗期間，監測添加益生菌之石斑魚養殖池水的亞硝酸濃度，結果如 Fig. 1b 所示。第 1 次添加益生菌的第 2 天，兩試驗組及對照組的亞硝酸濃度都上升至 0.15 ± 0.015 ppm，添加後第 3 天，兩試驗組亞硝酸濃度維持於 0.15 ± 0.012 ppm，皆較對照組亞硝酸濃度 0.2 ± 0.011 ppm 為低；第 4 天，添加光合菌組之亞硝酸濃度已下

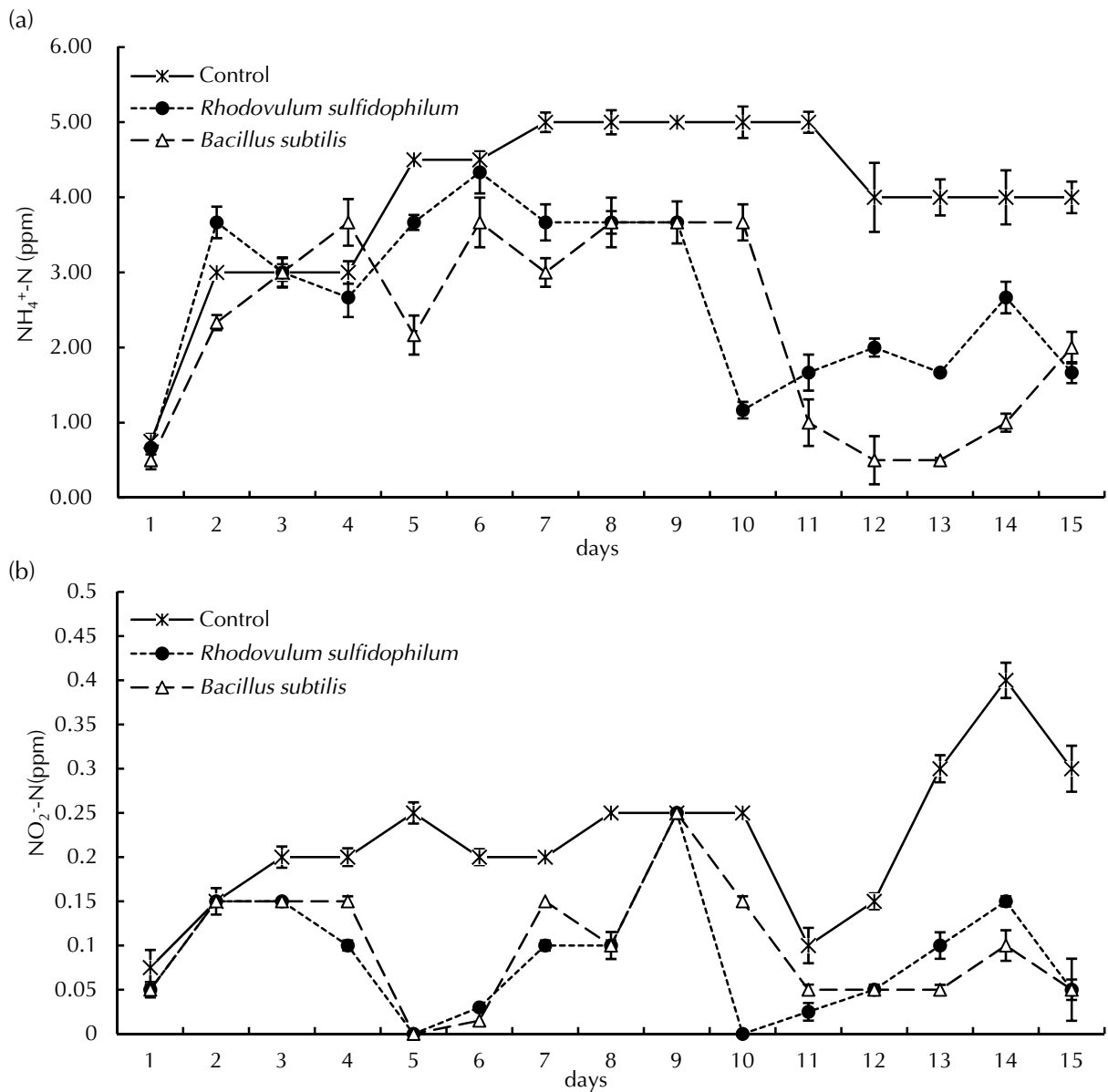


Fig. 1 (a) NH_4^+ and NO_2^- in the grouper ponds both with and without (control) adding *Rhodovulum sulfidophilum* and *Bacillus subtilis* during 15 days of rearing; (b) addition of *Rhodovulum sulfidophilum* and *Bacillus subtilis*, grouper pond water nitrite concentration change of circumstances.

降至 0.1 ± 0.006 ppm，添加枯草桿菌組則維持於 0.15 ± 0.0058 ppm。第 5 天，兩試驗組亞硝酸濃度大幅下降至 0 ppm，而對照組亞硝酸濃度持續上升至 0.25 ± 0.012 ppm；第 6 天後，兩試驗組亞硝酸濃度漸漸上升，第 7 天，兩試驗組分別第 2 次添加光合菌和枯草桿菌，第 9 天時，兩試驗組亞硝酸濃度上升至與對照組同為 0.25 ± 0.06 ppm。第 10 天時，添加光合菌組之亞硝酸濃度則降至 0 ppm，而添加枯草桿菌組濃度降低為 0.15 ± 0.056 ppm；由第 11 天起，添加光合菌組池水

亞硝酸濃度漸漸上升，而添加枯草桿菌組則降低至 0.05 ± 0.062 ppm，維持至第 13 天。至第 14 天，兩試驗組第 2 次益菌，亞硝酸濃度分別上升為 0.15 ± 0.008 ppm 及 0.1 ± 0.173 ppm，第 15 天時，兩試驗組亞硝酸降為 0.05 ± 0.035 ppm (Fig. 1b)。

光合菌及枯草桿菌對石斑魚成長試驗結果發現，石斑魚在添加不同益菌處理組環境下飼養 2 週後體重變化於 Fig. 2 顯示，添加光合菌組及枯草桿菌組體重與對照組無顯著差異 ($P > 0.05$)。添加

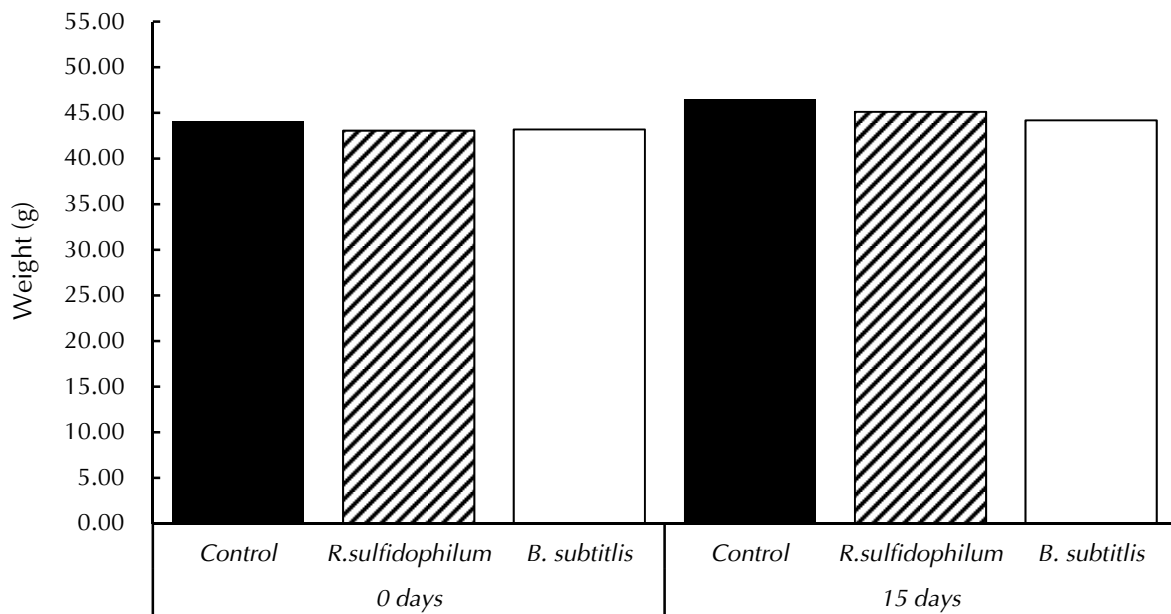


Fig. 2 Body weight of grouper which were reared in the ponds with or without (control) adding *Rhodovulum sulfidophilum* and *Bacillus subtilis* after 15 days of culture.

光合菌 10^4 CFU/ml 平均體重由 43.1 ± 3.0 g 增加至 45.1 ± 3.8 g, 增重百分率為 4.7%; 添加枯草桿菌 10^4 CFU/ml 平均體重由 43.2 ± 4.2 g 增加至 44.2 ± 3.3 g, 增重百分率為 2.3%; 對照組平均體重由 44.1 ± 4.3 g 增加至 46.5 ± 5.9 g, 增重百分率為 5.4%, 對照組增重百分率高於兩試驗組, 而三試驗組之飼料轉換率 [feed conversion rate; $FCR = \text{魚隻攝食飼料量 (g)} / \text{魚隻增重量 (g)}$] 皆為 1.04。本試驗魚隻存活率, 對照組為 $98.7 \pm 1.15\%$, 光合菌組 $97.3 \pm 2.31\%$, 枯草桿菌組為 $94.3 \pm 3.21\%$ 。

討 論

光合菌及枯草桿菌抑制病原菌試驗結果顯示這兩株菌對 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum* 及 *V. parahaemolyticus* 三種弧菌具有抑制力。Peypoux *et al.* (1999) 研究結果證明枯草桿菌可分泌抗菌物質, 並與病原菌競爭能量及營養, 因而產生抑制病原菌的效果。

益生菌對病原菌有抑制效果, 推測是因為益生菌可產生多種抗菌物質, 包括有抗生素, 細菌素, 鐵螯合劑 (siderophore), 溶菌酶 (lysozyme), 蛋白酶 (protease) 和過氧化氫, 在腸道時可以產

生有機酸調整 pH 值, 以此來達到抑制病原菌之效益 (Verschuere *et al.*, 2000; Patricia *et al.*, 2012)。陳等 (2002) 也指出, 每天添加 $10 \sim 20$ ppm 含有光合菌及枯草桿菌之生物製劑於草蝦及白蝦苗繁殖池中, 可有效降低病原菌的滋生, 提高育成率。

本試驗之光合菌抑制病原菌的能力並不會隨著濃度提高而增加, 當濃度為 10^8 CFU/ml 時之抑制能力, 僅對 *V. anguillarum* 濃度 10^5 CFU/ml 時有抑制力, 抑菌圈為 10 ± 0.6 mm; 光合菌濃度在 10^8 CFU/ml 時抑制能力較 $10^4 \sim 10^7$ CFU/ml 差, 對 *V. alginolyticus* 無抑制力, 推測當光合菌濃度越高時, 與高濃度之病原菌共同競爭營養物質, 以及抑制病原菌之分泌細胞產物量減少, 因而影響抑制病原菌之效果。當光合菌濃度降至 $10^4 \sim 10^7$ CFU/ml 對 *V. alginolyticus* $10^5 \sim 10^8$ CFU/ml 及 *V. anguillarum* 濃度 $10^5 \sim 10^7$ CFU/ml 有抑制力, 且隨著病原菌濃度降低其抑制圈範圍增大。推測適當濃度的光合菌時, 環境之營養較為充足的情況下, 相對的其能分泌抑制病原菌的能力也隨之提高。然而光合菌對 *V. parahaemolyticus* 抑制力較差, 當光合菌濃度於 $10^4 \sim 10^8$ CFU/ml 對 *V. parahaemolyticus* 皆有抑制能力, 但沒有隨著濃度下降而有增加抑制能力, 僅對濃度 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml *V. parahaemolyticus* 有微弱抑制力, 抑制

圈範圍 (7 ~ 11) \pm 1.0 mm，光合菌對 *V. parahaemolyticus* 抑制力較弱，且對 *A. hydrophila* 無抑制力能力，可能原因為兩株病原菌 *V. parahaemolyticus* 及 *A. hydrophila* 所需之營養物質與本株光合菌不同，在營養上非相互競爭關係，又光合菌所分泌之抗菌物質不會對 *A. hydrophila* 產生拮抗抑制作用。

在枯草桿菌結果部分，同樣也對 *A. hydrophila* 無抑制力，與光合菌抑制試驗結果不同的是，枯草桿菌濃度於 10^8 CFU/ml 對於高濃度之病原菌也仍有抑制力，其中對 *V. anguillarum* 抑制效果最佳，枯草桿菌濃度 10^4 CFU/ml 時，對 *V. anguillarum* 濃度 10^6 CFU/ml 即有抑制力，抑制圈範圍為 8 ± 0.6 mm，枯草桿菌濃度增加至 10^8 CFU/ml 抑制圈範圍隨著增加至 26 ± 2.0 mm，枯草桿菌對 *V. anguillarum* 及 *V. parahaemolyticus* 兩病原菌也有同樣的抑制結果，枯草桿菌抑制病原菌之能力會隨著濃度增加而增加，且對本試驗三株病原菌有抑制力，推測因枯草桿菌能產生抗菌物質達 66 種，且抗生物質的結構不易被蛋白酶所水解 (Katz and Demain, 1977)，其所分泌的抗菌物質因桿草桿菌濃度的增加而累積，因此抑菌力也增加，此結果則與光合菌有所不同。

光合菌及枯草桿菌抑制病原菌試驗結果，有效抑制病原菌濃度為 10^4 CFU/ml，而續以該濃度菌量進行體內注射於點帶石斑魚，評估光合菌及枯草桿菌對點帶石斑魚之安全性，結果顯示石斑魚分別注射光合菌、枯草桿菌或同時注射兩益生菌，魚隻存活率分皆在 $96.7 \pm 5.8\%$ 以上，經統計分析，3 組試驗組與對照組之存活率並沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，並確認兩益生菌對點帶石斑魚無致死性，未對魚隻產生危害及影響，符合益生菌使用之基本條件，可適當的應用於石斑魚養殖。目前光合菌及枯草桿菌在農業生產使用上也相當普遍，多能幫助生物成長，降低疾病產生等功能 (Rengpipat *et al.*, 2000; Keysami *et al.*, 2007)，陳等 (2004) 在養蝦池中添加光合菌量在 10^3 CFU/ml 以上，可增進草蝦成長，且有助於提高草蝦存活率，因此本試驗使用之兩益生菌在未來開發應用上仍具研究應用潛力。

將光合菌及枯草桿菌兩種益生菌定期添加於石斑魚養殖池中，結果顯示，第一次分別添加兩

種益生菌之石斑魚，在試驗期間的第 1 及第 2 天，觀察到光合菌組的石斑魚肛門處有拖糞的現象，且有攝食量降低，排泄量增加的情形，推測是因益生菌尚未穩定作用，致使水中氨態氮及亞硝酸濃度上升，且添加光合菌組池水中氨態氮的濃度上升幅度較大。到添加後第 4、5 天時開始下降，推測為光合菌及枯草桿菌對於水中氨態氮及亞硝酸產生固氮、脫氮、固碳及硫化物氧化作用，而使水質能趨於穩定。在第 7 天，氨態氮及亞硝酸又開始上升，於第 7 天第二次添加益生菌後，對魚隻攝食量降低情形及肛門處拖糞情況已較不明顯，但氨態氮及亞硝酸有微幅上升；至第 10 天，光合菌組及枯草桿菌組之氨態氮及亞硝酸濃度值均明顯下降，且光合菌組下降幅度較大。試驗期間第 5 天起，兩試驗組池水中氨態氮及亞硝酸濃度值皆較對照組池水低。

本試驗顯示，光合菌及枯草桿菌兩益生菌均能有效降低池水中之氨態氮及亞硝酸的濃度，和陳等 (2004) 及 Porubcan (1991) 研究有相同結果。多篇研究報告都指出，光合菌與枯草桿菌皆具有多種的異營功能，固氮、脫氮、固碳、氧化硫化物等，並可分泌多種酵素，又可分解有機物質而淨化水質，降低水中氨態氮、亞硝酸、硝酸、磷酸、BOD、COD (Priest 1993; Azad *et al.*, 2001; Hargreaves, 2006; Laloo, 2007)，因此添加這兩種菌於石斑魚養殖池中時可以發揮淨化水質的效果。

在益生菌添加於石斑魚養殖池水試驗中還發現，試驗期間 3 次添加益生菌，光合菌試驗組池水中氨態氮及亞硝酸濃度下降速度較添加枯草桿菌組下降速度快，但添加枯草桿菌組持續穩定水質的時間及維持低氨態氮及亞硝酸濃度的時間較長。在降低池水中氨態氮及亞硝酸濃度效果上，添枯草桿菌之試組對於氨態氮濃度的降低效果較佳，而添加兩益生菌試驗組皆能有效降低池水中亞硝酸，且效果相近。

綜合本試驗結果，建議石斑魚養殖過程中定期每 6 ~ 7 天添加 10^4 CFU/ml 濃度之光合菌或枯草桿菌，可使該等益生菌成為養殖水體中之優勢菌種，具有抑制重要病原菌及降低機原性病原菌感染的機會。此外，同時複合使用光合菌及枯草桿菌，可達到快速降低水中氨態氮及亞硝酸濃度的同時，還有長時間穩定水質的效果，對於

提高石斑魚養殖收益有良好之效益。針對兩種以上之益生菌複合使用時，可能會產生多重保護，使養殖生物較不易被病原菌感染 (Timmerman *et al.*, 2004)，將成為未來進行相關研究之目標。

謝 辭

本研究獲行政院農業委員會「水產種苗研究團隊-益生菌於水產養殖應用之研究」(98 農科-10.3.1-水-A4) 計畫經費支助，執行期間承蒙本所海水中心同仁之努力及協助，使本研究順利完成，謹此表達由衷謝意。

參考文獻

- 郭世榮, 陳敏隆, 吳豐成, 丁雲源 (2003) 添加光合菌及硝化菌等有益菌降低養殖草蝦病害之評估. 農政與農情, 138.
- 陳秀男, 冉繁華, 黎錦超, 呂仲倫, 洪明欣, 張景盛, 劉育霖, 廖述育, 施亞男, 張簡子輝 (2002) 白蝦養殖技術手冊. 台灣省漁會漁業推廣叢書, 5: 25-33.
- 陳敏隆, 郭世榮, 吳豐成, 丁雲源 (2004) 添加有益菌對蝦池水質及草蝦養成之影響. 海水繁養殖研究, 2(1): 33-43.
- 陳建初 (1983) 氮及其化合物. 水質分析, 九大圖書公司, 臺北, 85-103.
- 劉文準, 倪純治, 葉德贊, 周宗澄, 林燕順, 陳慶輝, 姚瑞梅, 曾活水, 顧靜瑜 (1997) 光細菌淨化對蝦養殖水質的研究. 台灣海峽, 16: 455-457.
- Azad, S. A., S. Vikineswary, K. B. Ramachandran, and V. C. Chong (2012) Growth and production of biomass of *Rhodovulum sulfidophilum* in sardine processing wastewater. Lett. Appl. Microbiol., 33(4): 264-268.
- Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck (1966) Antibiotic susceptibility testing by an standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45(4): 493-496.
- Chen, J. C. and P. C. Liu (1990) Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. Aquaculture, 89(2): 127-137.
- Chen, J. C. and Y. Z. Kou (1992) Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. Aquaculture, 104(3-4): 249-260.
- Chien, Y. H. and R. Y. Liang (1994) The effects of photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas Capusulatus* addition and hard clam *Meretrix* *Lousoria* polyculture on kuruma prawn *Penaeus japonicus* culture system. World Aquaculture '94, Jan 12-18, New Orleans, Louisiana.
- Cruz, P. M., A. L. Ibáñez, O. A. M. Hermosillo and H. C. R. Saad (2012) Use of probiotics in aquaculture. ISRN Microbiol., 2012: 1-13.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO Expert Consultation Report, London Ontario, Canada.
- Farzanfar, A. (2006) The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol. Medical. Microbiol., 48(2): 149-158.
- Hargreaves, J. A. (2006) Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacul. Eng., 34(3): 344-363.
- Irianto, A. and B. Austin (2002) Probiotics in aquaculture. J. Fish Dis., 25(11): 633-642.
- Jana, B. B. and S. Jana (2003) The potential and sustainability of aquaculture in India. J. Appl. Aquacul., 13: 283-316.
- Katz, E. and A. L. Demain (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriol. Rev. 41(2): 449-474.
- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren, and M. Troell (2000) Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, 191(1): 145-161.
- Keysami, M. A., C. R. Saad, K. Sijam, H. M. Daud and A. R. Alimon (2007) Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquacul. Nutri., 13: 131-136.
- Laloo, R., S. Ramchuran, D. Ramduth, J. Göergens and N. Gardiner (2007) Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. J. Appl. Microbiol., 103(5): 1471-1479.
- Lavilla-Pitogo, C. R., A. R. Castillo and M. C. Cruz (1992) Occurrence of *Vibrio* sp. infection in grouper, *Epinephelus suillus*. J. Appl. Ichthyol., 8(1): 175-179.
- Lee, K. K. (1995) Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et schneider. Microb. Pathog., 19(1): 39-48.
- Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965) Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganism. Science, 147(3659): 747-748.
- Madigan, M. T. (2004) Microbiology of nitrogen fixation

- by anoxygenic photosynthetic bacteria. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria Advances in Photosynthesis and Respiration*, 2: 915-928.
- Rengpipat S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191(4): 271-288.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin and J. Wallach (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51(5): 553-563.
- Prabhu, N. M., A. R. Nazar, S. Rajagopal and S. Khan (1999) Use of probiotics in water quality management during shrimp culture. *J. Aquacul. Trop.*, 14(3): 227-236.
- Priest, F. G. (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus Subtilis and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, American Society of Microbiology, Washington, 3-16.
- Porubcan, R. S. (1991) Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using floating biofilters containing processed diatomaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria. *Proceedings of the Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition, World Aquaculture Society, Puerto Rico, Spain, June.*
- Queiroz, J. F. and C. E. Boyd (1998) Effects of a bacterial inoculums in channel catfish ponds. *J. World Aquacul. Soc.*, 29(1): 67-73.
- Sakai, M., T. Yoshida, S. Atsuta and M. Kobayashi (1995) Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss Walbaum* by oral administration *Clostridium butyricum* bacterin. *J. Fish Dis.*, 18(2): 187-190.
- Shariff, M., F. M. Yusoff, T. N. Devaraja and P. S. Srinivasa Rao (2001) The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) ponds. *Aquacul. Resh.*, 32(3): 181-187.
- Skjermo, J. and O. Vadstein (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177(1-4): 333-343.
- Sze, C. P. (2000) Antibiotics use in aquaculture. *Infosh Int.*, 19: 24-28.
- Timmerman, H. M., C. J. M. Koning, L. Mulder, F. M. Rombouts and A. C. Beynen (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *Int. J. food Microbiol.*, 96(3): 219-233.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.*, 64(4): 655-671.
- Watanabe, M., K. Sasaki, Y. Nakashimada, T. Kakizono, N. Noparatnaraporn and N. Nishio (1998) Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50(6): 682-691.
- Yii, K. C., T. I. Yang and K. K. Lee (1997) Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the grouper, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.*, 35(2): 109-115.

Application of *Rhodovulum sulfidophilum* and *Bacillus subtilis* to a Nursery of Orange-Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*

Yu-Chen Wu^{1*}, Feng-You Lin¹, Chia-Fang Lee², Chih-Chung Huang¹ and Shinn-Lih Yeh¹

¹Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

²Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Due to the discharge of metabolic waste in feces and the accumulation of uneaten feed, cultural ponds are easily polluted by massive ammonia nitrogen, nitrite, and organic matter. It deteriorates the cultivation environment and usually causes prevalence of diseases in fish. Therefore, the improvement of the cultivation environment and the reduction of infection opportunity for pathogens are the key factors for enhancing survival rate. The aim of this research is to investigate the effects of the probiotic, photosynthetic bacteria *Rhodovulum sulfidophilum* and *Bacillus subtilis* on the inhibition of several *Vibrio* pathogens in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* aquaculture. *In vitro*, the *R. sulfidophilum* and *B. subtilis* at the concentration of 10^4 CFU/ml effectively inhibited the multiplication of *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, and *V. parahaemolyticus* in plates. The addition of *R. sulfidophilum* and *B. subtilis* into water can mitigate the amounts of ammonia nitrogen and nitrite in the ponds and thus stabilize water quality. The research showed that adding *R. sulfidophilum* and *B. subtilis* to the grouper culture pond can stabilize water and inhibit pathogens; create a good nursery environment for grouper culture; reduce the prevalence of disease; and elevate the breeding gains.

Key words: probiotic, photosynthetic bacteria *Rhodovulum sulfidophilum*, *Bacillus subtilis*, grouper

*Correspondence: Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute, Cigu, Tainan, Taiwan. TEL: (06) 788-0461 ext. 228; FAX: (06) 7881-597; E-mail: yijane0817@yahoo.com.tw