

自海水魚蝦篩選抗水產病原弧菌之拮抗菌

朱惠真¹·黃美瑩^{1*}·劉旭展¹·曾亮璋¹·潘崇良²·張錦宜¹

¹行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

²國立臺灣海洋大學食品科學系

摘要

水產病原弧菌所引起的弧菌疾病長久以來都是水產養殖產業的重大威脅之一，急需研發微生物防治策略以控制弧菌疾病。本研究擬自市場販售之海水魚蝦中分離篩選具有抗水產病原弧菌之拮抗菌，挑選抗弧菌能力強的菌株，進一步探討其對抗生素之耐受性，以做為將來應用之參考。本研究共購買 4 種海水魚蝦樣品，自其中分離純化出 84 個菌株，將上述菌株分別測試其對常見水產病原弧菌-溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 及哈維氏弧菌 (*V. harveyi*) 的抑制能力。經比較其抗弧菌能力後發現，較強的是來自白蝦樣品所分離出的 D5 菌株，D5 菌株依其革蘭氏染色、相關生理、生化特性及 16S rRNA 基因分析鑑定為 *Bacillus pumilus*，並命名為 *Bacillus pumilus* D5。進一步探討 *Bacillus pumilus* D5 菌株對不同水產病原弧菌之抑菌情形顯示，該菌株除了對於溶藻弧菌、腸炎弧菌及哈維氏弧菌有抑制能力外，對於鰻弧菌 (*V. anguillarum*)、霍亂弧菌 (*V. cholerae*) 及創傷弧菌 (*V. vulnificus*) 亦有抑制作用。此外，*B. pumilus* D5 也具有抑制大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的能力。進一步測試 *B. pumilus* D5 對 15 種水產常用抗生素耐受性試驗，結果顯示，除了對於 lincomycin 具抵抗力外，對於其餘 14 種抗生素均為敏感性。以上結果顯示，*B. pumilus* D5 具有抑制溶藻弧菌、腸炎弧菌、哈維氏弧菌、鰻弧菌、霍亂弧菌及創傷弧菌等 6 種常見水產病原弧菌之能力，且對於所測試 14 種抗生素皆呈現敏感性，具有做為抗水產病原弧菌的拮抗菌之發展潛力。

關鍵詞：拮抗菌、抗水產病原弧菌、*Bacillus pumilus*、抗生素抗性

前言

弧菌為海水中最常見的細菌之一，病原弧菌所引起的弧菌疾病 (vibriosis) 長久以來都是水產養殖產業的重大威脅之一。尤其是溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 及哈維氏弧菌 (*V. harveyi*)，是養殖蝦類主要的細菌性疾病的病原，造成蝦類胰臟、心臟、淋巴器官等壞死 (Ruangpan and Kitao, 1991; Karunasagar *et al.*, 1994)。塔氏弧菌 (*V. tubiashii*) 為雙枚貝很嚴重的病原菌，曾經造成雙

枚貝大量死亡，養殖業者損失慘重 (Tubiash *et al.*, 1965; Elston *et al.*, 2008)。哈維氏弧菌、*V. carchariae* 及鰻弧菌 (*V. anguillarum*) 分別為石斑魚 (Yii *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2008) 及鱸魚 (Sorroza *et al.*, 2012) 重要的病原菌之一，造成罹病魚類眼部感染、肌肉潰瘍、腎臟與膽囊腫大、胃腸炎及敗血症等。

近年來爆發於養殖草蝦與白蝦的蝦類早期死亡綜合症 (early mortality syndrome; EMS)，也與弧菌感染相關 (Tran *et al.*, 2013)。本病於 2009 年初次在中國傳出疫情後，迄今已有好幾個亞洲國家的養殖草蝦 (*Penaeus monodon*) 與白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 接連發生大量死亡 (Leaño and Mohan, 2012)，目前部分地區甚至已減產 60% (FAO, 2013)。罹患 EMS 的病蝦，會出現肝胰腺蒼

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: myhuang@mail.tfrin.gov.tw

白萎縮之肉眼病變，並可在大部分染病蝦類之肝胰腺分離出弧菌。Lightner *et al.* (2012) 指出，將純化的特殊腸炎弧菌菌株感染健康的蝦類後會出現 EMS 之病狀，此時若同時存在一種會侵襲特殊腸炎弧菌的噬菌體，就會引起死亡，推測可能特殊腸炎弧菌被噬菌體感染後產生之毒素影響蝦類肝胰腺，致使肝胰腺出現病變與功能性障礙。

當面臨水產生物細菌感染的問題時，養殖戶常使用抗生素加以治療，在亞洲國家，蝦類養殖密度太高及抗生素的濫用，導致蝦類產量下降 (Gatesoupe, 1999)，而抗生素過量的使用易發生殘留而污染環境及危害人體健康，此外抗生素的濫用也可能導致具有抗藥性的菌株出現，該類具有抗藥性的細菌也會危害到人類。研究顯示，特定抗藥性的基因能夠以特殊方式進入人體可能接觸到的細菌中 (Witte, 2000)，此過程意味著，來自養殖場的抗藥性細菌有可能藉質體轉移抗藥性之基因到人體有關的細菌，進而造成人類的健康問題，這是目前相當重要的議題 (Schwarz *et al.*, 2001)。因此基於抗生素的施用及病菌對於養殖生物與人體健康的威脅，必須尋求其他方式以維持養殖生物之健康。

近年來研究顯示，益生菌當中具有抗菌活性之拮抗菌在水產養殖上可以抵抗病原菌，在水產生物的腸道中，拮抗菌可以減少機會性病原菌的侵害，並提高生物遭受病原菌攻擊後的活存率 (Balcázar *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014)。拮抗菌抑制病原菌之方式主要包括：產生抗菌肽、產生揮發物質、產生溶菌酶、產生蛋白酶、改變 pH 值及競爭營養物質或空間等 (Leyton and Riquelme, 2010; Nair *et al.*, 2012)。此外，使用益生菌可以增加養殖生物之營養、改進飼料消化性、提升免疫、抵抗病毒及改善水質等，因此益生菌可以促進養殖生物的成长、提高抗病力與活存率 (Tucker and Kennedy, 2001; Wang *et al.*, 2008; Nayak, 2010)。

由於水產病原弧菌是海水養殖魚貝類發生嚴重細菌性疾病的主要原因之一，研發強力抗水產病原弧菌之拮抗菌的益生菌製劑，可以降低抗生素的使用，減少抗藥性的菌株出現，是友善水產養殖環境的方式之一。雖然市面上有許多種益生菌產品，但是，目前為止，市面上尚未有針對水產病

原弧菌有明顯抑制效果之益生菌產品。因此，本研究擬自海水水產生物篩選有效的抗水產病原弧菌之拮抗菌，進行菌種鑑定，並探討該細菌對不同抗生素之耐受性，作為研發抗水產病原弧菌之益生菌的基礎資料，以有效提高魚貝類之抗水產病原弧菌的能力及減少養殖用藥，進而建構安全且高效率的水產養殖體系，促進水產養殖產業升級。

材料與方法

一、細菌菌株

(一) 抗水產病原弧菌之菌株的分離、純化與保存

1. 樣品來源與前處理

本研究樣品來自基隆市和平橋旁的水產販賣攤販，包括白蝦全蝦、黑鯛 (*Acanthopagrus schlegelii*)、海水吳郭魚 (*Oreochromis* spp.) 與點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 腸道等 4 種。白蝦為 10 ~ 15 g，黑鯛、海水吳郭魚與點帶石斑魚大小分別為 358 g、346 g 及 321 g。

白蝦去殼後，取全蝦 5 g 加入 45 mL 無菌的生理食鹽水 (0.85% NaCl) 後，以均質機 (T18 basic Ultra Turrax®, IKA® Works Inc., Wilimington, NC, USA) 配合已滅菌之均質刀 (S18N-10 G Dispersing Tool, IKA® Works Inc.) 充分打碎，即為白蝦全蝦樣品。

黑鯛、海水吳郭魚與點帶石斑魚等魚隻腸道取樣方法，先將魚隻以 75% 酒精進行表面殺菌，以滅菌後之剪刀剪開魚隻腹部，配合滅菌後之鑷子取出腸道，剪成數小段，取 2 g 加入 18 mL 無菌的生理食鹽水稀釋後，以前述均質機配合已滅菌之均質刀充分打碎，即為腸道樣品 (Parvathi *et al.*, 2009; Hoseinifar *et al.*, 2011)。

2. 菌株的分離、純化與保存

前述 4 種樣品經適當稀釋，分別塗抹於額外添加 2% 氯化鈉之胰蛋白胨大豆洋菜培養基 (Tryptic soy agar, TSA; Difco) 後，置於 28 ± 0.5 °C 恆溫箱中培養 48 hr，挑選菌落外觀具有明顯差異

者共 84 個菌落，以額外添加 2% 氯化鈉之 TSA 進行分離純化 3 次，得到純化之菌株。

需要保存之菌株先以添加 2% 氯化鈉胰蛋白胨大豆液態培養液 (Tryptic soy broth, TSB; Difco) 於 28 °C 培養 48 hr 後，取部分菌液添加 15% (v/v) 甘油 (glycerol) 於 -80 °C 進行菌種保存，部分菌液則進行離心 (10,000 × g, 20 min, 4 °C) 去除上澄液後，添加與菌體等量之 10% (w/v) 脫脂牛奶進行冷凍乾燥菌種保存 (Hill *et al.*, 2009; Parvathi *et al.*, 2009)。

二、抗水產病原弧菌之菌株的篩選與鑑定

(一) 抗水產病原弧菌菌株之篩選 (塗抹法)

以下實驗參照並修飾 Tagg and McGiven (1971) 之洋菜孔洞擴散法 (agar-well diffusion method)。將經純化之試驗菌株及 3 株常見病原弧菌 - 溶藻弧菌、腸炎弧菌及哈維氏弧菌，分別於額外添加 2% 氯化鈉之 TSB 中 28 °C 培養 24 hr，使用簡易分光光度計 (WPA CO75, Linton, Cambridge, UK) 於 600 nm (Optical Density, OD_{600nm}) 測定吸光值，再以無菌生理食鹽水調整實驗菌株與溶藻弧菌、腸炎弧菌及哈維氏弧菌等常見病原弧菌之吸光值 (OD_{600nm}) 至 0.4 (菌數為 10⁸ CFU/mL)，弧菌菌液調整至 OD_{600nm} 為 0.4 後再稀釋為 1/1000。

取吸光值 OD_{600nm} 為 0.4 後再稀釋為 1/1000 之弧菌菌液 100 μl (菌數為 10⁵ CFU/mL)，均勻塗於額外添加 2% 氯化鈉之 TSA，以 1 mL 之吸管尖 (前端剪掉) 在 TSA 上挖出直徑約 0.5 cm 之凹槽，並加入吸光值 OD_{600nm} 為 0.4 的實驗菌株之菌液 20 μl (菌數為 10⁸ CFU/mL)，於 28 °C 培養 24 hr 後觀察結果，並測量凹槽附近所出現的透明圈之大小 (mm)，透明圈較大者，表示該菌株拮抗弧菌的能力較強。

(二) 菌株鑑定

根據抗 3 株常見水產病原弧菌之結果，挑選菌落附近所出現的透明圈較大者之菌株進行菌種鑑定。

1. 傳統方法之鑑定

細菌之鑑定係依 Benson (2002) 及 Johnson and Case (2004) 之方法，將所分離純化的菌株先藉由革蘭氏染色、孢子染色、鏡檢、觸酶試驗、生物化學試驗及對不同基質之利用等，進行初步菌屬 (genus) 及菌種 (species) 的分類。

2. 16S rRNA 基因序列測定與菌種鑑定

依照 Weisburg *et al.* (1991) 之方法抽取細菌總 DNA 並透過 16S rRNA 基因序列進行菌種鑑定。所用細菌 16S rRNA 基因序列通用引子 (16S_F:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 及 16S_R:5'-GGTACCTTGT-TACGACTT-3') 經聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式擴增。細菌 16S rRNA 基因序列測定委由明欣生物科技有限公司 (臺北，臺灣) 進行。定序結果利用 BLAST 程式 (Pearson and Lipman, 1988) 與 GenBank 資料庫的基因進行比對，選取相似度最高的物種為細菌鑑定之依據。系統發生樹 (phylogenetic tree) 的建構採用 鄰近連接法 (Neighbor-joining method) (Saitou and Nei, 1987)，以 Accelrys Gene v2.5 (Accelrys, Inc., USA) 套裝軟體進行分析而得。

三、對不同水產病原弧菌、大腸桿菌及沙門氏菌之抗菌試驗 (混菌法)

所測試之菌株詳見 Table 1，包括 7 種水產病原弧菌：溶藻弧菌、鰻弧菌、霍亂弧菌 (*V. cholerae*)、哈維氏弧菌、腸炎弧菌、溶蛋白弧菌 (*V. proteolyticus*) 及創傷弧菌 (*V. vulnificus*)；2 株大腸桿菌 (*Escherichia coli* BCRC 11549 和 *E. coli* BCRC 11634) 及鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028)。抗水產病原弧菌之菌株及 7 種水產病原弧菌分別於額外添加 2% 氯化鈉之 TSB 中 28 °C 培養 24 hr，以生理食鹽水調整抗水產病原弧菌之菌株至 OD_{600nm} 為 0.4 (菌數為 10⁸ CFU/mL)，7 種不同水產病原弧菌則調整至 OD_{600nm} 為 0.5 (菌數為 10⁸ CFU/mL)。2 株大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌分別於 TSB 中 28 °C 培養 24 hr，以生理食鹽水調整至 OD_{600nm} 為 0.5 (菌數為 10⁸ CFU/mL)。

Table 1 Bacterial strains used in this study

strain	incubation condition	source
<i>Vibrio</i>		
aerobic		
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC ¹
<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC
<i>V. cholera</i> ATCC 14035	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC
<i>V. proteolyticus</i> ATCC 15338	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	TSB + 2.0% NaCl, 28°C	ATCC
<i>Escherichia</i>		
aerobic		
<i>Escherichia coli</i> BCRC 11549	TSB, 28°C	BCRC ²
<i>E. coli</i> BCRC 11634	TSB, 28°C	BCRC
<i>Salmonella</i>		
aerobic		
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	TSB, 28°C	ATCC

¹ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, U.S.A.

²BCRC: Bioresources Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan.

培養皿預先放入直徑約 0.9 cm 之鐵環以形成凹槽，取 20 mL 已滅菌、未凝固 (溫度 45 °C)、額外添加 2% 氯化鈉之 TSA，加入 6 µl 水產病原弧菌菌液混合均勻後，倒入培養皿中，待 TSA 凝固後將鐵環拔除。在凹槽中加入 50 µl 抗水產病原弧菌菌株之菌液。置於 28 °C 培養 24 hr 後觀察結果，並測量凹槽附近所出現的透明圈之大小 (mm)。

培養皿預先放入直徑約 0.9 cm 之鐵環以形成凹槽，取 20 mL 已滅菌、未凝固 (溫度 45 °C) 之 TSA，加入 6 µl 大腸桿菌或鼠傷寒沙門氏菌菌液混合均勻後，倒入培養皿中，待 TSA 凝固後將鐵環拔除。在凹槽中加入 50 µl 抗水產病原弧菌菌株之菌液。置於 28 °C 培養 24 hr 後觀察結果，並測量凹槽附近所出現的透明圈之大小 (mm)。

四、對不同抗生素之耐受性試驗

參照 Bauer *et al.* (1966) 使用商業的抗生素，利用標準環片擴散法 (standard disc diffusion method) 進行。將抗水產病原弧菌之菌株於額外添加 2% 氯化鈉之 TSB 中 28 °C 培養 24 hr，以生理食鹽水調整抗水產病原弧菌菌液之吸光值至 McFarland 0.5 (菌數為 10⁶ CFU/mL)。取調整後之菌液 100 µl 均勻塗於額外添加 2% 氯化鈉之

TSA，並分別貼上 15 種抗生素環片，在 28 °C 培養 24 hr 後，測量環片周圍所出現的透明圈之大小 (cm)，以了解菌株對於該抗生素之敏感程度。

所測試的抗生素包含 10 種水產常用抗生素：ampicillin 25 µg (Oxoid)、amoxicillin 25 µg (Oxoid)、doxycycline 30 µg (Oxoid)、erythromycin 15 µg (Oxoid)、florfenicol 30 µg (Oxoid)、flumequine 30 µg (Oxoid)、lincomycin 10 µg (Oxoid)、oxytetracycline 30 µg (Oxoid) 和 oxolinic acid 2 µg (Oxoid) 及 spiramycin 100 µg (Oxoid)。5 種其他抗生素：ciprofloxacin 5 µg (Oxoid)、pencillin G 10 unit (Oxoid)、sulphamethoxazole/trimethoprim 25 µg (Oxoid)、tetracycline 30 µg (Oxoid) 和 vancomycin 30 µg (Oxoid)。

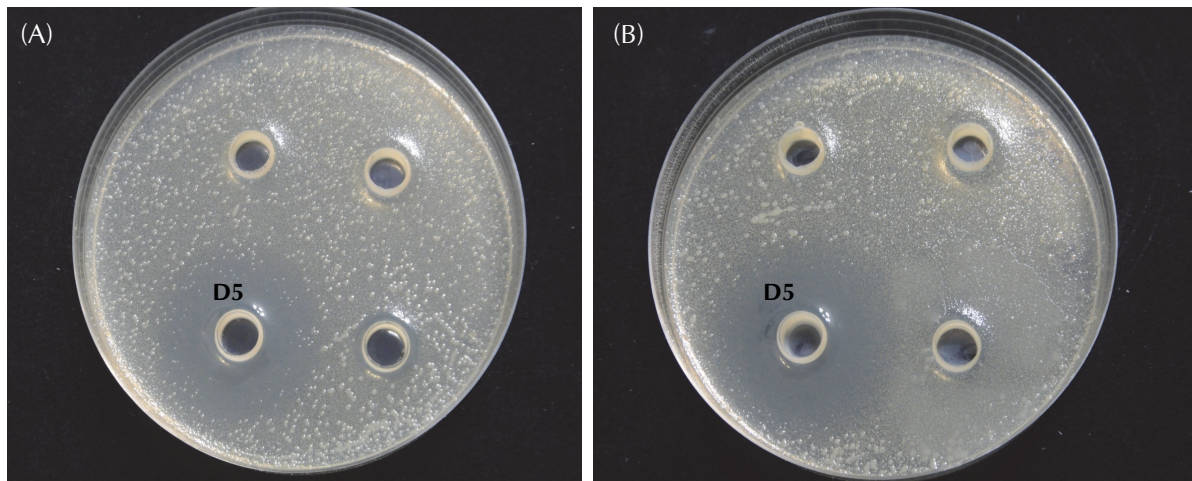
結 果

一、抗水產病原弧菌之菌株的分離、純化與保存

由白蝦全蝦、黑鯛、海水吳郭魚與點帶石斑魚腸道共純化出 84 個菌株，經比較其抗弧菌能力後發現，該 84 個菌株中，對溶藻弧菌的抑菌

Table 2 Antagonistic activities against *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. harveyi* of bacteria isolated from 4 samples in this study

	<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. parahaemolyticus</i>				<i>V. harveyi</i>			
	inhibitory zone diameter (mm)											
	0	0.5-2.9	3.0-4.9	5.0-6.0	0	0.5-2.9	3.0-4.9	5.0-6.0	0	0.5-2.9	3.0-4.9	5.0-6.0
number of bacteria												
sample origin, number												
sample A ¹ , 32	8	24	0	0	22	9	1	0	16	15	0	1
sample B ² , 26	10	16	0	0	10	16	0	0	10	16	0	0
sample C ³ , 14	10	4	0	0	12	1	1	0	8	5	1	0
sample D ⁴ , 12	6	6	0	0	10	2	0	0	10	2	0	0
total 84	34	50	0	0	54	28	2	0	44	38	1	1

¹White shrimp²Intestine of black sea bream³Intestine of brackish water cultured tilapia⁴Intestine of orange spotted grouper**Fig. 1** The antagonistic activities of the strain D5 against *Vibrio parahaemolyticus* (A, 3 mm) and *Vibrio harveyi* (B, 5 mm).

圈為 0.5 mm 以下者有 34 株，0.5 ~ 2.9 mm 者有 50 株；對腸炎弧菌的抑菌圈為 0.5 mm 以下者有 54 株，0.5 ~ 2.9 mm 者有 28 株，3.0 ~ 4.9 mm 者有 2 株；對哈維氏弧菌的抑菌圈為 0.5 mm 以下者有 44 株，0.5 ~ 2.9 mm 者有 38 株，3.0 ~ 4.9 mm 者有 1 株，5 ~ 6 mm 者有 1 株 (Table 2)。

所分離出之菌株對上述 3 種常見水產病原弧菌的抑菌圈差異大，其中以來自白蝦樣品所分離出的 D5 菌株抑菌力最佳，對腸炎弧菌及哈維氏弧菌抑菌圈分別為 3 及 5 mm (Fig. 1)，對溶藻弧菌抑菌圈則為 1 mm。

二、菌株的篩選與鑑定

針對自白蝦分離出的 D5 菌株進行其菌落觀察、生化特性測試及菌種鑑定。D5 菌株在 TSA 上菌落呈現光滑之乳黃白色，直徑約 1.5 mm，外圍呈不規則的鋸齒狀，中間有放射狀紋路 (Fig. 2A)。革蘭氏染色發現，該細菌為革蘭氏陽性桿菌，具有催化酶及氧化酶之酵素活性，無法在 MacConkey's agar 生長，經過 65 °C /30 min 處理仍能活存，會形成孢子 (Fig. 2B)，產生蛋白質水解酶，不具有硝酸還原能力，利用葡萄糖產酸

Table 3 Characterization of isolated D5 strain and comparison to *Bacillus pumilus* BCRC 11706

item	D5	<i>Bacillus pumilus</i> BCRC 11706
Gram stain	+	+
morphology	Rod	Rod
catalase reaction	+	+
oxidase	+	+
survive at 65 °C /30 min	+	+
spore formation	+	+
MacConkey's agar	-	-
methyl-red test	-	-
Voges-Proskauer test	-	-
indole test	-	-
growth at 50 °C	+	+
growth in 10% NaCl	+	+
hydrolysis of starch	-	+
hydrolysis of protein	+	+
hydrolysis of lipid	-	+
citrate utilization	+	+
nitrate reduction	-	-
substrate utilization		
D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
D-Mannitol	+	+
galactose	+	+
fructose	+	+
mannose	+	+
adonitol	-	-
sorbitol	-	-
inositol	-	-
16S rRNA sequence analysis	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

“+” means positive reaction; “-” means negative reaction

等。D5 菌株依其相關生化特性及部分 16S rRNA 基因分析鑑定為 *Bacillus pumilus* (Table 3)。系統發生樹狀圖也顯示，D5 菌株與 *B. pumilus* 最為接近 (Fig. 3)，故將 D5 菌株命名為 *B. pumilus* D5。

三、對不同水產病原弧菌、大腸桿菌及沙門氏菌之抗菌試驗

B. pumilus D5 菌株對 7 種水產病原弧菌之抑菌情形顯示，該菌株對溶藻弧菌、鰻弧菌、霍亂弧

菌、哈維氏弧菌、腸炎弧菌、溶蛋白弧菌及創傷弧菌之抑菌圈分別為 1.0、3.0、4.0、5.0、3.0、0 及 3.0 mm (Table 4)，其中對哈維氏弧菌的抑菌效果最佳 (5.0 mm)，其次為霍亂弧菌 (4.0 mm)，再次為鰻弧菌、腸炎弧菌及創傷弧菌 (3.0 mm)；對溶蛋白弧菌則無抑制現象 (0 mm)。

本研究自白蝦分離出的 *B. pumilus* D5 菌株對大腸桿菌之抑菌情形顯示，該菌株對 *E. coli* BCRC 11549 和 *E. coli* BCRC 11634 之抑菌圈均為 3.0 mm (Table 4)，顯示 *B. pumilus* D5 對兩株大腸桿菌均有抑制效果。此外，*B. pumilus* D5 菌株對鼠

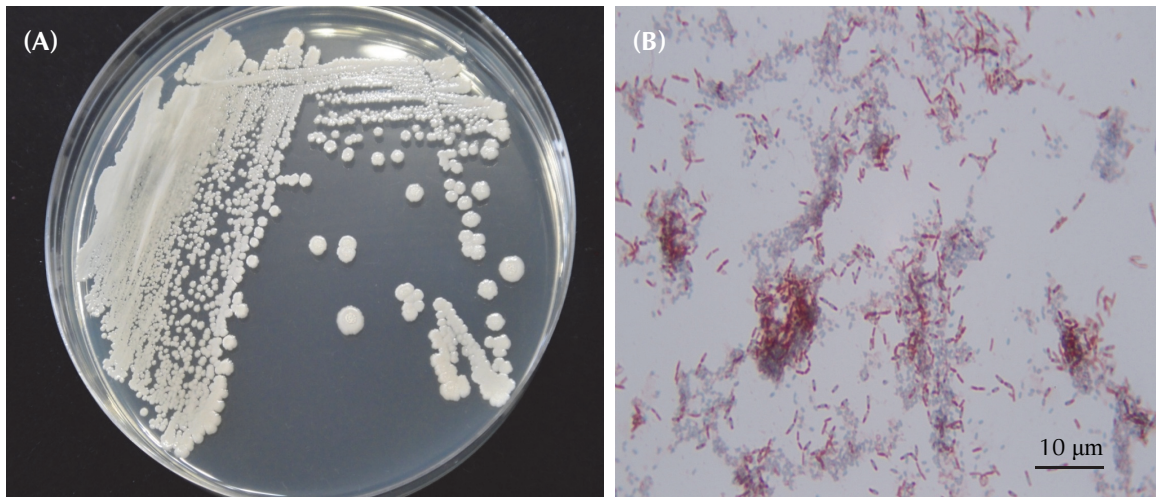


Fig. 2 Colonies plated out from strain D5 and incubated for 48 h at 28°C on tryptic soy agar (A). Endospore staining of isolated D5 strain (B).

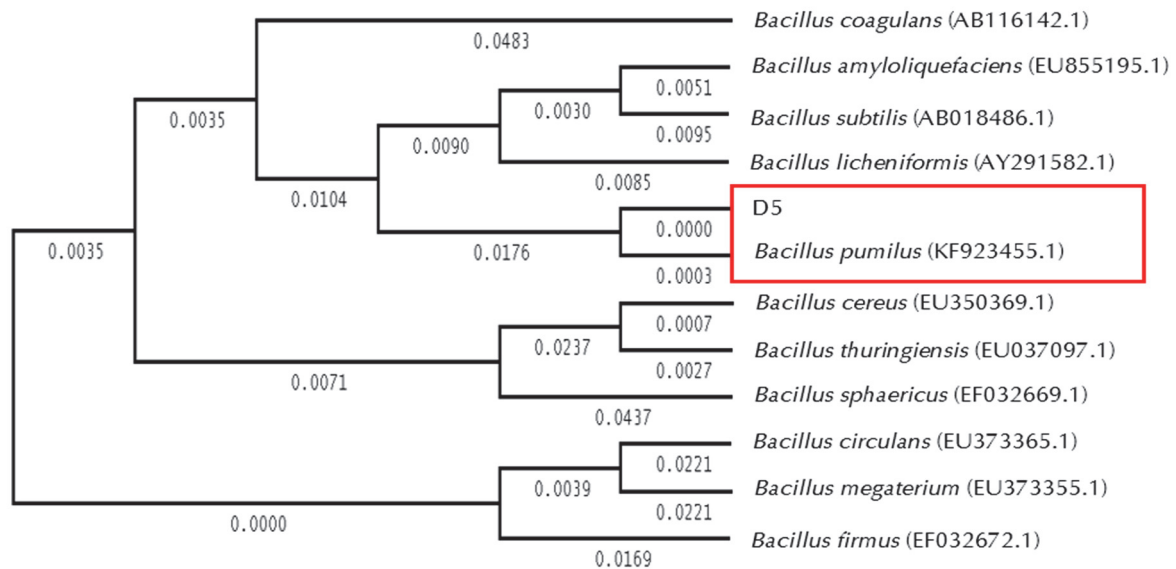


Fig. 3 Phylogenetic tree showing the 16S rRNA relationships of the strain D5 with other relevant species. The rectangular cladogram presents the results of the neighbor-joining method. The sequences were obtained from the GenBank databases, and their nucleotide sequence accession numbers are shown in parentheses. The isolate and the closest species are shown in the red box. The nearly full-length 16S rRNA gene sequence was amplified by polymerase chain reaction using the universal 16S primers. Sequence analysis was performed using the BLAST program. Phylogenetic analysis was performed by the neighbor-joining method using Accelrys Gene v2.5.

傷寒沙門氏菌之抑菌圈為 2.0 mm (Table 4)，顯示其對鼠傷寒沙門氏菌亦具抑菌能力。

四、對不同抗生素之耐受性試驗

分析 *B. pumilus* D5 菌株耐受 10 種水產常用抗生素之結果顯示，ampicillin、amoxycillin、

doxycycline、erythromycin、florfenicol、flumequine、lincomycin、oxytetracycline、oxolinic acid 及 spiramycin 所產生之抑菌圈分別為 1.2、0.8、1.3、0.7、1.9、1.9、0、1.1、1.1 及 0.7 cm (Table 5)，其中受 florfenicol 及 flumequine 的抑菌影響最強（抑菌圈均為 1.9 cm），其次為 doxycycline (抑菌圈為 1.3 cm) 及 ampicillin (抑

菌圈為 1.2 cm)，再次為 oxytetracycline 及 oxolinic acid (抑菌圈均為 1.1 cm)。 *B. pumilus* D5 菌株受 erythromycin 及 spiramycin 抑菌影響則較弱 (抑菌圈為 0.7 cm)。而 *B. pumilus* D5 菌株不受 lincomycin 影響，抑菌圈為 0 cm (Fig. 4)。

Table 4 The antagonistic spectra of isolated *Bacillus pumilus* D5

indicator strains	inhibitory zone diameter (mm)
<i>Vibrio</i>	
<i>V. alginolyticus</i>	1.0
<i>V. anguillarum</i>	3.0
<i>V. cholerae</i>	4.0
<i>V. harveyi</i>	5.0
<i>V. parahaemolyticus</i>	3.0
<i>V. proteolyticus</i>	0
<i>V. vulnificus</i>	3.0
<i>Escherichia</i>	
<i>E. coli</i> BCRC 11549	3.0
<i>E. coli</i> BCRC 11634	3.0
<i>Salmonella</i>	
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	2.0

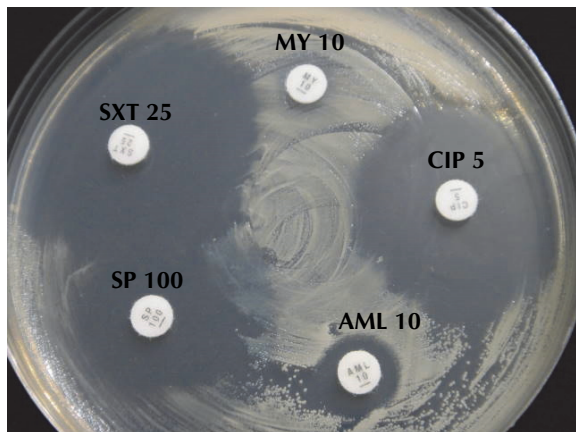


Fig. 4 Antibiotic susceptibility of *Bacillus pumilus* D5 against five tested antibiotics, namely, amoxicillin (AML 10 µg), ciprofloxacin (CIP 5 µg), lincomycin (MY 10), sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT 25 µg), and spiramycin (SP 100 µg).

另外，*B. pumilus* D5 菌株在 ciprofloxacin、pencillin G、sulphamethoxazole/trimethoprim、tetracycline 及 vancomycin 所產生之抑菌圈分別

為 1.1、0.1、1.5、0.8 及 0.6 cm (Table 5)，其中受 sulphamethoxazole/trimethoprim 的抑菌影響最強 (1.5 cm)，其次為 ciprofloxacin (抑菌圈為 1.1 cm)、tetracycline (抑菌圈為 0.8 cm) 及 vancomycin (抑菌圈為 0.6 cm)；再次為 pencillin G (抑菌圈 0.1 cm)。

由以上資料可知，*B. pumilus* 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。

Table 5 Antibiotic susceptibilities of isolated *Bacillus pumilus* D5

antibiotic	diameter of inhibitory zone (cm)
common use	
ampicillin	25 µg 1.2
amoxicillin	25 µg 0.8
doxycycline	30 µg 1.3
erythromycin	15 µg 0.7
lorfenicol	30 µg 1.9
elumeguine	30 µg 1.9
lincomycin	10 µg 0
oxytetracycline	30 µg 1.1
oxolinic acid	20 µg 1.1
spiramycin	100 µg 0.7
others	
ciprofloxacin	5 µg 1.1
pencillin G	10 unit 0.1
sulphamethoxazole/trimethoprim	25 µg 1.5
tetracycline	30 µg 0.8
vancomycin	30 µg 0.6

討 論

病原弧菌所引起的弧菌疾病長久以來都是水產養殖產業的重大威脅之一，研發強力抗水產病原弧菌之拮抗菌的益生菌製劑，可以降低抗生素的使用，減少抗藥性的菌株出現，是友善水產養殖環境的方式。本研究由白蝦、黑鯛、海水吳郭魚與點帶石斑魚腸道共純化出 84 個菌株，所分離出之菌株對溶藻弧菌、腸炎弧菌及哈維氏弧

菌等 3 種常見水產病原弧菌的抑菌圈差異大，其中來自白蝦樣品所分離出的 D5 菌株抑菌力最佳，D5 菌株經傳統方法及 16S rRNA 基因序列測定鑑定為 *B. pumilus*，並命名為 *B. pumilus* D5。目前收集到的文獻顯示，*B. pumilus* 的來源包括海洋環境、陸上土壤、多種海洋或養殖生物及市售益生菌商品等。在太平洋、印度洋、大西洋、北極地區、美國羅德島海域、印度海域、馬來西亞海域、中國東海及黃海域之海水均曾分離到 *B. pumilus* (Banerjee *et al.*, 2007; Parvathi *et al.*, 2009; Karim *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013)。除了海水之外，海洋底泥也曾分離出 *B. pumilus* (Nair *et al.*, 2012; Devaraja *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015)。

Manjusha *et al.* (2014) 在海綿分離到 *B. pumilus*；Leyton and Riquelme (2010) 在海洋腹足類 *Concholepas concholepas* 的卵莢膜中亦曾分離到 *B. pumilus*。Hill *et al.* (2009) 在草蝦的腸道中分離出 *B. pumilus*；Sun *et al.* (2009)、Vinoj *et al.* (2013) 及 Wu *et al.* (2014) 也分別在生長快速的點帶石斑、印度對蝦 (*Fenneropenaeus indicus*) 及泥蟹 (*Scylla paramamosain*) 的腸道中分離到 *B. pumilus*。

此外，Aslim *et al.* (2002) 在土壤中分離出 *B. pumilus*。Mohammadou *et al.* (2014) 自發酵食品中分離到 *B. pumilus*。Aunpad and Na-Bangchang (2007) 指出，*B. pumilus* 曾做為人類益生菌使用。Noor Uddin *et al.* (2015) 在市售蝦用益生菌產品中分離出 *B. pumilus*。

以 *Bacillus* spp. 做為益生菌有許多優點，*Bacillus* spp. 為孢子形成菌，由於孢子較細菌的營養細胞更耐乾旱及其他不良環境，在運送及儲存過程的耐力較一般益生菌強 (Hong *et al.*, 2005)；因此，乾燥飼料之製做時，使用細菌的孢子比營養細胞更容易維持飼料的理想菌數 (Gatesoupe, 1999)。又，*Bacillus* spp. 不是水產病原菌 (Gullian *et al.*, 2004)，且通常不會接受和表現來自弧菌或相關革蘭氏陰性菌與抵抗抗生素或毒素相關的基因 (Moriarty, 1999)。

本研究自白蝦分離出的 *B. pumilus* D5 具有抑制溶藻弧菌、鰻弧菌、霍亂弧菌、哈維氏弧菌、腸炎弧菌及創傷弧菌等 6 種水產病原弧菌的能力。Vinoj *et al.* (2013)、Wu *et al.* (2014) 及 Leyton and Riquelme (2010) 分別自印度對蝦、泥蟹的腸

道中及海洋腹足類 *C. concholepas* 的卵莢膜中分離出的 *B. pumilus*，均具有抑制腸炎弧菌的特性。Karim *et al.* (2013) 指出，自美國羅德島 (Rhode Island) 海域中分離出的 *B. pumilus* 會抑制哈維氏弧菌，但不會抑制牡蠣的病原菌-塔氏弧菌。Banerjee *et al.* (2007) 報導，分離自馬來西亞海域的 *B. pumilus*，具有抑制溶藻弧菌及腸炎弧菌的特性，Banerjee *et al.* (2007) 認為，*B. pumilus* 是以競爭排除的方式抑制溶藻弧菌及腸炎弧菌，而且其抑制的效果與所測試的 3 種抗生素的相近。Hill *et al.* (2009) 自草蝦的腸道及 Sun *et al.* (2009) 自點帶石斑中分離出的 *B. pumilus*，均具有抑制溶藻弧菌及哈維氏弧菌的特性。Liu *et al.* (2015) 指出，自白蝦分離出之 *B. pumilus* 具有抑制腸炎弧菌及創傷弧菌的能力，但不會抑制哈維氏弧菌。Devaraja *et al.* (2013) 報導，分離自馬來西亞西海岸的海洋底泥之 *B. pumilus* 具有抑制溶藻弧菌、哈維氏弧菌及腸炎弧菌的能力。Nair *et al.* (2012) 指出，分離自印度東南海域之海洋底泥的 *B. pumilus* 具有抑制溶藻弧菌、鰻弧菌、腸炎弧菌、哈維氏弧菌及創傷弧菌的能力。Nithya and Pandian (2010) 報導，*B. pumilus* 具有抑制溶藻弧菌、腸炎弧菌及創傷弧菌形成生物膜的能力。本研究自白蝦分離出的 *B. pumilus* D5 具有抑制溶藻弧菌、鰻弧菌、霍亂弧菌、哈維氏弧菌、腸炎弧菌及創傷弧菌等 6 種水產病原弧菌的能力，而前述文獻報導的 *B. pumilus* 能抑制 1~5 種水產病原弧菌，因此 *B. pumilus* D5 比目前被報導的 *B. pumilus* 能抑制較多種水產病原弧菌。

除了探討 *B. pumilus* D5 抑制多種水產病原弧菌的效果外，本研究發現 *B. pumilus* D5 也具有抑制大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌的能力。目前收集的文獻顯示，不同來源的 *B. pumilus* 對於大腸桿菌鼠及傷寒沙門氏菌抑菌效果不一，Mohammadou *et al.* (2014) 指出，來自發酵食品中的 *B. pumilus* 可以抑制大腸桿菌，但無法抑制鼠傷寒沙門氏菌。Manjusha *et al.* (2014) 由海綿中分離出的 *B. pumilus* 可以抑制鼠傷寒沙門氏菌。Aslim *et al.* (2002) 自土壤中分離出 *B. pumilus* 無法抑制大腸桿菌。又，Aunpad and Na-Bangchang (2007) 研究指出，自泰國水樣中分離出來的 *B. pumilus* 無法抑制大腸桿菌及傷寒沙門氏菌。本研究所分

離的 *B. pumilus* D5 具有抑制大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌之特性，在將來應用作為拮抗菌上優於文獻上其他的 *B. pumilus*。

具抗菌活性之拮抗菌抑制病原菌之方式主要包括：產生抗菌肽、產生揮發物質、產生溶菌酶、產生蛋白酶、改變 pH 值及競爭營養物質或空間 (Leyton and Riquelme, 2010; Nair *et al.*, 2012)。Aslim *et al.* (2002) 指出，許多 *Bacillus* spp. 會產生抗菌肽，抑制病原菌。Nair *et al.* (2012) 報導，*B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis* 及 *B. pumilus* 是最常被用來作為生物控制的益生菌，會產生二級代謝物，具有拮抗病原菌的特性。Aunpad and Na-Bangchang (2007) 研究指出，*Bacillus pumilus* 所產生之抗菌肽為 pumilian，pumilian 係分泌到胞外的抗菌物質，存在於去除菌體的培養液中；pumilian 為熱穩定型抗菌肽，經過 121 °C、15 min 處理後仍具有 100% 活性；於 pH 6~9 的環境下，保有 90% 的活性，分子量為 1.99 kDa。針對 15 種革蘭氏陽性菌進行 pumilian 對於不同菌種之拮抗情形測試，結果顯示對於其中的 12 種細菌具有抵抗力，但對於所測試的 9 種革蘭氏陰性菌則均無抵抗力。

本研究曾將所分離出 *B. pumilus* D5 的培養液經過高速離心 (10,000 × g, 20 min, 4°C) 及 0.22 μm 濾膜過濾處理以去除菌體，發現過濾液並無抑制水產病原弧菌的作用，因此推測 *B. pumilus* D5 產生的抗菌物質可能是在菌體上，或者是 *B. pumilus* D5 與水產病原弧菌競爭營養物質或空間，而達到抑制水產病原弧菌的效果，有關 *B. pumilus* D5 抑制水產病原弧菌的機制為何？有待進一步探討。

探討 *B. pumilus* 對於抗生素的抵抗力方面，Wu *et al.* (2014) 自海洋泥蟹分離出 *B. pumilus*，並以 20 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌對 9 種抗生素有抵抗力，對 11 種有敏感性。Nair *et al.* (2012) 自印度地區河口的底泥分出的 *B. pumilus* 以 10 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌只對 1 種抗生素具有抵抗力，對其餘 9 種均為敏感性。Parvathi *et al.* (2009) 自印度附近海水分出的 *B. pumilus* 以 10 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌只對 1 種抗生素具有抵抗力，對其餘 9 種均有敏感性。Aslim *et al.* (2002) 自土壤中分出的 *B. pumilus* 以 8 種抗生素試驗其感受性，結

果顯示，該菌對 4 種抗生素具有抵抗力，對其餘 4 種則為敏感性。Mohammadou *et al.* (2014) 自發酵食品分出的 *B. pumilus* 以 8 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌只有對 2 種有抵抗力，對其餘 6 種均為敏感性。

為了避免抵抗抗生素的基因經由質體或基因成份轉移到其他細菌，導致抗藥性菌株出現，因此，近幾年來，建議使用的益生菌應以不具抗生素抗性的菌種為宜 (Saarela *et al.*, 2000; EFSA, 2012)。本研究自白蝦中分離出的 *B. pumilus* 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，該菌對於不同抗生素敏感的種類之比例 (14/15) 高於前述文獻所報導的 *B. pumilus* (4/8-9/10)，比較符合建議使用的益生菌應該以不具抗生素抗性的菌種為宜之規範 (Saarela *et al.*, 2000; EFSA, 2012)。

基於目前收集之文獻中報導的 *B. pumilus* 對於水產病原弧菌、大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌的抑制狀況，及對於不同抗生素敏感的情形，本研究的 *B. pumilus* D5 具有抑制多種水產病原弧菌、大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌的效果，對於不同抗生素敏感的種類之比例較高，因此推測 *B. pumilus* D5 為新菌株。

此外，有關前人將 *B. pumilus* 做為水產用益生菌，添加於飼料及養殖池水中之效益摘錄如下：Wu *et al.* (2014) 將分離自海洋泥蟹的 *B. pumilus* 添加於泥蟹飼料中 (10⁵ CFU/g) 投餵 30 天後，再浸泡病原菌-腸炎弧菌 (10⁵ CFU/mL) 48 hr 後，試驗組泥蟹之免疫相關基因 CAT (Catalase, 過氧化氫酶)、proPO (Prophenoloxidase, 原酚氧化酶) 及 SOD (Superoxide dismutase, 超氧化歧化酶) 等的基因表現量均有提升的現象，呼吸爆 (respiratory burst) 的活性亦有上升，而試驗組泥蟹的存活率 (77%) 較對照組 (55%) 提高 22%。

Karim *et al.* (2013) 將分離自海水之 *B. pumilus* 添加於牡蠣養殖池水中 (10⁴ CFU/mL) 24 hr 後，再以病原菌-塔氏弧菌攻擊後，試驗組牡蠣之活存率 (45%) 較試驗組 (30%) 提高 15%。雖然體外試驗顯示，*B. pumilus* 並無抵抗塔氏弧菌之能力，但該菌卻能增強牡蠣抵抗塔氏弧菌，提升牡蠣活存率，Karim *et al.* (2013) 認為，可能是 *B. pumilus* 刺激牡蠣強化免疫功能。

Banerjee *et al.* (2010) 在草蝦池中加入 10^6 CFU/mL *B. pumilus* 菌量，第 3 天時，對照組及試驗組水中弧菌量分別為 2×10^2 CFU/mL 及 2×10^1 CFU/mL，第 18 天時，對照組及試驗組水中弧菌量分別為 10^3 CFU/mL 及 $< 10^1$ CFU/mL。對照組及試驗組的草蝦活存率分別為 28% 及 32%，對照組及試驗組的比成長率 (specific growth rate) 分別為 8% 及 10%，試驗組的草蝦活存率及比成長率均高於對照組 ($p < 0.05$)。Devaraja *et al.* (2013) 同樣在草蝦苗池中加入 10^6 CFU/mL *B. pumilus*，第 18 天時，對照組及試驗組的草蝦活存率分別為 26% 及 32%，比成長率分別為 9% 及 11%，試驗組的草蝦活存率及比成長率均高於對照組 ($p < 0.05$)。

Sun *et al.* (2010) 餵食石斑含有 *B. pumilus* (10^8 CFU/g) 的飼料 60 天後，對照組及試驗組石斑魚的飼料轉換率 (feed conversion rate) 分別為 1.03 及 0.98，試驗組石斑魚的飼料轉換率較對照組佳 ($p < 0.05$)。又，試驗組血清中溶菌酶活性較對照組高 34.7% ($p < 0.05$)。

上述目前收集之文獻中報導，*B. pumilus* 對於水產生物有提高成長、降低弧菌量、增強免疫力及提升病菌攻擊後的活存率等之成效，本研究的 *B. pumilus* D5 具有抑制多種水產病原弧菌、大腸桿菌及鼠傷寒沙門氏菌的效果，值得進一步探討實際應用於動物試驗之效益。

結 論

本研究自白蝦所分離出之 D5 菌株，依其相關生理、生化特性及部分 16S rRNA 基因分析鑑定為 *B. pumilus*，並命名為 *B. pumilus* D5。*B. pumilus* D5 可以抑制溶藻弧菌、腸炎弧菌、哈維氏弧菌、鰻弧菌、霍亂弧菌及創傷弧菌等 6 種常見的水產病原弧菌，對於所測試的 15 種抗生素中，只有對 lincomycin 具有抵抗能力，對其他 14 種抗生素均為敏感性。以上結果顯示，*B. pumilus* D5 菌株具有做為抗水產病原弧菌能力的益生菌之發展潛力。

參考文獻

- Aslim, B., N. Saglam and Y. Beyatli (2002) Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk. J. Biol.*, 26: 41-48.
- Aunpad, R. and K. Na-Bangchang (2007) Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr. Microbiol.*, 55: 308-313.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell and J. L. Múzquiz (2006) The role of probiotic in aquaculture. *Vet. Microbiol. Rev.*, 114: 173-186.
- Banerjee, S., T. N. Devaraja, M. Shariff and F. M. Yusoff (2007) Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, 30: 383-389.
- Banerjee, S., H. Khatoon, M. Shariff and F. M. Yusoff (2010) Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fish. Sci.*, 76: 481-487.
- Bauer A. W., W. 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., New York, USA. pp. 90, 104-109, 129-159.
- Devaraja, T., S. Banerjee., F. Yusoff, Y. M. Shariff and H. Khatoon (2013) A holistic approach for selection of *Bacillus* spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. *Turk. J. Biol.*, 37: 92-100.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Scientific opinion on guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.*, 10: 2740.
- Elston, R. A., H. Hasegawa, K. L. Humphrey, I. K. Polyak and C. C. Häse (2008) Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: Severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis. Aquat. Organ.*, 82: 119-134.
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) (2013) Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis

- Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25-27 June 2013. FAO Fish. Aquacul. Rep., No. 1053, 54.
- Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Gullian, M., F. Thompson and J. Rodriguez (2004) Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233: 1-14.
- Hill, J. E., J. C. F. Baiano and A. C. Barnes (2009) Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J. Fish Dis.*, 32: 1007-1016.
- Hong, H. A., L. H. Duc and S. M. Cutting (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 813-835.
- Hoseinifar, S. H., A. Mirvaghefi, B. Mojazi Amiri, H. K. Rostami and D. L. Merrifield (2011) The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquacult. Nutr.*, 17: 498-504.
- Johnson, T. R. and L. C. Case (2004) *Laboratory Experiments in Microbiology* (7th ed.). Pearson Education, Inc., San Francisco, CA, USA. pp. 35-37, 103-105.
- Karim, M., W. Zhao, D. Rowley, D. Nelson and M. Gomez-Chiarri (2013) Probiotic strains for shellfish aquaculture: Protection of Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) larvae and juveniles against bacterial challenge. *J. Shellfish Res.*, 32: 401-408.
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi and I. Karunasagar (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- Leaño, E. M. and C. V. Mohan (2012) Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Glob. Aquacult. Advocate*, Jul./Aug., 38-39.
- Leyton, Y. and C. Riquelme (2010) Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (common name "loco") have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Ecol.*, 60: 599-605.
- Li, N., J. Bai, S. Wu, X. Fu, H. Lao, X. Ye and C. Shi (2008) An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 829-833.
- Lightner, D. V., R. M. Redman, C. R. Pantoja, B. I. Noble and L. Tran (2012) Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquacul. Advocate*, Jan./Febr., 40.
- Liu, X. F., Y. Li, J. R. Li, L. Y. Cai, X. X. Li, J. R. Chen and S. X. Lyu (2015) Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 795-803.
- Liu, Y., Q. Lai, C. Dong, F. Sun, L. Wang, G. Li and Z. Shao (2013) Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE*, 8 (11) : e80097. doi:10.1371/journal.pone.0080097.
- Manjusha, W. A., J. A. Johnson, T. Citarsu and J. J. Rejin Prasad (2014) Isolation and identification of *Bacillus pumilus* LD-B1 with antimicrobial and anti-cancer activities from the marine sponge *Axinella* sp. collected from Kanyakumari coast. *J. Biotechnol. Biosaf.*, 2: 141-149.
- Mohammadou, B. A., G. L. Blay, C. M. Mbofung and G. Barbier (2014) Antimicrobial activities, toxinogenic potential and sensitivity to antibiotics of *Bacillus* strains isolated from Mbujia, an *Hibiscus sabdariffa* fermented seeds from Cameroon. *Afr. J. Biotechnol.*, 13: 3617-3627.
- Moriarty, D. J. W. (1999) Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology – Microbial Biosystems: New Frontiers*. (C. R. Bell, M. Brylinsky and P. Johnson-Gren eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 351-358.
- Nair, A. V., K. K. Vijayan, K. Chakraborty and M. Leo Antony (2012) Diversity and characterization of antagonistic bacteria from tropical estuarine habitats of Cochin, India for fish health management. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 2581-2592.
- Nayak, S. K. (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2-14.
- Nguyen, V. D., T. T. Pham, T. H. T. Nguyen, T. T. X. Nguyen and L. Hoj (2014) Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 40: 49-60.
- Nithya, C. and S. K. Pandian (2010) The in vitro antibiofilm activity of selected marine bacterial culture supernatants against *Vibrio* spp. *Arch. Microbiol.*, 192: 843-854.
- Noor Uddin, G. M., M. H. Larsen, H. Christensen, F. M.

- Aarestrup, T. M. Phu and A. Dalsgaard (2015) Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. PLoS ONE, 10 (7): e0132338. doi: 10.1371/journal.pone.0132338.
- Parvathi, A., K. Krishna, J. Jose, N. Joseph and S. Nair (2009) Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. Braz. J. Microbiol., 40: 269-275.
- Pearson, W. R., and D. I. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448.
- Ruangpan, L. and T. Kitao (1991) *Vibrio* bacteria isolated from the black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. J. Fish Dis., 14: 383-388.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto and T. Mattila-Sandholm (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. J. Biotechnol., 84: 197-215.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg and T. R. Walsh (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. J. Antimicrob. Ag., 17: 431-437.
- Sorroza, L., D. Padilla, F. Acosta, L. Roman, V. Grasso, J. Vega and F. Real (2012) Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. Vet. Microbiol., 155: 369-373.
- Sun, Y. Z., H. L. Yang, Z. C. Ling, J. B. Chang and J. D. Ye (2009) Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. Afr. J. Microbiol. Res., 3: 713-20.
- Sun, Y. Z., H. L. Yang, R. L. Ma and W. Y. Lin (2010) Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol., 29: 803-809.
- Tagg, J. R. and A. R. McGiven (1971) Assay system for bacteriocin. Appl. Microbiol., 21: 943.
- Tran, L., L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohny, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons and D. V. Lightner (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org., 105: 45-55.
- Tubiash, H. S., P. E. Chanley and E. Leifson (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks: I. Etiology and epizootiology. J. Bacteriol., 90: 1036-1044.
- Tucker, J.W. Jr and S. Kennedy (2001) Snook culture. Aquaculture 2001, Book of Abstract. p. 651. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Vinoj, G., B. Vaseeharan, B. D. Jayaseelan, P. Rajakumaran and C. Ravi (2013) Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* (DAB1) and *Pseudomonas aeruginosa* (DAP1) against *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Fenneropenaeus indicus*. Aquacult. Int., 21: 1211-1135.
- Wang, Y. B., Z. Q. Tian, J. T. Yao and W. F. Li (2008) Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture, 277: 203-207.
- 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.
- Witte, W. (2000) Selective pressure by antibiotic use in livestock. Int. J. Antimicrob. Ag., 16: S19-S24.
- Wu, H. J., L. B. Sun, C. B. Li, Z. Z. Li, Z. Zhang, X. B. Wen, Z. Hu, Y. L. Zhang and S. K. Li (2014) Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus* strains in mud crab (*Scylla paramamosain*). Fish Shellfish Immunol., 41: 156-162.
- Yii, K. C., T. I. Yang and K. K. Lee (1997) Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. Curr. Microbiol., 35: 109-115.

Screening Bacteria Antagonistic toward Aquatic Pathogenic *Vibrio* spp. from Marine Fishes and Shrimp

Huei-Jen Ju¹, Mei-Ying Huang^{1*}, Hsu-Chan Liu¹, Liang-Wei Tseng¹,
Chorng-Liang Pan² and Chin-I Chang¹

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

There is an urgent need to develop microbial control strategies to control vibriosis outbreaks in aquaculture industries. The present work was devoted to screening for aquatic pathogenic *Vibrio* spp. antagonistic bacteria in marine fishes and shrimp. The sensitivities of the probiotic to various antibiotics were tested as well. In the present study, a total of 84 isolates were isolated from four samples. All the isolates were tested against pathogenic *Vibrio* spp., including *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. harveyi*. Among the 84 isolates, the strain D5, isolated from white shrimp, showed high antagonistic abilities toward pathogenic *Vibrio* spp. The strain D5 was identified as *Bacillus pumilus* by Gram stain and 16S rRNA sequences, as well as by its physiological and biochemical characteristics, and was thus named *Bacillus pumilus* D5. The *B. pumilus* D5 exhibited antagonism against *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*. Moreover, *Escherichia (E.) coli* and *Salmonella typhimurium* were also inhibited by the *B. pumilus* D5. To test the sensitivity of the *B. pumilus* D5, 15 different antibiotics were used. The *B. pumilus* D5 exhibited at least some sensitivity to 14 different antibiotics tested in this study, while it was resistant to lincomycin. In conclusion, the *B. pumilus* D5 exhibited antagonism against *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*, as well as sensitivity to most of the antibiotics tested in this study. The present study results reveal that the *B. pumilus* D5 has potential applications for controlling pathogenic *Vibrio* spp. in aquaculture practices.

Key words: against pathogenic *Vibrio* spp., antagonistic bacteria, *Bacillus pumilus*, antibiotic resistance

*Correspondence: Division of Aquaculture, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung, Taiwan 202. TEL: (02) 2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: myhuang@mail.tfri.gov.tw