

飼料添加乳酸菌粉對於點帶石斑魚腸道菌相及成長之影響

吳育甄^{1*} · 林峰右¹ · 胡益順¹ · 黃亮軒² · 許晉榮¹ · 葉信利¹

¹ 行政院農委會水產試驗所海水繁養殖研究中心

² 國立澎湖科技大學

摘 要

乳酸菌是現今常見的益生菌，對於養殖生物具有正面的幫助。本研究以乳酸菌粉添加於點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 飼料，探討對於石斑魚成長、腸道內菌相及水質影響之研究。實驗分四組濃度餵食乳酸菌粉 (0%、0.5%、1.0%、2.0%)，實驗結果顯示魚腸道內乳酸菌隨著添加濃度增加而增加，而弧菌及異營性菌數量則有減少的現象。抑菌試驗結果，乳酸菌濃度為 10^6 CFU/ml 以上有抑制溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的能力。成長試驗結果顯示，以添加 2.0% 組及 1.0% 組的魚隻全長分別 18.81 ± 0.86 cm 及 18.52 ± 0.70 cm 與 0% 組 17.68 ± 0.73 cm 有顯著差異；體重分別為 69.17 ± 7.12 g 及 64.00 ± 8.73 g 與 0% 組 53.04 ± 9.02 g 有顯著差異，添加 2.0% 組及 1.0% 組成長較快。試驗期間的水質變化，四組濃度組間無明顯差異。在養殖過程中，在飼料中添加 1.0% 乳酸菌粉，乳酸菌即可於腸道環境中生存，減少病原菌量，對於魚隻的成長有正面的助益。

關鍵詞：點帶石斑魚、乳酸菌、益生菌

前 言

魚類健康度與腸道內菌群結構有密切相關，腸道有良好的菌群組成，可以幫助維持魚隻良好的營養吸收，並且抵抗或抑制病原菌，利於魚隻的成長 (Keysami *et al.*, 2007)。然而目前養殖環境受到大量使用防治細菌性疾病抗菌藥物的影響，導致細菌菌株產生抗藥性，同時也改變了養殖環境菌相結構，使得環境水體不利於養殖魚隻的成長 (Skjermo and Vadstein, 1999; Jana and Jana, 2003)。當疾病發生時，往往無法完全藉由藥物得到徹底的治療，病疾高爆發率及高死亡率的情形下，嚴重影響到養殖的收益。因此，現階段對於養殖魚蝦疾病處理方式，已漸漸屏除以往傳統藥物治療的消極方式，進而採由積極以益生菌來進行防治 (Irianto, 2002; Farzanfar, 2006)。

一般廣泛使用在養殖上的益生菌，其優點通

常包括：1. 穩定養環境及改善水質 (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Austin, 2002; Farzanfar, 2006)；2. 與病原菌競爭體內黏膜吸附位置，抵抗病原菌 (Olsson *et al.*, 1992)；3. 幫助營養物質的消化吸收，提高魚隻成長及換肉率 (Shiri Harzevili *et al.*, 1998; Planas *et al.*, 2004; Keysami *et al.*, 2007)；4. 透過益生菌激發生物體產生免疫物質 (Nikoskelainen *et al.*, 2003; Villamil *et al.*, 2002, 2003; Gullian *et al.*, 2004)。目前最常施用於養殖的方法有混合在飼料中投餵、直接添加在水體、或吸附在過濾器材上等。

乳酸菌 (Lactic acid bacteria) 是益生菌中很重要的一群，它已廣泛應用於家畜、禽及人類，是最具代表性的腸內益生菌，能夠代謝糖類，並產生 50% 以上乳酸。乳酸菌是革蘭氏陰性菌，兼性厭氧，營養需求較為嚴苛，除需要糖類作為能源之外，還需要各種氨基酸、維生素、礦物質等，以維持其生長。在魚類腸道內同樣也可以發現乳酸群，常見的種類包括有鏈球菌屬 (*Streptococcus*)、明串球菌屬 (*Leuconostoc*)、乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 及肉品桿菌屬 (*Carnobacterium*) 等四類 (Johnson

*通訊作者 / 724 臺南市七股區三股里海埔四號; TEL: (06) 788-0461 ext. 228; FAX: (06) 788-1597; E-mail: ycwu@mail.tfrin.gov.tw

and Case, 1995; Ringø and Gatesoupe, 1998)。

近年來也有許多乳酸菌應用在水產養殖中有正面助益的相關研究，學者將乳酸菌添加應用於大西洋鱈 *Gadus morhua* 養殖的飼料研究中，研究結果發現，飼料中添加乳酸菌，可以達到抵抗病原菌感染，提高魚苗育成率以及促進成長的作用 (Gildberg *et al.*, 1997; Gildberg and Mikkelsen, 1998)。在比目魚 (*Paralichthys olivaceus*) 的養殖試驗中投餵乳酸菌，其結果也證實，能抑制 *Edwardsiella tarda*、*Pasteurella piscicida*、*Aeromonas hydrophila*、*Vibrio anguillarum* 等病原菌生長，且魚隻體重及體長的增加速度也較沒有投餵乳酸菌組快 (Byun *et al.*, 1997)。

臺灣的點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 養殖從一開始於養殖技術的開發，到追求提高魚苗育成率及養成成長率，技術不斷地精進。現階段的問題則因為在高密度養殖及水體環境不佳的情況下，石斑魚養殖經常會面臨到病毒、細菌及寄生蟲等各項疾病的問題 (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995; Yü *et al.*, 1997)。現今在養殖環境及菌相結構改變情況下，在疾病發生時已無法單以藥物的使用來得到有效的治療，養殖產業往往會面臨損失極高的困境。近年來，養殖觀念的改變，以順應自然生態環境養殖型態的再興起，加上有益微生物的研發，藉由益生菌的使用來達到養殖疾病防治的效果，不僅可以減少藥物的使用，相對的也能改善不當用藥物濫用造成的環境汙染及抗藥性細菌的產生 (Jana and Jana, 2003; Cabello, 2006)。

益生菌的施用可以透過餌料投餵以增進養殖生物的成長，或添加施放於水體改善養殖環境 (Ringø and Gatesoupe, 1998; Verschuere *et al.*, 2000)。但是現階段益生菌的產品仍屬高單價，如何以最為節省且又有效的使用方法，來達到防治疾病，以及提高魚隻成長是本次實驗主要的目標。本次試驗主要針對乳酸菌進行試驗，乳酸菌在一般養殖的使用上，以粉狀在使用上最為方便，可以直接使用，而不需要經過發酵為液態，以節省時間及操作過程中不必要的汙染。因此，本試驗採以粉狀的市售乳酸菌粉，經由混合於飼料中進行投餵，藉以了解粉狀乳酸菌應用於石斑魚養殖，對於腸內菌相以及成長的影響。

材料與方法

本研究以乳酸菌粉分四種濃度 (0%、0.5%、1.0%、2.0%) 添加於石斑魚飼料中，進行點帶石斑魚成長試驗，探討經投餵 28 天後對於點帶石斑魚體長增加、增重、腸道內菌相及水質之影響。另外還進行乳酸菌對於溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 病原菌抑制能力之研究，探討乳酸菌抑制溶藻弧菌的濃度，以瞭解添加乳酸菌對於石斑魚抵抗病原菌的助益。

一、石斑魚來源

試驗魚種為點帶石斑魚，自臺南石斑魚吋苗養殖場購買 200 尾後，蓄養於 15 ton 之室內水泥池內，經 7 天馴化，每日石斑魚投餵魚體重 2% 人工配合飼料。試驗魚隻體長範圍為 16.03 ± 1.38 cm，體重 20.03 ± 2.63 g (Mean \pm SE)。

二、點帶石斑魚飼料添加乳酸菌粉試驗

每組 10 隻點帶石斑魚，放於箱網 (60 \times 90 \times 60 cm) 中，每組各三重覆，置於 15 ton 水泥池，每日於早上 9 時餵食魚混合乳酸菌粉人工配合浮性粒狀飼料。依投餵乳酸菌粉量的不同，分為不添加乳酸菌粉 (0%) 以及各添加 0.5%、1.0%、2.0% 乳酸菌粉等 4 組進行試驗。每試驗組依照投餵飼料重量之 0%、0.5%、1.0% 及 2.0% 添加乳酸菌粉，均勻與人工配合浮性粒狀飼料混合，餵食石斑魚時少量投餵預先混合配製之飼料，每次投餵時石斑魚皆完全攝食，無殘餌。每日測量水溫、pH 值、亞硝酸氮及氨氮，在實驗第 14 天及 28 天時，記錄試驗魚隻之體長及體重，試驗期間無換水。

三、菌的種類與來源

取自市售乳酸菌粉狀產品 (廠牌：樂可多-100)。以 Lactobacilli MRS agar (De Man *et al.*, 1960) (enzymatic digest of animal tissue 10 g、beef extract 10 g、yeast extract 5 g、dextrose 20 g、sodium acetate 5 g、polysorbate 80 g、potassium phosphate

2 g、ammonium citrate 2 g、magnesium sulfate 0.1 g、manganese sulfate 0.05 g、agar 15 g、distilled water 1L, final pH: 6.5 ± 0.2) 在 25 °C 培養。秤取菌粉樣品 (1 g) 加入 9 ml 生理食鹽水混合均勻後，將菌液 10 倍連續稀釋 $10^1 \sim 10^9$ ，每 10 倍釋菌液，塗於 MRS agar，放入厭養培養盒，於 37 °C 培養 24 hr 後計算菌落數，以確立乳酸原菌之濃度。

取自行政院農業委員會水產試驗所分離之溶藻弧菌病原菌，分別挑選病原菌株單一菌落，於 TSB (Difco) 培養液中培養 24 hr，以波長 540 測定吸光值，將菌液 10 倍連續稀釋 $10^1 \sim 10^9$ 後，每 10 倍稀釋菌液分別取 100 μ l 塗於 TSA (Difco) 平板培養基 (3% NaCl)，放入培養箱培養 24 hr 後計算菌落數，以確立病原菌之濃度。

四、乳酸菌抑制病原菌試驗

參考 Kirby-Bauer method 紙錠擴散法 (disk diffusion susceptibility testing)，但作部分修飾 (Bauer *et al.*, 1966)。溶藻弧菌病原菌以波長 540 測定菌濃度為 10^8 CFU/ml，10 倍連續稀釋 $10^4 \sim 10^8$ CFU/ml，各塗抹 100 μ l 菌液於 MHA (beef extract 2 g、acid hydrolysate of casein 17.5 g、starch 1.5 g、agar 17 g、distilled water 1000 ml、final pH 7.3 ± 0.1 , Difco) 平板培養基上，再於 MHA 平板上打直徑 5 mm 的小洞，分別加入 50 μ l 以 10 倍連續稀釋 $10^4 \sim 10^7$ CFU/ml 之乳酸菌液，每個試驗組為三重覆，於 30 °C 培養 24 hr，測量並紀錄乳酸菌抑制病原菌之抑菌圈直徑大小。

五、腸道內菌群培養

參照 Kelly *et al.* (1996) 及藍 (2011) 的方法進行菌群選殖培養。實驗第 14 天及 28 天時，採樣投餵乳酸菌粉 0%、0.5%、1.0% 及 2.0% 之點帶石斑魚，魚隻體表以 75% 酒精擦拭消毒，解剖取出魚隻腸道中段 1 cm，放於 1 ml 滅菌生理食鹽水中，均質攪拌後，以 10 倍連續稀釋液，稀釋倍率為 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 各取 100 μ l 塗佈於 TSA (Difco)、TCBS (Difco)、MRS 固態培養基上，於 30 °C 培養 24 hr。選取菌落數為 1~100 個菌落數的稀釋倍數之培養皿，計數菌落數量，並依菌落型態、大小及

顏色作分類計算，菌落數則以 10 的對數 (log) 表示。於 TSA 培養基適宜異營性菌生長，於 TCBS 培養基適合弧菌生長，於 MRS 培養基適合乳酸菌生長。乳酸菌於石斑魚腸道內道定殖率計算式：(採樣之石斑魚腸道內菌量 / 所餵飼攝入之乳酸菌量) $\times 100\%$ 來分析。

六、水質分析

氨-氮值 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 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；亞硝酸-氮及氨-氮值測定均利用分光光度計測定，亞硝酸-氮 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 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)。

七、統計分析

實驗結果以 3 重複的平均值計算，不同處理組間之分析比較以 one-way ANOVA 分析，不同處理組間差異若達顯著水準 ($P < 0.05$)，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、石斑魚成長

飼料中添加乳酸菌粉的石斑魚體長及體重變化如 Tables 1& 2 所示。實驗起始時，魚體全長 16.03 ± 1.38 cm (Mean \pm SE)，體重 20.03 ± 2.63 g。試驗第 14 天時測量，1.0% 組與 2.0% 組的體長分別為 17.41 ± 0.67 cm 及 17.55 ± 0.56 cm 顯著高於 0% 組 (16.58 ± 0.87 cm)。試驗第 28 天結束時，同樣也只有 1.0% 組 (18.52 ± 0.70 cm) 與 2.0% 組 (18.81 ± 0.86 cm) 的體長顯著高於 0% 組 (17.68 ± 0.73 cm)。相對於 0% 組在 28 天的成長率 11%，1.0%、2.0% 兩組的成長率分別為 16% 與 17%。

Table 1 Total length (cm) of *Epinephelus coioides* fed with powdered lactic acid bacteria added diets for 14 and 28 days

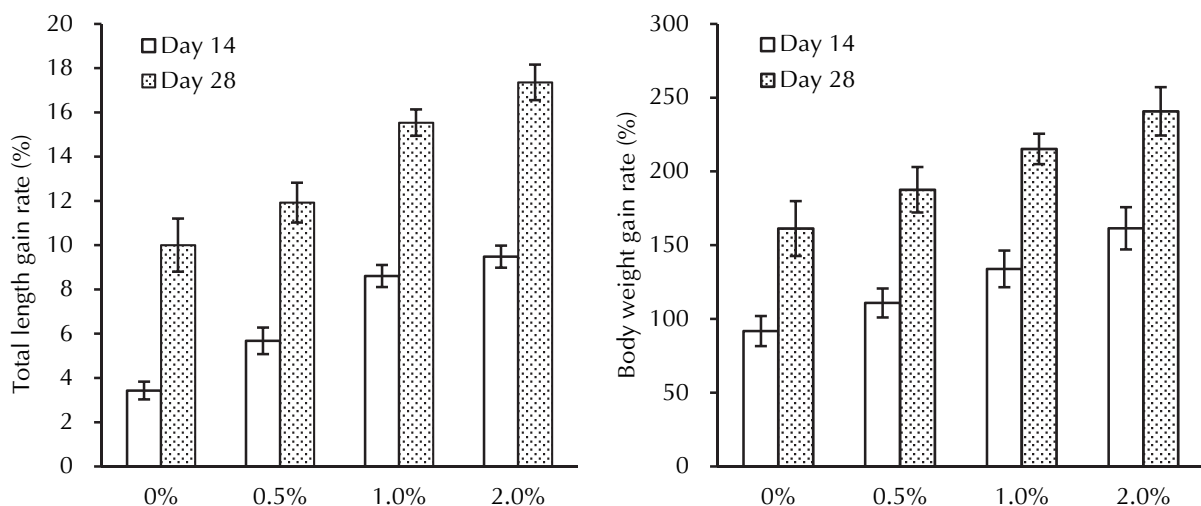
Items	Period		
	Initial	14 days	28 days
0%	16.03 ± 1.38	16.58 ± 0.87 ^a	17.68 ± 0.73 ^a
0.5%	16.03 ± 1.38	16.94 ± 0.60 ^{ab}	17.94 ± 0.80 ^a
1.0%	16.03 ± 1.38	17.41 ± 0.67 ^b	18.52 ± 0.70 ^b
2.0%	16.03 ± 1.38	17.55 ± 0.56 ^b	18.81 ± 0.86 ^b

The values with the different letters (mean ± SE, n=3) in the same row were significant differences ($p \leq 0.05$)

Table 2 Body weight (g) of *Epinephelus coioides* fed with powdered lactic acid bacteria added diets for 14 and 28 days

Items	Period		
	Initial	14 days	28 days
0%	20.03 ± 2.63	38.42 ± 7.71 ^a	53.04 ± 9.02 ^a
0.5%	20.03 ± 2.63	42.23 ± 7.56 ^a	58.38 ± 9.51 ^{ab}
1.0%	20.03 ± 2.63	46.85 ± 5.50 ^{ab}	64.00 ± 8.73 ^{bc}
2.0%	20.03 ± 2.63	52.36 ± 6.34 ^b	69.17 ± 7.12 ^c

The values with the different letters (mean ± SE, n=3) in the same row were significant differences ($p \leq 0.05$)

**Fig. 1** Percentage of increased total length (left) and body weight (right) of *Epinephelus coioides* after 14 and 28 days fed with added lactic acid bacteria (0%, 0.5%, 1.0%, and 2.0%).

在魚體體重方面，在第 14 天時，雖然 1.0% 組 (46.85 ± 5.50 g) 增重也高於 0% 組 (38.42 ± 7.71 g)，但僅有 2.0% 組 (52.36 ± 6.34 g) 顯著高於 0% 組。試驗第 28 天結束時，1.0% (64.00 ± 8.73 g)、2.0% (69.17 ± 7.12 g) 兩組體重均顯著高於 0% 組 (53.04 ± 9.02 g)。相對於 0% 組在 28 天的體重增重率 161%，1.0%、2.0% 兩組的增重率分別為 215% 與 241% (Fig. 1)。

二、對病原菌的抑制效果

實驗結果顯示 (Table 3)，當乳酸菌在 10^7 CFU/ml 時，其對於溶藻弧菌 10^6 CFU/ml 抑制圈為 7.6 ± 5.7 mm， 10^5 CFU/ml 抑制圈為 11.0 ± 1.0 mm， 10^4 CFU/ml 抑制圈為 12.3 ± 1.2 mm， $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml 則無抑制圈。

當乳酸菌在 10^6 CFU/ml 時，其對於溶藻弧菌 10^6 CFU/ml 抑制圈為 6.3 ± 0.6 mm， 10^5 CFU/ml

Table 3 The diameters (mean±SD, mm) of inhibition zones of different concentration of lactic acid bacteria (LAB) against different concentrations of *Vibrio alginolyticus*.

Concentration (CFU/ml)	LAB			
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
10 ⁸	0	0	0	0
10 ⁷	0	0	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i> 10 ⁶	7.6 ± 5.7	6.3 ± 0.6	0	0
10 ⁵	11.0 ± 1.0	8.3 ± 0.6	0	0
10 ⁴	12.3 ± 1.2	10.3 ± 0.6	0	0

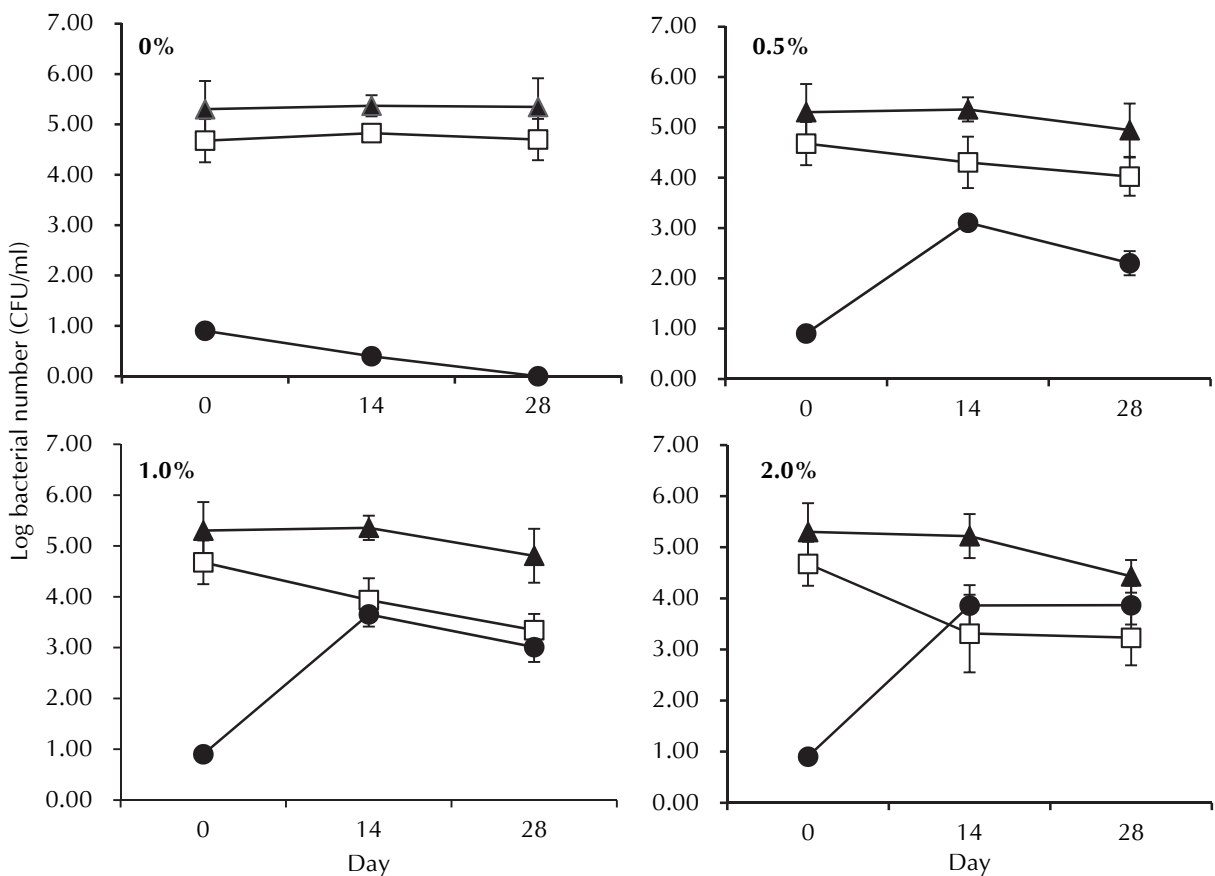


Fig. 2 Numbers of heterotrophy bacteria (▲), vibrios (□), and lactic acid bacteria (LAB) (●) of intestines of *Epinephelus coioides* after 14 and 28 days fed with added LAB (A: 0%, B: 0.5%, C: 1.0%, and D: 2.0%). Data are indicated as log bacterial number (CFU/ml) mean ± SE.

抑制圈為 8.3 ± 0.6 mm，10⁴ CFU/ml 抑制圈為 10.3 ± 0.6 mm。10⁷~10⁸ CFU/ml 無明顯的抑制圈 (Table 3)。

當乳酸菌在 10⁵ CFU/ml 及 10⁴ CFU/ml 時，其對於溶藻弧菌 10⁴~10⁸ CFU/ml 均無明顯的抑制圈。

三、石斑魚腸道菌落數變化

分析腸道內菌落數結果顯示 (Fig. 2)，第 0 天時，石斑魚腸道內異營性菌量為 2.0×10⁵ CFU/ml，弧菌量 4.8×10⁴ CFU/ml，乳酸菌量 1.5 CFU/ml。在三組試驗組第 14 天時石斑魚腸道內乳酸菌量都有增加，0.5% 組乳酸菌量 1.3×10³ CFU/ml，1.0% 組

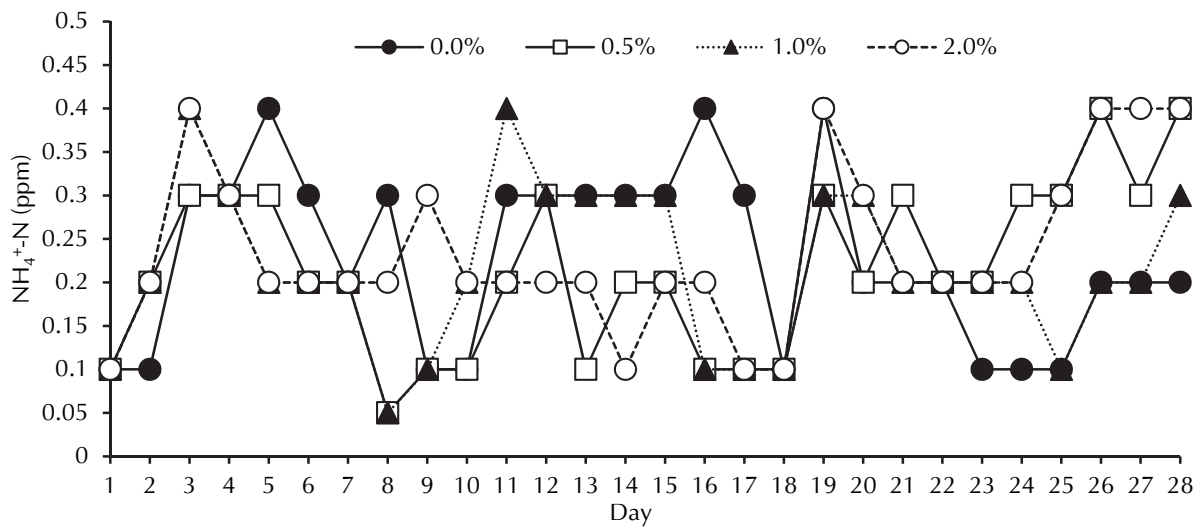


Fig. 3 Changes of NH_4^+ in water quality during *Epinephelus coioides* fed with added lactic acid bacteria (0%, 0.5%, 1.0%, and 2.0%).

為 4.5×10^3 CFU/ml，2.0%組為 7.5×10^3 CFU/ml。試驗第 28 天時，0.5% 組 2.0×10^2 CFU/ml 及 1.0% 組 1.0×10^3 CFU/ml，乳酸菌量較試驗第 14 天時減少，但仍較 0% 組 2.0 CFU/ml 高；2.0% 組第 28 天腸道內乳酸菌量 7.4×10^3 CFU/ml，較第 14 天相比無明顯差異。

分析 TCBS 培養基腸內道弧菌量變化結果，第 0 天時弧菌量 4.8×10^4 CFU/ml，三組試驗到第 14 天時腸內道弧菌量都有減少，0.5% 組為 2.0×10^4 CFU/ml，1.0% 組為 8.6×10^3 CFU/ml，2.0% 組為 2.1×10^3 CFU/ml，減少最多。第 28 天時三組弧菌量持續減少，分別為 0.5% 組 1.1×10^4 CFU/ml，1.0% 組 2.2×10^3 CFU/ml，2.0% 組 1.7×10^3 CFU/ml，皆較控制組弧菌量 5.0×10^4 CFU/ml 少。

分析 TSA 培養基腸內道異營性菌量結果顯示，第 0 天時為 2.0×10^5 CFU/ml，第 14 天時 0% 組、0.5% 組及 1.0% 組皆為 2.3×10^5 CFU/ml，2.0% 組為 1.7×10^5 CFU/ml。第 28 天 0% 組為 2.2×10^5 CFU/ml，而三試驗組異營性細菌數量皆為減少，0.5% 組為 8.8×10^4 CFU/ml、1.0% 組 6.4×10^4 CFU/ml 及 2.0% 組 2.7×10^4 CFU/ml (Fig. 2)。

四、養殖池水質變化

監測水中氨態氮，4 個添加乳酸菌濃度試驗組間無明顯差異，氨態氮濃度範圍在 0.1 ~ 0.4 ppm，

為魚隻生長之安全濃度範圍。監測水中亞硝酸四個添加乳酸菌濃度試驗組間濃度皆維持在 < 0.01 ppm，到試驗第 27 天時，4 個添加乳酸菌濃度試驗組間亞硝酸皆為 0.04 ppm。pH 值在 4 個添加乳酸菌濃度試驗組間試驗期間皆在 8.3 ~ 8.5 之間 (Fig. 3)。

討 論

一、乳酸菌粉對於石斑魚成長的影響

分析魚隻增重結果，以增重率來說明，相對於 0% 組在 28 天的體重成長率 161%，添加 0.5%、1.0%、2.0% 三組的成長分別為 188%、215% 與 241%，皆未添加組為高。在其他水產生物投餵添加乳酸菌的研究也有相同的結果。投餵養殖比目魚 (*Paralichthys olivaceus*) *Lactobacillus* sp. DS-12 菌株，能抑制病原菌生長，成長速度也較快 (Byun *et al.*, 1997)。Gatesoupe (1994) 以添加乳酸菌滋養的輪蟲投餵受弧菌感染的大菱鰾魚 (*Scophthalmus maximus*) 結果發現，可得到較高的活存率。

學者研究結果即證實，益生菌能刺激動物的免疫機制，增進動物的食慾，所生產的維生素，與化合物的結合改善營養，並通過消化成分解 (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Audtin, 2002)。

乳酸菌則藉由產生有機酸、過氧化氫及細菌素抑制病原菌的生長，維持腸道內菌相的平衡，幫助成長及健康 (Panigrahi *et al.*, 2005)。乳酸菌菌體及所產生黏液、代謝物、細胞結構或 DNA 皆會刺激及調節腸道免疫系統，提昇宿主的健康 (Corthesy *et al.*, 2007)。石斑魚增重率有隨著投餵時間以及投餵量的增加，增重率增加的情形，與腸道內乳酸菌定殖的量有相關性。

三試驗組飼料乳酸菌含量分別為 0.5% 組 1.5×10^5 CFU/g、1.0% 組 3×10^5 CFU/g、2.0% 組 6×10^5 CFU/g。比較各組之乳酸菌在腸道內的定殖率，結果顯示，第 14 天時 0.5% 組的乳酸菌定殖率為 0.061%，1.0% 組為 0.107%，2.0% 組為 0.086%；第 28 天 0.5% 組的乳酸菌定殖率為 0.005%，1.0% 組為 0.012%，2.0% 組為 0.044%，亦即添加乳酸菌的三個試驗組，乳酸菌在腸道中的定殖率隨著乳酸菌量投餵量的增加而增加，然而比較試驗第 14 天及 28 天乳酸菌在腸道內的定殖量發現有下降的情形，推測原因為 28 天時石斑魚增重比例達到 188 ~ 241%，因此依其試驗第 0 天時魚隻體重計算，投餵的比例量減少。

海水魚的胃液 pH 最低可達到 1.5，一般則維持約在 pH 2.5 ~ 3.5。而一般以混合飼料投餵方式進入魚隻體內的益生菌必須耐受胃腸道低 pH 及各種消化酶，才能定殖於腸道黏膜中，達到抑制腸道病原菌生長的效果 (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Audtin, 2002)。本試驗結果顯示，所使用之乳酸菌對於酸有高耐受性，及吸附腸道細胞的能力，隨著投餵的乳酸菌粉量的增加，能使乳酸菌較穩定的定殖於石斑魚腸道。藍等 (2011) 研究結果指出，自魚蝦分離出的四種乳酸菌，具有耐酸性 (pH 3.0)、耐鹽膽鹽性 (0.4% bile salt) 及耐鹽性 (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。Sahoo *et al.* (2015) 研究結果也指出從淡水魚分離出 5 種乳酸菌，其中的 *L. gasseri* TSU3 and *L. animalis* TSU4 兩種乳酸菌可以耐酸性 (pH 2.5) 和膽鹽 (0.3% oxygall)，且對於病原菌有抑制力，適合應用在水產養殖。

二、乳酸菌對弧菌病原菌的抑制效果及對石斑魚腸菌落數的影響

目前已有許多種運用在水產養殖中的益生菌，是有助於動物的健康，以及對於同時存在於腸道中的其他致病細菌有拮抗作用 (Hjelm *et al.*, 2004)。本次試驗使用的粉狀乳酸菌經液態培養後，對於溶藻弧菌有抑制能力，且同時隨著乳酸菌濃度的增加，抑制能力也增加。Figueras *et al.* (2003) 指出，*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus lactis*、*Leuconostoc meaeenteroides*、*Pediococcus acidilactici* 等乳酸菌具有抑制溶藻弧菌的能力。乳酸菌是魚類消化道內常見的有益菌種，能定殖在消化道的黏膜絨毛，具有產生細菌素及乳酸、乙酸、乙酰基、丁二醇、乙醛、過氧化氫等抑制和拮抗病原菌生長的物質 (Gilliland, 1990; Gatesoupe, 1991; Vandenberg, 1993)。Balcázar *et al.* (2007a) 所分離出來的三株 LAB strains (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CLFP100, *L. lactis* subsp. *cremoris* CLFP102 and *L. curvatus* CLFP150)，因能生產拮抗化合物，競爭排斥和抑制魚病原菌生長，所以可以應用在治療細菌性感染的魚隻，作為一個良好替代化學藥物的治療劑。

試驗結果發現，投餵乳酸菌粉的石斑魚腸道內弧菌的數量，在試驗第 14 天時都有減少的現象，以 2.0% 組為最高添加量，其弧菌減少的量也最多。在第 14 天及 28 天時，腸道內的乳酸菌量已高於弧菌量，表示乳酸菌競爭於腸道黏膜定殖的位置，同時分泌抑制拮抗物質，使得弧菌及其他異營性細菌也減少。在試驗第 14 天，1.0% 組與 2.0% 組兩試驗組石斑魚腸道內乳酸菌量高於試驗第 28 天，表示隨著魚隻的成長，因投餵乳酸菌量上沒有跟著增加，以體重及添加乳酸菌的比例上是減少的。而試驗 1.0% 組的弧菌量在第 28 天時持續減少，0.5% 組石斑魚腸道弧菌量減少的量較少，第 14 天與第 28 天幾乎沒有差異。這個結果顯示乳酸菌在生物體腸道內需維持一定數量，才能發揮其有益生物體的功能 (Vázquez *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2007b)。

三、飼料中添加乳酸菌粉對於養殖池水質的影響

本次試驗乳酸菌粉為添加於點帶石斑魚飼料

中，乳酸菌對於石斑魚成長及抑制腸道病原弧菌、改變腸道菌相外，試驗期間監測池水的氨態氮、亞硝酸及 pH 值變化不大，一直維持在魚隻成長的安全範圍質之間。點帶石斑魚排泄物質，並無使池水中氨態氮及亞硝酸持續的增加，一直維持在恆定的安全數值之中。Naidu *et al.* (1999) 即研究指出益生菌可以於動物消化道內產生酵素，對消化有協同效應，幫助腸道的消化吸收。推測除養殖水體自淨能力外，石斑魚藉由攝食進入體內的乳酸菌，建立腸道內良好菌相，幫助營養的吸收，減少未消化吸收完全的有機質排放入水中，相對於對於水質有穩定的效果。

結論

以本實驗點帶石斑魚成長結果對應各試驗組點帶石斑魚腸道內菌變化及定殖率結果發現，在試驗添加乳酸菌粉量 0.5%，對於點帶石斑魚的成長與抑制病原菌的能力是不足的；而在試驗組添加乳酸菌粉量 1.0% 與添加 2.0% 的魚隻的增重及全長的增長無顯著差異，以及腸內菌相及抑制病原弧菌的能力也是無明顯差異。因此，在考量經濟效益下，以乳酸菌粉量 1.0% 添加飼料，進行投餵，既可以達到有效增進石斑魚的成長，足夠的乳酸菌又可定殖於魚隻腸道內，同時抑制病原，是最有經濟效益的添加量。

參考文獻

- 陳建初 (1983) 氮及其化合物. 水質分析, 九大圖書公司, 臺北, 85-103.
- 藍惠玲, 吳建威, 陳文君, 謝孟真, 吳純衡 (2011) 魚蝦腸道益生乳酸菌的篩選及其特性. 水產研究, 19(2): 63-76.
- Balcázar, J. L., T. Rojas-Luna, and D. P. Cunningham (2007a) 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. Invertebr. Pathol., 96(2): 147-150.
- Bauer, A. W., W. 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.
- Balcázar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés and J. L. Múzquiz (2007b) In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet. Microbiol., 122(3): 373-380.
- Byun, J. W., S. C. Park, Y. Benno and T. K. Oh (1997) Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol., 43(6): 305-308.
- 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(7): 1137-1144.
- Corthesy, B., H. R. Gaskins and A. Mercenier (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. J. Nutr., 137(3): 781-790.
- De Man, J. C., D. Rogosa and M. E. Sharpe (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23(1): 130-135.
- Farzanfar, A. (2006) The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol. Medical. Microbiol., 48(2): 149-158.
- Figueras, A., B. Novoa, M. Planas and L. Villamil (2003) Control of *Vibrio alginolyticus* in artemia culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture, 219(1): 43-56.
- Gatesoupe, F. J. (1991) The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 96(3-4): 335-342.
- Gatesoupe, F. J. (1994) Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. Aquat. Living Resour., 7(4): 277-282.
- Gilliland, S. E. (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 87(1-2): 175-188.
- Gildberg, A., H. Mikkelsen, E. Sandaker and E. Ringø (1997) Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). In Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment, Springer, Netherlands, 279-285.
- Gildberg, A. and H. Mikkelsen (1998) Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture, 167(1): 103-113.
- Gullian, M., F. Thompson and J. Rodríguez (2004) Selection of probiotic bacteria and study of their

- immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1): 1-14.
- Hjelm, M., O. Bergh, A. Riaza and J. Nielsen (2004) Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27(3): 360-371.
- 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. Aquacult.*, 13: 283-316.
- Johnson, S. R. and C. L. Case (1995) Laboratory experiments in microbiology. The Benjamin Cummings Publishing Co. Inc., Menlo Park, CA, USA. 20 pp.
- 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(2): 209-218.
- 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). *Aquacult. Nutr.*, 13(2): 131-136.
- 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.
- Naidu, A. S., W. R. Bidlack and R. A. Clemens (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci.*, 30(1): 113-126.
- Nikoskelainen, S., A. C. Ouweland, G. Bylund, S. Salminen and E. M. Lilius (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 15(5): 443-452.
- Olsson J. C., A. Westerdahl, P. L. Conway and S. Kjelleberg (1992) Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2): 551-556.
- Panigrahi, A., V. Kiron, J. Puangkaew, T. Kobayashi, S. Satoh and H. Sugita (2005) The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243(1): 241-254.
- Planas, M., J. A. Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M. González and M. Murado (2004) Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240(1): 313-329.
- Ringø, E. and F. J. Gatesoupe (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3): 177-203.
- Shiri Harzevili, A. R., H. Duffel, P. Dhert, J. Swings and P. Sorgeloos (1998) Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquacult. Res.*, 29(6): 411-417.
- Sahoo, T. K., P. K. Jena, N. Nagar, A. K. Patel and S. Seshadri (2015) In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 7(2): 126-136.
- Skjermo, J. and O. Vadstein (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177(1-4): 333-343.
- Vandenbergh, P. A. (1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1): 221-238.
- Vázquez, J. A., M. González and M. A. Murado (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245(1): 149-161.
- 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.
- Villamil, L., C. Tafalla, A. Figueras and B. Novoa (2002) Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9(6): 1318-1323.
- Villamil, L., A. Figueras and B. Novoa (2003) Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14(2): 157-169.
- 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.

Effects of Powdered Lactic Acid Bacteria Added Diets on Microflora of Intestines and on Growth of Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*

Yu-Chen Wu^{1*}, Feng-You Lin¹, Yi-Shun Hu¹, Liang-Xuan Huang²,
Jinn-Rong Hseu¹ and Shinn-Lih Yeh¹

Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute
National Penghu University of Science and Technology

ABSTRACT

Lactic acid bacteria, *Lactobacillus* spp. (LAB) are a group of probiotics which are often practiced in aquaculture to enhance growth of aquatic species. In this study, we tried to investigate the effect of powdered LAB added diets on microflora of intestines and on growth of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. After 28 days of feeding, the total numbers of vibrios and LAB were counted by plate colony count and the growth was measured. The results showed that the numbers of LAB of intestines increased with dosage. The number of vibrios reduced owing to the inhibitory effect of LAB. The groupers that were fed with 2.0% and 1.0% of powdered LAB added grew faster than others. In addition, LAB did not affect water quality. Base on the study, it was suggested that a suitable amount of 1.0% LAB added diets could be used in grouper culture to have better growth.

Key words: *Epinephelus coioides*, lactic acid bacteria, probiotic

*Correspondence: Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute; TEL: (06) 788-0461 ext. 228; FAX: (06) 788-1597; E-mail: ycwu@mail.tfrin.gov.tw