

飼料中添加益生菌 *Bacillus pumilus* D5 對於白蝦成長、 免疫反應及抗腸炎弧菌效率之影響

黃美瑩¹ · 朱惠真^{1*} · 陳力豪¹ · 劉旭展¹ · 曾亮璋¹ · 潘崇良² · 張錦宜³

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

³ 行政院農業委員會水產試驗所

摘 要

弧菌症長久以來都是水產養殖產業的重大威脅之一，應用微生物防治策略有助於弧菌症之控制。本研究添加對弧菌具拮抗作用的益生菌 *Bacillus pumilus* D5 於飼料中 (10^7 CFU/g) 餵食白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 8 週。結果顯示，白蝦增重率及飼料效率皆無顯著增加 ($p > 0.05$)，但是試驗組在第 10 天，白蝦缸內的水與肝胰腺之弧菌數 (5.7×10^2 CFU/ml, 7.3×10^4 CFU/g) 均明顯低於對照組 (2.6×10^3 CFU/ml, 3.8×10^5 CFU/g) ($p < 0.05$)。免疫指標方面，試驗組第 8 週，白蝦血液中酚氧化酶 (phenoloxidase) 活性 (0.315) 及呼吸爆 (0.566) 均明顯高於對照組 (0.111, 0.380) ($p < 0.05$)，以腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 攻擊後，試驗組血液中酚氧化酶活性 (0.326) 亦顯著高於對照組 (0.257) ($p < 0.05$)。免疫相關基因方面，白蝦飼餵試驗組飼料後，以腸炎弧菌攻擊前後，唐氏綜合症細胞黏附分子 (Down syndrome cell adhesion molecule) 及原酚氧化酶 (prophenoloxidase) 基因之相對表現量 (26.72, 4.83) 均明顯高於對照組 (5.46, 1.60) ($p < 0.05$)。以腸炎弧菌攻擊後，試驗組的活存率 (16.08%) 明顯高於對照組 (4.76%) ($p < 0.05$)。以上結果顯示，*B. pumilus* D5 具有降低白蝦之缸內水與肝胰腺之弧菌數，提升白蝦之免疫反應及抗腸炎弧菌感染之功能。

關鍵詞：益生菌 *Bacillus pumilus*、白蝦、成長、免疫、抗病力

前 言

弧菌症 (vibriosis) 長久以來都是水產養殖產業的重大威脅之一，即使是養殖先進國家如日本，每年因弧菌症所造成的損失仍高達上千萬美元。弧菌症的病原是弧菌 (*Vibrio* spp.)。溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 及哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 是養殖蝦類主要的細菌性病原，會造成蝦類肝胰腺、心臟、淋巴器官等壞死 (Ruangpan and Kitao,

1991; Karunasagar *et al.*, 1994)。塔氏弧菌 (*Vibrio tubiashii*) 則會造成雙枚貝大量死亡，使得養殖業者損失慘重 (Tubiash *et al.*, 1965; Elston *et al.*, 2008)。哈維氏弧菌、鯊魚弧菌 (*Vibrio carchariae*) 及鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 則分別為石斑魚 (Yii *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2008) 及鱸魚 (Sorrosa *et al.*, 2012) 重要的機會性病原之一，會使得罹病魚眼部感染、肌肉潰瘍、腎臟與膽囊腫大、胃腸炎及敗血症等。事實上，弧菌為海水中最常見的細菌之一，因此海水及半淡鹹水養殖的魚種都可能深受其害。

蝦類早期死亡綜合症 (shrimp early mortality syndrome; EMS) 是近幾年來爆發於養殖草蝦 (*Penaeus monodon*) 與白蝦 (*Litopenaeus*

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

vannamei) 的疾病,也與弧菌感染有關 (Tran *et al.*, 2013)。自 2009 年初次於中國傳出疫情後,迄今已有好幾個亞洲國家的養殖草蝦與白蝦接連爆發大量死亡 (Leaño and Mohan, 2012), 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, 推測可能腸炎弧菌被噬菌體感染後, 在噬菌體複製時, 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而造成死亡。

當面臨水產生物細菌感染的問題時, 以往養殖戶常使用抗生素加以治療, 而抗生素過量的使用易發生殘留而污染環境, 也可能導致具有抗藥性的菌株出現 (Gatesoupe, 1999), 抗藥性細菌有可能藉質體 (plasmid) 轉移抗藥性之基因到人體有關的細菌, 進而侵害人類的健康 (Schwarz *et al.*, 2001)。為尋求抗生素治療的替代方案, 益生菌 (probiotics) 的功能開始被關注, 亦已廣泛被應用, 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生物的腸道中, 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機制主要包括產生: 抗菌肽、揮發性的物質 (volatile compounds)、溶菌酶、蛋白酶、改變 pH 值及競爭營養物質或空間等, 而主要益生菌的種類為芽孢桿菌類 (*Bacillus* spp.) 及乳酸菌 (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來源、改進飼料消化及吸收、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生長、提高抗病力、活存率與改善水質等 (Tucker and Kennedy, 2001; Wang *et al.*, 2008; Nayak, 2010)。

朱等 (2016) 自白蝦所分離出的 *Bacillus pumilus* D5, 為水產病原弧菌之拮抗菌, 具有抑制溶藻弧菌、腸炎弧菌、哈維氏弧菌、鰻弧菌、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 及創傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 等 6 種常見水產病原弧菌之能力, 對於所測試之大部分抗生素皆呈現敏感性, 因此, *B. pumilus* D5 菌株具抗水產病原弧菌發展潛力。本研

究將 *B. pumilus* D5 以孢子型態添加於飼料中, 評估該菌對於白蝦 (1) 成長; (2) 缸內水及肝胰腺總生菌數與弧菌數; (3) 免疫相關反應及 (4) 抗病原弧菌之效率。

材料與方法

一、菌株來源

本研究使用之菌株為 *Bacillus pumilus* D5, 係朱等 (2016) 自白蝦全蝦樣品所分離的水產病原弧菌之拮抗菌。

二、實驗用飼料之製作

B. pumilus D5 為孢子形成菌, 本研究將 *B. pumilus* D5 以孢子型態添加於白蝦飼料中, 以維持 *B. pumilus* D5 在飼料儲存期間菌數的穩定性。所使用之孢子培養液組成係參考 Leguerinel *et al.* (2007), 簡述如下: 培養液組成包括 yeast extract 5 g、peptone 5 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、MnSO₄ 0.04 g、CaCl₂ 0.1 g 與 NaCl 30 g, 溶於蒸餾水 1 L, 於培養基滅菌前調整 pH 為 6.8。將 *B. pumilus* D5 接種於孢子培養液, 28 °C, 150 rpm 振盪培養, 培養液中所形成孢子數量之估算, 係取培養液進行孢子染色 (Johnson and Case, 2004), 由總生菌數中孢子所佔的百分比計算孢子之數量。培養 1 週後, 得到含有 *B. pumilus* D5 孢子之培養液, 孢子數達 10⁸ CFU/ml 以上。

實驗共有 2 組, 分別為對照組及添加 *B. pumilus* D5 (孢子含量 10⁷ CFU/g) 實驗組。飼料製作方式如下: 對照組係以斑節蝦配合飼料 (福星牌, 洪國實業股份有限公司, 宜蘭, 臺灣) 直接投餵。添加 *B. pumilus* D5 組則將含有 *B. pumilus* D5 孢子之培養液添加於斑節蝦配合飼料中, 比例為 1 kg 飼料添加 100 ml 含有 *B. pumilus* D5 孢子之培養液, 飼料中 *B. pumilus* D5 孢子的含量為 10⁷ CFU/g。所製成之飼料於 4 °C 冷藏, 含 *B. pumilus* D5 組之飼料每週取樣, 檢測飼料內 *B. pumilus* D5 孢子殘存量, 在益生菌 *B. pumilus* D5 孢子含量仍為 10⁷ CFU/g 期限 (3 個月) 內投餵與白蝦。

三、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於白蝦生長之影響

白蝦購自民間養殖場，蓄養於水產試驗所基隆總所，具循環過濾系統的 FRP 桶 (500 L) 中 2 週，水溫維持在 26 ± 1 °C，鹽度為 31 psu。

實驗共有 2 組，為對照組及含 *B. pumilus* D5 孢子 (10^7 CFU/g) 飼料的實驗組。取體重約 3 g 的白蝦 120 尾進行實驗，隨機平均放置於 6 缸 96 公升的玻璃缸，每缸 20 尾蝦，每組 3 缸。同組之 3 個玻璃缸共用一個循環過濾系統。每日上午 9 點及下午 5 點投餵飼料，投餵量為蝦隻體重的 2.0%，每 2 週量測蝦體重一次，調整投餵量，每次餵食的 1 hr 後撈除未攝食的殘餌，自投餵量中扣除；估算方式係預先測量單顆飼料之平均重量後乘以殘餌顆數。試驗進行 8 週。

成長實驗期間每 2 週量測蝦體重一次，測量當天不餵食。分析增重率 (percent weight gain, PWG) 及飼料效率 (feed efficiency, FE) (Kureshy and Davis, 2002)。

$$\text{PWG (\%)} = [(\text{最後體重}) - (\text{最初體重}) / (\text{最初體重})] \times 100\%$$

$$\text{FE} = (\text{最後體重}) - (\text{最初體重}) / \text{總飼料攝取量}$$

四、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於缸內的水及白蝦肝胰腺總生菌數及弧菌數之影響

供試蝦分別餵食對照組及含 *B. pumilus* D5 實驗組飼料 10 天，停止餵食 2 天後，自兩組各 3 缸中分別採集各缸之水樣 10 ml，每缸 1 隻蝦之肝胰腺，分別進行總生菌及弧菌數量計算。水樣以 1 ml 原液加 9 ml 生理食鹽水，進行連續稀釋，並將不同稀釋濃度樣品分別塗抹於含有 2.5% NaCl 之 tryptic soy agar (TSA) 及 thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) 之上，於 28 ± 2 °C 培養 48 hr 後計數菌落數，以分別計數總生菌數量及弧菌數量 (Hoseinifar *et al.*, 2011)。

白蝦方面，將蝦以 75% ethanol 進行表面殺菌，以滅菌後之剪刀剪開蝦隻背部肌肉及頭胸甲，再用鑷子取出肝胰腺，秤重後剪成數小段，加入肝胰腺重的 3 倍體積之生理食鹽水稀釋後，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，以生理食鹽水連續稀釋後，將不同稀釋濃度樣品分別塗抹於含有 2.5% NaCl 之 TSA 及 TCBS 上面，於 28 ± 2 °C 培養 48 hr 後，計數總生菌數量及弧菌數量 (Hoseinifar *et al.*, 2011)。

五、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於白蝦免疫相關反應之影響

供試蝦分別連續餵食對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料 8 週，再以病原菌攻擊 (流程詳見材料與方法六) 7 天後，自兩組各 3 缸，每缸分別採集 3 尾白蝦之血液，進行免疫指標及免疫相關基因表現量之分析，每項分析均進行 3 重覆。蝦血採集方法參照 Liu *et al.* (2004)，以 1 ml 塑膠針筒配 25 G 針頭自白蝦第 5 或第 6 對步足中間之腹血竇抽出血淋巴液，使其與預先吸取於針筒的抗凝血劑 (0.14 M NaCl、0.03 M citric acid、0.11 M glucose 及 0.03 M sodium citrate, pH 5.6) 以 1:1 的比例混合。採集的蝦血進行低速離心 ($600 \times g$, 10 min, 4 °C)，去除上清液後，得到的沉澱物為蝦血球，以血球計數盤 (counting chamber Neubauer-improved, Marienfeld, Germany) 計算血球細胞濃度。

(一) 酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 活性

酚氧化酶活性之測定方法是參照 Liu *et al.* (2004) 並做部分修改。低速離心去除上清液的蝦血球細胞加入同體積之 Cacodylate (Cac) buffer (10 mM CaCl₂, 10 mM sodium cacodylate trihydrate, pH 7.0)。於 96 孔槽平底微量滴定盤中，每槽加入 100 μL 蝦血球細胞及 Cac buffer 混合液，未誘發免疫刺激組 (basal activity, BA) 再添加 Cac buffer 100 μL，誘發免疫刺激組 (stimulated activity, SA) 則添加 trypsin (1 mg/ml in Cac buffer) 100 μL，在室溫下反應 10 min。最後加入 3,4 -Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, 3 mg/ml in Cac buffer) 室溫下反應 5 min 使其呈色，於 ELISA reader 波長 492 nm 下測定吸光值。誘發免疫刺激組與未誘發免疫刺激組測定之吸光值的差值為酚氧化酶活性。

(二) 呼吸爆 (respiratory burst) 之測定

呼吸爆之測定方法參照 Secombes (1990) 及 Stasiack and Bauman (1996), 並修改自 Cook *et al.* (2001) 及 Dügenci *et al.* (2003) 所述之 nitroblue tetrazolium (NBT) 染色法進行測定。低速離心去除上清液的蝦血球細胞加入同體積之抗凝血劑。於 96 孔槽平底微量滴定盤中, 每槽加入 100 μ L 蝦血球細胞及抗凝血劑混合液, 室溫靜置 2 hr 使血球附著於底部。去除上清液後, 未誘發免疫刺激組再添加 Hank's balanced salt solution (HBSS) 100 μ L, 誘發免疫刺激組則添加 zymosan (2 mg/ml) 100 μ L, 在室溫下反應 1 hr。去除上清液, 加入 100% ethanol 終止反應, 接著以 70% ethanol 沖洗三次後風乾, 最後加入 120 μ L 2 M KOH 及 140 μ L dimethyl sulfoxide (DMSO) 以溶解 cytoplasmic formazon, 於 ELISA reader 波長 630 nm 下測定吸光值。誘發免疫刺激組與未誘發免疫刺激組測定之吸光值的差值為呼吸爆 (Pick and Mizel, 1981)。

(三) 原酚氧化酶 (prophenoloxidase, proPO) 與唐氏綜合症細胞黏附分子 (Down syndrome cell adhesion molecule, Dscam) 基因表現

總 RNA 萃取參考 Chomczynski and Sacchi (1987) 之方法, 利用 Trizol® (Invitrogen, USA) 試劑萃取蝦血球細胞之總 RNA, 藉由分光光度計確認其吸光值 $A_{260}: A_{280} > 1.9$ 後, 再以 SuperScript® III reverse transcriptase kit (Invitrogen, USA) 進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR), 將 RNA 反轉錄成 cDNA (Trinidad *et al.*, 2009), 製備好之 cDNA 置於 -20°C 保存。

將製備好之 cDNA 做為模板, 以即時定量 PCR (real-time PCR) 方式, 分析原酚氧化酶以及唐氏綜合症細胞黏附分子基因在病原菌攻擊前後之表現量 (Wong and Medrano, 2005)。

本實驗即時定量 PCR 之引子, 由高雄海洋科技大學海洋生物技術系蔡志明老師實驗室提 pro PO 正向引子 (forward primer) : 5'-GCCTTGGCAACGCTTTCA-3'、Pro PO 反向引子

(reverse primer) : 5'-CGCGCATCAGTTCAGTTTGT-3' ; Dscam 正向引子 : 5'-ACAAGCCAAGGCACCAGACT-3'、Dscam 反向引子 : 5'-GTTGCC TGTGGGGCTCACTT-3' ; β -actin 正向引子 : 5'-CACCACCGCTGAACGAGAA-3'、 β -actin 反向引子 : 5'-AAGGGCGACATAGCAAAGTTTC-3'。

本實驗使用 TOptical thermocycler (Biometra, Germany) 進行即時定量 PCR, 採三重覆試驗, 反應體積為 20 μ L, 包括 : 10 μ L luminaris color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA)、正、反向引子各 0.4 μ L、1 μ L 蝦血球 cDNA 及 8.2 μ L 純水。反應條件為 : 恆溫階段 (holding stage), 50°C 、120 sec, 95°C 、600 sec 進行 DNA 變性 ; 循環階段 (cycling stage), 95°C 、15 sec, 60°C 、60 sec 共 40 次循環以擴增 DNA ; 溶解曲線階段 (melt curve stage), 以 95°C 、15 sec, 60°C 、15 sec, 95°C 、15 sec 生成解離曲線。

即時定量 PCR 數據分析軟體為 qPCRsoft 2.1 (Analytik Jena AG, Germany), 基因表現的相對定量方式是依據製造商的產品說明。簡述如下 : 循環閾值數 (cycle threshold value, C_t value) 定義為含有螢光染劑之 PCR 產物生成量達到臨界生成量 (threshold value) 的循環數。標的基因之複製數量 (copy number) 與 C_t value 呈現負相關性, 因此, 樣品中有較高含量的標的基因時, C_t value 將低於樣品中有較低含量的標的基因者。先將各實驗組免疫相關基因得到之循環閾值數, 減去各組 β -actin 基因之循環閾值數, 得到 ΔC_t 值, β -actin 基因作為內部對照 (internal control), 將各組數據標準化, 以補償總 RNA 數量、RT-PCR 反應效率及其他可能造成影響的差異。把各組病原菌攻擊後之 ΔC_t 值減去攻擊前的 ΔC_t 值, 此差值稱作 $\Delta\Delta C_t$ 值, 分析時以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 作為比較之數據, 顯示病原菌攻擊前後該基因的相對表現量差異。

六、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於白蝦抵抗腸炎弧菌之影響

實驗方法主要參照 Luis-Villasenor *et al.* (2013)。使用之腸炎弧菌為本所張副所長錦宜所提供, 係經過 AP3 引子證實, 帶有 EMS 特性之腸炎弧菌 (Sirikharin *et al.*, 2014)。菌接種於 tryptic soy broth (TSB), 於 28°C 下培養 24 hr, 將培養液離

心 (8000 × g, 10 min, 4°C) 除去上清液，將沉澱之細菌以生理食鹽水清洗 2 次，最後以分光光度計於波長 600 nm 下測定，調整菌液濃度配製成 1×10^7 CFU/ml 懸浮液。供試蝦分別餵 2 組不同飼料 8 週後，以細菌懸浮液注射於蝦背部肌肉，注射量為蝦體重的 0.5% (v/w，即 10 g 之白蝦注射量為 50 μL)；並另取數尾蝦注射等量生理食鹽水以做為對照，注射後觀察並記錄蝦的死亡數目，持續 2 週 (Luis-Villasenor *et al.*, 2013)。

七、統計分析方法

本研究飼料中添加 *B. pumilus* D5 對缸內水中總生菌數及弧菌數之影響，因每組 3 缸為同一循環水系統，只取 3 缸數據之平均值，未進行統計分析。其餘試驗數據以 SAS (Statistical Analysis System) 套裝 GLM (General Linear Model Procedure) (SAS, 1988) 軟體作單向變異數分析 (one-way analysis of variance)，並以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組之間之差異，顯著水準定在 0.05。

結 果

一、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於白蝦成長之影響

白蝦分別餵飼對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料 8 週，各組蝦之均重分別自 2.94 及 3.06 g 增至 6.52 g 及 6.97 g，在統計上其間無顯著差異 ($p > 0.05$)；其增重率依序為 212.86% 及 236.76%，也無顯著差異 ($p > 0.05$)。飼料效率方面，對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料組分別為 0.43 及 0.49，亦無明顯差異 ($p > 0.05$) (Table 1)。

二、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對缸內的水及蝦肝胰腺中的總生菌數及弧菌數之影響

白蝦分別餵飼對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料第 10 天時，缸內的水中總生菌數，對照組為 6.9×10^3 CFU/ml，添加 *B. pumilus* D5 組為 $2.5 \times$

10^3 CFU/ml，試驗組總生菌數較對照組少 (Table 2)。缸內的水中弧菌數在對照組為 2.6×10^3 CFU/ml，添加 *B. pumilus* D5 飼料組為 5.7×10^2 CFU/ml，試驗組弧菌數亦低於對照組。對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料組弧菌數佔總生菌數的比例分別為 37.83% 及 22.80% (Table 2)；試驗組弧菌數較對照組下降 78.08%。此外，添加 *B. pumilus* D5 飼料組缸內的水中 *B. pumilus* D5 菌數達 2.0×10^2 CFU/ml。

Table 1 Growth performance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with the control and *Bacillus pumilus* D5 (10^7 CFU/g) diets for 8 weeks

	Feed	
	Control	<i>Bacillus pumilus</i> D5
Initial weight (g)	3.06 ± 0.88	2.94 ± 0.79
Final weight (g)	6.52 ± 2.01	6.97 ± 2.16
PWG	212.86 ± 31.42	236.76 ± 34.62
FE	0.43 ± 0.12	0.49 ± 0.11

PWG : percent weight gain
FE : feed efficiency

白蝦方面，蝦肝胰腺中總生菌數在對照組為 1.5×10^7 CFU/g，添加 *B. pumilus* D5 組為 1.1×10^7 CFU/g，試驗組總生菌數較對照組顯著減少 ($p < 0.05$) (Table 3)。蝦肝胰腺中弧菌數在對照組為 3.8×10^5 CFU/g，添加 *B. pumilus* D5 組為 7.3×10^4 CFU/g，試驗組弧菌數亦顯著低於對照組 ($p < 0.05$)。對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料組弧菌數佔總生菌數的比例分別為 2.49% 及 0.64%；試驗組肝胰腺中弧菌數較對照組減少 80.96% (Table 3)。此外，添加 *B. pumilus* D5 飼料組肝胰腺中 *B. pumilus* D5 菌數達 6.1×10^2 CFU/g。

三、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於白蝦免疫相關反應之影響

以腸炎弧菌攻擊前，對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料組蝦血液中之酚氧化酶活性分別為 0.111 及 0.315，試驗組明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Fig. 1)。而以腸炎弧菌攻擊後，對照組及添

Table 2 Total viable aerobiotic bacteria, *Vibrio* spp., *Bacillus pumilus* D5 counts and the *Vibrio* spp. percentage of total viable aerobiotic bacteria from the tank water of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with control and *B. pumilus* D5 (10^7 CFU/g) diets for 10 days

Treatment	Cultivable bacteria (CFU/ml) ($\times 10^3$)	<i>B. pumilus</i> D5 (CFU/ml) ($\times 10^2$)	<i>Vibrio</i> spp. (CFU/ml) ($\times 10^2$)	<i>Vibrio</i> spp. / cultivable bacteria (%)
Control	6.9	ND	26.0	37.8
<i>Bacillus pumilus</i> D5	2.5	2.0	5.7	22.8

ND: not detected

Table 3 Total viable aerobiotic bacteria, *Vibrio* spp., *Bacillus pumilus* D5 counts and the *Vibrio* spp. percentage of total viable aerobiotic bacteria from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with control and *B. pumilus* D5 (10^7 CFU/g) diets for 10 days

Treatment	Cultivable bacteria (CFU/g) ($\times 10^7$)	<i>B. pumilus</i> D5 (CFU/g) ($\times 10^2$)	<i>Vibrio</i> spp. (CFU/g) ($\times 10^4$)	<i>Vibrio</i> spp. / cultivable bacteria (%)
Control	1.5 ± 0.16^a	ND	38.0 ± 3.65^a	2.49 ± 0.45^a
<i>Bacillus pumilus</i> D5	1.1 ± 0.09^b	6.1 ± 2.31	7.3 ± 0.92^b	0.64 ± 0.11^b

ND: not detected; * $p < 0.05$

加 *B. pumilus* D5 組蝦血液中之酚氧化酶活性分別為 0.257 及 0.326，添加 *B. pumilus* D5 組酚氧化酶活性顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Fig. 1)。試驗組蝦血液中酚氧化酶活性在病原菌攻擊前後，餵飼添加 *B. pumilus* D5 飼料組均顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Fig. 1)。

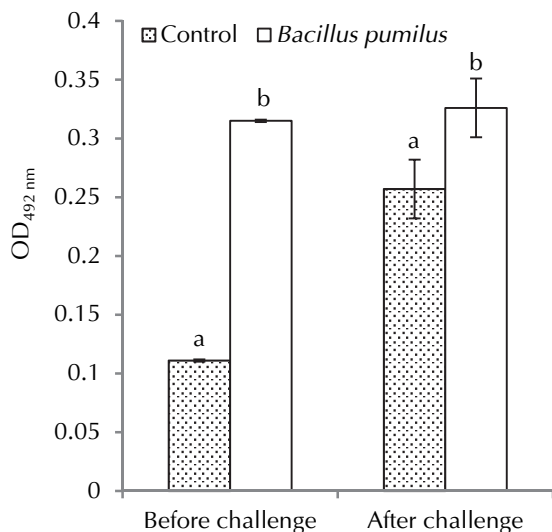


Fig. 1 Phenoloxidase activity of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) before and after challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Shrimps were fed with control and *Bacillus pumilus* D5 diets for 8 weeks. Different letters within before and after challenge represent significant differences ($p < 0.05$).

對照組及添加 *B. pumilus* D5 組血液中呼吸爆分別為 0.380 及 0.566，試驗組明顯均高於對照組 ($p < 0.05$) (Fig. 2)。而以腸炎弧菌攻擊後，對照組及添加 *B. pumilus* D5 組呼吸爆分別為 0.221 及 0.229，試驗組與對照組呼吸爆無顯著差別 ($p > 0.05$) (Fig. 2)。試驗組蝦血液中呼吸爆在病原菌攻擊前高於對照組 ($p < 0.05$)，但病原菌攻擊後試驗組與對照組呼吸爆則無顯著差別 ($p > 0.05$) (Fig. 2)。

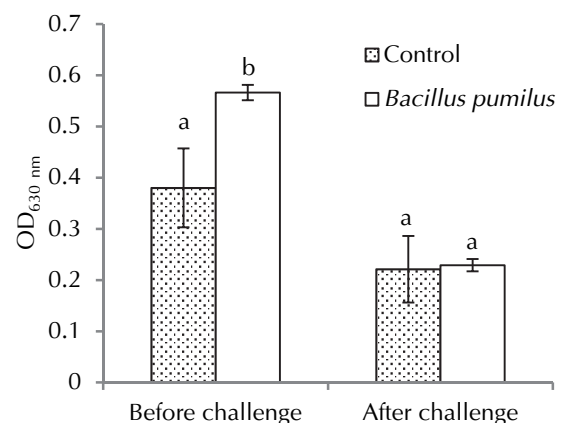


Fig. 2 Respiratory burst of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) before and after challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Shrimps were fed with control and *Bacillus pumilus* D5 diets for 8 weeks. Different letters within before and after challenge represent significant differences ($p < 0.05$).

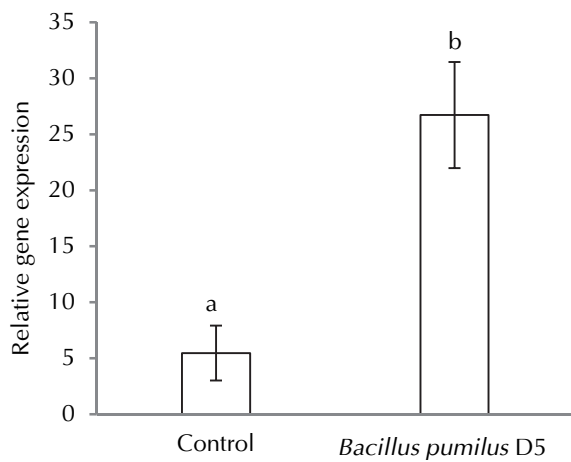


Fig. 3 The relative gene expression of Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with control and *Bacillus pumilus* D5 diets for 8 weeks before and after challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Different letters represents significant differences ($p < 0.05$).

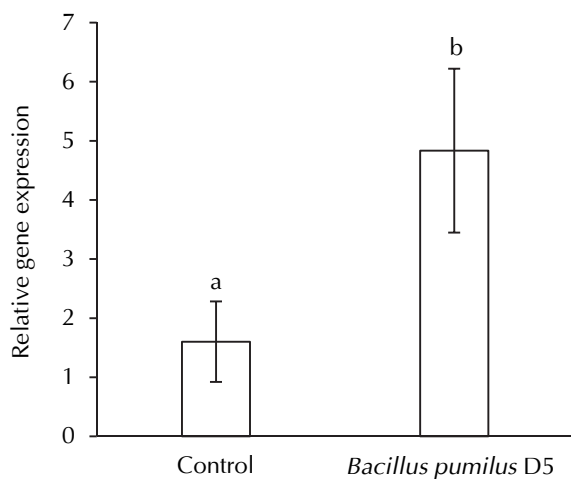


Fig. 4 The relative gene expression of prophenoloxidase (proPO) of differences of before and after challenge with *Vibrio parahaemolyticus* of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with control and *Bacillus pumilus* D5 diets for 8 weeks. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the control and the *Bacillus pumilus* D5 group.

對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料組蝦的唐氏綜合症細胞黏附分子基因之相對表現量為 5.46 及 26.72 (Fig. 3)，試驗組蝦的唐氏綜合症細胞黏附分子基因之相對表現量顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

對照組及添加 *B. pumilus* D5 飼料組蝦的原酚

氧化酶基因之相對表現量為 1.60 及 4.83 (Fig. 4)，餵食添加 *B. pumilus* D5 組的蝦之原酚氧化酶基因之相對表現量高於對照組，且統計上有明顯差異 ($p < 0.05$) (Fig. 4)。

四、飼料中添加 *B. pumilus* D5 對於白蝦抵抗病原菌之效率

白蝦分別餵飼 2 組不同飼料 8 週，以腸炎弧菌攻擊後，在對照組及添加 *B. pumilus* D5 組蝦之存活率分別為 4.76% 及 16.08% (Fig. 5)，餵食添加 *B. pumilus* D5 組蝦的存活率較對照組提高約 3 倍，且統計上與對照組有明顯差異 ($p < 0.05$) (Fig. 5)。

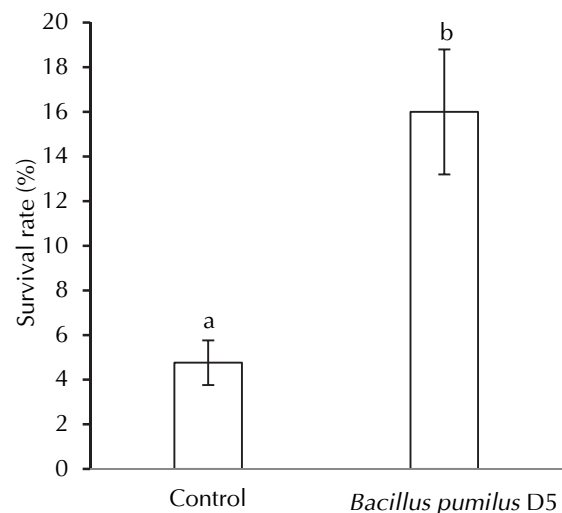


Fig. 5 The survival rate after challenge with *Vibrio parahaemolyticus* of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with control and *Bacillus pumilus* D5 diets for 8 weeks. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the control and the *Bacillus pumilus* D5 group.

討 論

Banerjee *et al.* (2010) 曾在草蝦池中加入 *B. pumilus* 並維持水中的菌量為 10^6 CFU/ml，實驗共進行 18 天；對照組及試驗組的比成長率 (specific growth rate) 分別為 8% 及 10%，試驗組的草蝦比成長率顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。Devaraja *et al.* (2013) 亦指出，在草蝦苗池中加入分離自海水之 *B. pumilus*，維持水中的 *B. pumilus* 菌量為 10^6

CFU/ml，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，實驗共進行 18 天；第 18 天時，對照組及試驗組的草蝦比成長率分別為 9% 及 11%，試驗組的草蝦比成長率顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。Banerjee *et al.* (2010) 及 Devaraja *et al.* (2013) 認為，該 *B. pumilus* 對草蝦無病原性，而且該 *B. pumilus* 具有分泌蛋白酶、脂肪酶及澱粉酶之能力，可以提升試驗組草蝦對於飼料之消化及吸收的程度，因此有助於草蝦之成長。

Nguyen *et al.* (2014) 研究指出，將草蝦腸道中分離出的 *B. pumilus* 添加於龍蝦 (*Panulirus ornatus*) 飼料中 (10^7 CFU/g)，每 3 天餵飼含 *B. pumilus* 之飼料 1 次，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，實驗共進行 60 天。結果顯示，對照組及試驗組龍蝦的比成長率分別為每天 2.5% 及 2.8%，試驗組的龍蝦之比成長率高於對照組 ($p < 0.05$)。Nguyen *et al.* (2014) 認為，*B. pumilus* 對龍蝦而言為安全的菌株；該 *B. pumilus* 具有分泌蛋白酶之能力，可以提升試驗組龍蝦對於飼料之消化及吸收程度，因此有助於龍蝦之成長。

Sun *et al.* (2010) 報導，將分離自生長快速點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 的 *B. pumilus* 添加於飼料中 (10^8 CFU/g)，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，進行餵食點帶石斑 60 天後，對照組及試驗組石斑魚之比成長率 (分別為 1.87 及 1.80) 並無顯著差異 ($p > 0.05$)；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 ($p < 0.05$)。

本研究白蝦分別餵食對照組及試驗組飼料 8 週，統計上，試驗組蝦之成長與對照組並無顯著差異 ($p > 0.05$)，與 Banerjee *et al.* (2010)、Devaraja *et al.* (2013) 及 Nguyen *et al.* (2014) 報告，*B. pumilus* 有助於草蝦及龍蝦之成長的結果有異，而與 Sun *et al.* (2010) 報導，點帶石斑餵食添加 *B. pumilus* 之飼料，對照組及試驗組石斑魚之比成長率並無顯著差異的結果相同。本研究所使用之 *B. pumilus* D5 具有分泌蛋白酶之特性，但並無分泌脂肪酶及澱粉酶之能力(朱等, 2016)，可能是試驗組蝦之成長與對照組並無顯著差異的原因之一。

本研究結果顯示，白蝦餵飼添加 *B. pumilus* D5 組缸內的水與蝦肝胰腺中之弧菌數均較對照組有

明顯下降的趨勢，且缸內的水與蝦肝胰腺有 *B. pumilus* D5 存在 (2.0×10^2 CFU/ml, 6.1×10^2 CFU/g (Table 3)。水中 *B. pumilus* D5 的可能來源為添加在飼料中的 *B. pumilus* D5，經過白蝦攝食後進入肝胰腺，其中有一部分在肝胰腺定殖，另一部分隨著糞便排入缸內水中。Banerjee *et al.* (2010) 報導，在草蝦池中加入 *B. pumilus*，維持水中的 *B. pumilus* 菌量為 10^6 CFU/ml，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，實驗共進行 18 天；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 5×10^3 CFU/ml 及 $< 10^1$ CFU/ml，試驗組草蝦池水中弧菌量顯著低於對照組 ($p < 0.05$)。

本研究白蝦分別餵飼對照組及試驗組飼料第 10 天時，池水中弧菌數分別為 2.6×10^3 及 5.7×10^2 CFU/ml。而 Banerjee *et al.* (2010) 報導，草蝦池中加入 *B. pumilus*，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，Banerjee *et al.* (2010) 的報告中，草蝦池中加入 *B. pumilus*，對於池水中弧菌數的降低效果似乎較本研究佳，原因有待探討。

原酚氧化酶系統在缺乏後天免疫系統的甲殼類中，具有重要的外來物識別及免疫防禦功能 (Cerenius and Söderhäll, 2004)。平時該系統中的因子以非活化的狀態存在於血球細胞中，而當外源性物質進入蝦體時就會引發一系列反應，活化酚氧化酶，酚氧化酶能催化一系列的代謝物質，最後聚合成黑色素，黑色素能沉積到外源物上，通過包被和黑化將外源物限制與隔離，此反應中間代謝物與黑色素也具有抑制細菌及微生物的功能 (Söderhäll and Cerenius, 1998)，因此，酚氧化酶活性常被做為蝦類免疫指標之一 (Liu *et al.*, 2006)。本研究試驗組蝦血液中酚氧化酶活性在病原菌攻擊前後，餵飼添加 *B. pumilus* D5 飼料組均顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。對照組在病原菌攻擊前後，其酚氧化酶活性顯著增加，但餵飼添加 *B. pumilus* D5 飼料組酚氧化酶活性卻增加不多，原因推測是白蝦在餵食添加 *B. pumilus* D5 飼料組後，酚氧化酶活性已增強至一個臨界高點，因此受病原菌攻擊後酚氧化酶活性增加不如對照組明顯。

呼吸爆為免疫細胞在吞噬且消除異物或病原

微生物時，引發大量耗氧以合成具有殺菌潛能的活性氧之反應，其中就包含超氧陰離子 (O_2^-)，在甲殼類先天免疫系統中亦扮演著重要的角色 (Bell and Smith, 1993; Muñoz *et al.*, 2000)。本研究試驗組蝦血液中呼吸爆在病原菌攻擊前顯著高於對照組 ($p < 0.05$)，但病原菌攻擊後試驗組與對照組呼吸爆則無顯著差別 ($p > 0.05$)，推測是本實驗帶有 EMS 特性之腸炎弧菌的毒性太強，遠超過白蝦的細胞性防禦機制所能承受的範圍，使得吞噬細胞的效能一時無法有效回復，而呈現較低狀態，所以試驗組與對照組之呼吸爆並沒有明顯差異。

Wu *et al.* (2014) 報導，將分離自海洋泥蟹 (*Scylla paramamosain*) 的 *B. pumilus* 添加在泥蟹餌料中 (10^5 CFU/g)，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，投餵泥蟹 30 天，再浸泡腸炎弧菌 (10^5 CFU/ml) 48 hr 後發現，對照組及試驗組的呼吸爆分別為 0.02 及 0.04，試驗組的呼吸爆有較高的現象 ($p < 0.05$)。Sun *et al.* (2010) 報導，將 *B. pumilus* 添加於飼料中 (10^8 CFU/g)，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，進行餵食點帶石斑後，試驗組血清中溶菌酶活性較對照組高 34.7% ($p < 0.05$)，試驗組血清中吞噬細胞之吞噬活性較對照組高 48.5% ($p < 0.05$)。

本研究試驗組白蝦血液中免疫指標-酚氧化酶活性及呼吸爆均高於對照組 ($p < 0.05$)；而 Sun *et al.* (2010) 及 Wu *et al.* (2014) 報導，分別投餵添加 *B. pumilus* 的餌料予泥蟹與點帶石斑，試驗組的呼吸爆、溶菌酶活性及吞噬細胞之吞噬活性等免疫指標均較對照組高，本研究餵食添加 *B. pumilus* 的餌料有助於提升白蝦之呼吸爆及酚氧化酶活性等免疫指標的特性與 Sun *et al.* (2010) 及 Wu *et al.* (2014) 一致。

本研究白蝦試驗組以腸炎弧菌攻擊前後，血液中唐氏綜合症細胞黏附分子基因相對表現量均高於對照組 ($p < 0.05$)。唐氏綜合症細胞黏附分子基因屬於免疫血球蛋白大家族 (immunoglobulin superfamily, IgSF) 的一員，可通過 RNA 選擇性剪接 (alternative splicing) 不同組合的外顯子 (Exon) 形成多種不同唐氏綜合症黏附分子亞型 (Chou *et al.*, 2009)。Watson *et al.* (2005) 發現，如果將果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 體內的唐氏綜合症細胞黏附分子蛋白質以相對之抗體拮抗其作用，血球細胞的噬菌作用 (phagocytosis) 會被抑

制；Wattanasurorot *et al.* (2011) 研究發現，在淡水小龍蝦 (*Pacifastacus leniusculus*) 分別注射大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，可以選擇性地誘導產生大量不同系列的唐氏綜合症黏附分子亞型，以促進吞噬特定細菌菌種，因此推測唐氏綜合症細胞黏附分子基因除了在甲殼類先天免疫中有著重要的功能外，也可能具有類後天免疫的特性 (Wattanasurorot *et al.*, 2011)。

Wu *et al.* (2014) 報導，將 *B. pumilus* 添加在泥蟹餌料中 (10^5 CFU/g)，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，投餵泥蟹，再浸泡腸炎弧菌 (10^5 CFU/ml) 48 hr 後發現，試驗組泥蟹之原酚氧化酶基因相對表現量在對照組及試驗組分別為 1.5 及 4.1，在統計上，對照組及試驗組的原酚氧化酶之基因相對表現量有顯著差異 ($p < 0.05$)。

本研究白蝦試驗組以腸炎弧菌攻擊前後，血液中唐氏綜合症細胞黏附分子及原酚氧化酶基因之相對表現量均高於對照組 ($p < 0.05$)。Wu *et al.* (2014) 報導，投餵泥蟹添加 *B. pumilus* 的餌料，再浸泡腸炎弧菌後，試驗組的原酚氧化酶基因之相對表現量有較對照組增高的現象。本研究的結果，餵食白蝦添加 *B. pumilus* D5 飼料可以增強原酚氧化酶相對表現量之情形與 Wu *et al.* (2014) 一致。

本研究白蝦飼料添加 *B. pumilus* D5 飼料 8 週，可能是以帶有 EMS 特性之腸炎弧菌攻擊，試驗組白蝦活存率 (20.01%) 不是很高，但仍然較對照組 (4.76%) 增加 11.32%，試驗組活存率較對照組提高約 3 倍。*B. pumilus* D5 具有抑制腸炎弧菌之能力 (朱等, 2015)，推測 *B. pumilus* D5 可以增強白蝦對於腸炎弧菌之抵抗力。Karim *et al.* (2013) 指出，將分離自美國羅德島海域海水之 *B. pumilus* 添加於牡蠣養殖池水中 (10^4 CFU/ml) 24 hr，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，再以塔氏弧菌 (*V. tubiashii*) 攻擊後，試驗組牡蠣之活存率 (45%) 較對照組 (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 *B. pumilus* 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，進而提高抵抗塔氏弧菌的能力。

Nguyen *et al.* (2014) 研究指出，將 *B. pumilus* 添加於飼料 (10^7 CFU/g) 投餵龍蝦，另以未添加 *B.*

pumilus 者為對照組，60 天後，以病原弧菌 *V. owensii* 進行浸泡攻擊。結果顯示，病原弧菌 *V. owensii* 攻擊後，對照組及試驗組龍蝦之活存率分別為 33.3% 及 60.0%，試驗組的龍蝦之活存率增加 26.7%，顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。Nguyen *et al.* (2014) 認為，該 *B. pumilus* 具有抑制腸炎弧菌及 *V. owensii* 的特性，可以增強試驗組龍蝦對於 *V. owensii* 之抵抗力。Wu *et al.* (2014) 報導，將 *B. pumilus* 添加在泥蟹餌料中 (10^5 CFU/g)，另以未添加 *B. pumilus* 者為對照組，投餵泥蟹，再浸泡腸炎弧菌 (10^5 CFU/ml) 48 hr 後發現，試驗組泥蟹的活存率 (76.67%) 較對照組 (54.88%) 提高 21.79% ($p < 0.05$)。

本研究白蝦飼料試驗組-添加 *B. pumilus* D5 飼料 8 週，以腸炎弧菌攻擊後，試驗組白蝦之存活率明顯較對照組增加 ($p < 0.05$)；本結果與 Karim *et al.* (2013)、Nguyen *et al.* (2014) 及 Wu *et al.* (2014) 將 *B. pumilus* 添加於牡蠣養殖池水、龍蝦飼料及泥蟹餌料，提升養殖生物遭受病原弧菌攻擊後之活存率的結果一致。

結 論

本研究結果顯示，白蝦飼料添加 *B. pumilus* D5 飼料 (10^7 CFU/g) 8 週後對白蝦成長之助益並不明顯。飼料添加 *B. pumilus* D5 飼料組缸內的水與白蝦肝胰腺中之弧菌數均較對照組為低。免疫指標方面，白蝦飼料添加 *B. pumilus* D5 飼料，血液中酚氧化酶活性、呼吸爆、唐氏綜合症細胞黏附分子及原酚氧化酶之基因相對表現量均明顯高於對照組。活存率方面，以腸炎弧菌攻擊後，試驗組蝦的活存率明顯高於對照組，顯示 *B. pumilus* D5 能有效提升白蝦對水產病原弧菌之抵抗力。

參考文獻

- 朱惠真, 黃美瑩, 劉旭展, 曾亮璋, 潘崇良, 張錦宜 (2016) 自海水魚蝦篩選抗水產病原弧菌之拮抗菌. 水產研究, 24(1): 37-50。
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and J. L. Múzquiz (2006) The role of probiotic in aquaculture. *Vet. Microbiol. Rev.*, 114: 173-186.
- 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.
- Bell, K. L. and V. J. Smith (1993) In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 211-219.
- Cerenius, L. and K. Söderhäll (2004) The prophenoloxidase - activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198(1): 116-126.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1): 156-159.
- Chou, P. H., H. S. Chang, I. T. Chen, H. Y. Lin, Y. M. Chen, H. L. Yang and K. C. Wang (2009) The putative invertebrate adaptive immune protein *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) is the first reported Dscam to lack a transmembrane domain and cytoplasmic tail. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(12): 1258-1267.
- Cook, M. T., P. J. Hayball, W. Hutchinson, B. Nowak and J. D. Hayball (2001) The efficacy of commercial β -glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 661-72.
- 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.
- Düğenci, S. K., N. Arda and A. Candan (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J. Ethnopharmacol.*, 88: 99-106.
- 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) FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053, 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.
- Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- 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 edn. 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.
- Kureshy, N. and D. A. Davis (2002) Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204(1), 125-143.
- Leaño, E. M. and C. V. Mohan (2012) Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Glob. Aquacult. Advocate*, July/August, p. 38-39.
- Leguerinel, I., O. Couvert and P. Mafart (2007) Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *Int. J. Food Microbiol.*, 114: 100-104.
- 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. *Glob. Aquacult. Advocate*, 15(1): 40.
- Liu, C. H., S. T. Yeh, S. Y. Cheng and J. C. Chen (2004) The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish Shellfish Immunol.*, 16(2): 151-61.
- Liu, C. H., S. P. Yeh, C. M. Kuo, W. Cheng and C. H. Chou (2006) The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: activity and gene transcription. *Fish Shellfish Immunol.*, 21(4): 442-452.
- Luis-Villasenor, I. E., T. Castellanos-Cervantes, B. Gomez-Gil, Á. E. Carrillo-García, A. I. Campa-Córdova and F. Ascencio (2013) Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World J. Microb. Biotechnol.*, 29 (2): 257-265.
- Munõz, M., R. Cedenõ, J. Rodriguez, W. P. W. Van der Knaap, E. Mialhe and E. Bache`re (2000) Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocyte of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191: 89-107.
- Nair, A. V., K. K. Vijayan, K. Chakraborty and M. L. 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.
- Pick, E. and D. Mizel (1981) Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, 46: 211-226.
- Ruangpan, L. and T. Kitao (1991) *Vibrio* bacteria isolated from the black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish Dis.*, 14: 383-388.
- SAS (1988) *SAS User's Guide: basic Statistical Analysis*. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- 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.
- Secombes, S. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In* *Techniques in fish immunology* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. D. van Muiswinkel eds), SOS Publications, Fair Haven, NJ, 137-154.
- Sirikharin, R., S. Taengchaiyaphum, K. Sritunyalucksana, S. Thitamadee, T. W. Flegel and R. Mavichak (2014) A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. http://www.enca.org/modules/news/article.php?article_id2030&title

- new-pcr-detection-method-for-ahpnd.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius (1998) Role of the prophenoloxidase – activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(1): 23-28.
- 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.
- Stasiack, A. S. and C. P. Bauman (1996) Neutrophil activity as a potent indicator for concomitant analysis. *Fish Shellfish Immunol.*, 6: 537-539
- 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.
- 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.
- Trinidad, E. M., M. Ballesteros, J. Zuloaga, A. Zapata and L. M. Alonso-Colmenar (2009) An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood*, 114(24): 5081-5090.
- 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, World Aquaculture Society*, 651.
- 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.
- Watson, F. L., R. Püttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo, V. I. Rebel and D. Schmucker (2005) Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309(5742): 1874-1878.
- Wattanasurorot, A., P. Jiravanichpaisal, H. Liu, I. Söderhäll and K. Söderhäll (2011) Bacteria-induced Dscam isoforms of the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *PLoS Pathol.*, 7(6): e1002062.
- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39: 75-85.
- 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.

Effects of Probiotic *Bacillus pumilus* D5 In-feed on Growth Performance, Immune Response, and Efficiency of Resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Mei-Ying Huang¹, Huei-Jen Ju^{1*}, Li-Hao Chen¹, Hsu-Chan Liu¹, Liang-Wei Tseng¹,
Chorng-Liang Pan² and Chin-I Chang³

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

³ Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The use of microbial control strategies helps to control vibriosis, a disease that has long imposed a major threat to aquaculture industries. In this study, white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were fed a diet supplemented with *Vibrio*-antagonistic *Bacillus pumilus* D5 at concentration of 10^7 CFU/g for 8 weeks. No significant improvements of percent weight gain and feed efficiency were observed ($p > 0.05$). However, the numbers of *Vibrio* spp. in the tank water and hepatopancreas of the shrimp at day 10 were significantly lower in the experimental group (5.7×10^2 CFU/mL, 7.3×10^4 CFU/g) than in the control group (2.6×10^3 CFU/mL, 3.8×10^5 CFU/g) ($p < 0.05$). With regard to the immunity indicators, at week 8, the phenoloxidase activity and respiratory burst of white shrimp fed with the experimental diet (0.315, 0.566) were significantly higher than those of shrimp fed with the control diet (0.111, 0.380) ($p < 0.05$). The phenoloxidase activity of white shrimp after challenge with *Vibrio parahaemolyticus* was significantly higher in the experimental group (0.326) than in the control group (0.257) ($p < 0.05$). With regard to immune-related genes, the relative gene expression of Down syndrome cell adhesion molecule and prophenoloxidase before and after challenge with *V. parahaemolyticus* was significantly higher in white shrimp fed with the experimental diet (26.72, 4.83) than that in shrimp fed with the control diet (5.46, 1.60) ($p < 0.05$). The survival rate of white shrimp after challenge with *V. parahaemolyticus* was significantly higher in the experimental group (16.08%) than in the control group (4.76%) ($p < 0.05$). Overall, the results of this study indicated that *B. pumilus* D5 can decrease the numbers of *Vibrio* spp. in the tank water and hepatopancreas of white shrimp and enhance immune response and resistance to vibriosis infection in white shrimp.

Key words: probiotic *Bacillus pumilus*, white shrimp, growth, immunity, disease 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: jhjen@mail.tfrin.gov.tw