

應用 NTG-UV 複合誘變法開發弧菌拮抗菌 *Bacillus pumilus* D5 之突變菌株

朱惠真¹·黃美瑩²·許晉榮³·張錦宜⁴·吳豐成¹·鄧晶瑩^{5*}

¹行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

²行政院農業委員會水產試驗所海洋漁業組

³行政院農業委員會水產試驗所企劃資訊組

⁴行政院農業委員會水產試驗所

⁵新竹縣家畜疾病防治所

摘 要

不論是野生魚種或是養殖魚種，弧菌性疾病一直以來都是世界性的重大威脅，也是高密度養殖發展的重要限制因子。本研究之弧菌拮抗菌是分離自白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 的短小芽孢桿菌 D5 (*Bacillus pumilus* D5) 菌株，具有抑制腸炎弧菌、溶藻弧菌及哈維氏弧菌的能力。為了提高 *B. pumilus* D5 菌株的抑菌效果，本試驗利用紫外線突變法、亞硝基弧 (Nitrosoguanidine, NTG) 突變法以及紫外線與亞硝基弧共同誘變法突變 *B. pumilus* D5 菌株，目標是得到抗弧菌能力優於 *B. pumilus* D5 之突變菌株。突變的結果顯示：在三次篩選過程中最後得到四種突變細菌 *B. pumilus* NG24、*B. pumilus* NG25、*B. pumilus* UV35 及 *B. pumilus* UV37，其對腸炎弧菌及哈維氏弧菌的抑菌圈直徑均和 *B. pumilus* D5 有顯著性差異 ($p < 0.05$)。在共培試驗中，在腸炎弧菌和 *B. pumilus* D5 或其突變菌株濃度為 10^2 CFU ml⁻¹ 與 10^7 CFU ml⁻¹ 的比例培養 48 hr 後，發現各拮抗菌均有抑制弧菌生長的能力 ($p < 0.05$)，其中又以 NG25 的效果最佳。總括來說，*B. pumilus* D5 和其突變菌之接種濃度需高於弧菌 10^5 倍才可以抑制腸炎弧菌的生長，期許能應用本突變菌株控制養殖池水弧菌生長量進而提高本拮抗菌之發展潛力。

關鍵詞：突變作用、亞硝基弧、紫外線、短小芽孢桿菌、弧菌、抗菌能力

前 言

弧菌在養殖的環境中非常易見，研究顯示弧菌屬 (*Vibrio*) 所包含的菌種品系多達 70 多種，可以有無嗜鹽性的特性做為區分的標準；其中會影響人類健康的菌種包括霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 以及創傷弧菌 (*V. vulnificus*)，創傷弧菌是因生物體傷口感染而引發敗血症，其死亡率可達到 50% (Johnson *et al.*, 2012)。而會對水產養殖造成重大威脅的弧菌則包括：溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、腸炎弧菌及

哈維氏弧菌 (*V. harveyi*) 等，也是養殖蝦類細菌性疾病的主要病原 (Kokashvili *et al.*, 2015)。哈維氏弧菌廣泛的分布在海洋環境中，會引起眾多魚蝦疾病造成重大的經濟損失，目前知道可以控制哈維氏弧菌的有效方法包括使用五倍子、中草藥製劑及應用益生菌來進行防治 (李等, 2004)，其中又以乳酸菌做為微生物製劑在水產養殖中控制疾病最為有效。馬等 (2017) 指出從吳郭魚腸道中分離出的乳酸菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 能有效的抑制哈維氏弧菌、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及海洋分枝桿菌 (*Mycobacterium marinum*) 的生長。

在弧菌的肆虐中，又以腸炎弧菌引起的疾病災情最為嚴重 (Chatterjee and Halder, 2016)，2009

*通訊作者 / 302 新竹縣竹北市縣政五街 192 號, TEL: (03) 551-8101; E-mail: ycdeng153@gmail.com

年起於泰國、中國和越南等三大產蝦國相繼發生急性肝胰臟壞死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)，目前已確定知道會造成 AHPND 的弧菌主要是腸炎弧菌致病株，其致病的機制是來自於菌體中的質體 (pVPA3-1)，此質體帶有能夠產生 Pir-like A (ToxA) 及 Pir-like B (ToxB) 等二種毒素蛋白質的基因，當這二種蛋白質同時存在時，即會誘發出養殖白蝦的急性肝胰臟壞死病的病徵，而造成白蝦大量死亡 (Han *et al.*, 2015)。有研究報告指出 (Reyes *et al.*, 2016, 2017)，以重組型的毒素 A 蛋白 (rToxA) 所製成的疫苗打入老鼠或魚的體內皆可以有效的刺激免疫系統的反應，並且可以抵抗腸炎弧菌的感染。

自 1928 年盤尼西林問世，隨著醫學的發展迅速，抗生素 (antibiotic) 的濫用儼然成為一個很重要的議題 (Abdulah, 2012)。在過去數十年間，當水產生物爆發細菌感染時，養殖業者最常使用的便是抗生素 (付等, 2008)。少部分的抗生素雖可以促進生物體的成長 (胡, 2006)，但大多數的抗生素種類僅能應用於人類藥物治療上 (Kathleen *et al.*, 2016)。抗生素濫用會導致抗藥性的菌株出現，來自養殖場的抗藥性細菌則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，因此必須尋找取替代抗生素的其它物質或方式來維持養殖生物及人類健康，益生菌 (probiotic) 則為眾多抗生素取代方案中的一項。益生菌可定義為舉凡在有機體適當攝取後能對其產生有益作用的微生物均可稱之，隨著分子生物學的迅速發展，目前確知益生菌負有抗微生物的活性、增強生物屏障功能、免疫調節功能以及調節腸道的神經系統等功能，其主要的抗菌機制為：在水域環境中能和有害菌競爭生長繁殖所需要的營養鹽、並分泌有抑菌性的物質 (Salysers and Whitt, 2002)、產生乳酸和脂肪酸等代謝物質或利用靜電吸附與水流的作用與病原菌進行著位點的競爭，進而形成一道防止病原菌入侵的屏障 (Westerdahl *et al.*, 1991; 趙等, 2012)。目前已發表的報告中，發現 *B. pumilus* 會分泌一種非蛋白質的抑菌物質，此物質會將弧菌的細胞膜穿孔，隨之細胞膜發生皺褶，最後導致細胞膜溶解而使弧菌死亡 (蘇等, 2010; Gao *et al.*, 2017)。若想要提高益生菌的抑菌能力，最快速而有效的方法便是

細菌突變；突變法主要是用來研究基因調控、蛋白質功能和細菌生理及毒性的工具，自 1980 年迄今突變的方法不勝枚舉，主要有跳躍子 (transposons) 突變、化學物質突變及紫外線誘導突變。而化學突變劑的種類包括有烷化劑類 (alkylating agents)、鹼基類似物 (base analogs)、脫氨基誘變劑 (deamination mutagens) 和其它如重金屬、抗生素等藥劑，其中又以烷化劑類最常被使用 (王等, 2002)。烷化劑類包括甲基磺酸乙酯 (EMS; ethyl methane sulfonate)、硫酸乙酯 (DES; diethyl sulfate) 及亞硝基弧 (NTG; N-methyl-N,-nitro-N-nitrosoguanidine) 等，其目的都是利用化學物質造成核苷酸的甲基化而產生點突變，逢機的突變導致功能性蛋白質的改變 (Bose, 2016)；而紫外線誘導突變則是因 UVB 對 DNA 分子的直接激發產生相鄰嘧啶產生二聚體反應 (T-T dimer) 或是紫外線通過直接輻射，產生活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 導致氧化壓力和改變 DNA 的修復機制，引起細胞和 DNA 損害 (Hironobu and Tetsuya, 2011)。

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。在之前的研究報告中已發現 *Bacillus pumilus* D5 菌株具有抑制腸炎弧菌、溶藻弧菌及哈維氏弧菌的能力 (朱等, 2016)，因此本研究將運用不同的突變方式以產生 *B. pumilus* D5 突變株，並探討此 *B. pumilus* D5 突變株之抑菌能力是否可以優於 *B. pumilus* D5，以期更有效的抑制上述弧菌生長。

材料與方法

一、菌株的分離、純化與保存

將 *B. pumilus* D5 及腸炎弧菌經適當稀釋，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 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恆溫箱中培養 48 hr，挑選菌落以額外添加 2% 氯化鈉之 TSA 進行分離純化三次，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基 (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) 去除上層液後, 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。

二、對不同水產病原弧菌之抗菌試驗

所測試之菌株包括三種水產病原弧菌: 溶藻弧菌、哈維氏弧菌及腸炎弧菌。抗水產病原弧菌之菌株及三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, 以生理食鹽水調整益生菌 *B. pumilus* D5 及其突變菌至 OD_{600nm} 為 0.4 (菌數約為 10⁸ CFU ml⁻¹), 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, 加入水產病原弧菌菌液混合均勻後調整為 10⁸ CFU ml⁻¹, 倒入培養皿中, 待 TSA 凝固後將鐵環拔除。在凹槽中加入 50 μl *B. pumilus* D5 或其突變菌之菌液。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 (cm)。

三、誘變菌株

(一) 紫外線誘變法

將冷凍保存之 *B. pumilus* D5, 加入 5 ml 新鮮配製之 TSB 培養基中活化, 置於 28°C 培養 24 hr 後, 用滅過菌之鈎菌環勾取些許菌液, 於新鮮之 2% 氯化鈉之 TSA 培養基上進行分離純化後, 勾取第三區的菌落, 於 2% 氯化鈉之 TSB 培養液及 28°C 下進行培養 24 hr, 將菌液濃度調整為 OD_{600nm} 為 0.4 (菌數約為 10⁸ CFU ml⁻¹), 先將紫外燈預熱 30 min 後, 將試管於 15 W 紫外燈下距離 20 cm 分別照射不同時間 (分別為 10、20、30、40、50、60、70 及 80 min), 照射完後的菌液置於暗處靜置 10 min, 取生理食鹽水將各試管的菌液分別稀釋 10⁴、10⁵ 及 10⁶ 倍後, 再各取出 0.1 ml 均勻塗抹於 2% 氯化鈉之 TSA 培養基上, 經培養 16 - 18 hr 後, 計算其死亡率及其突變率, 並挑取存活菌株進行抗菌環試驗。

(二) NTG 誘變法

將冷凍保存之 *B. pumilus* D5, 加入 5 ml 鮮配之 TSB 培養基中活化, 置於 28°C 培養 24 hr 後, 用滅過菌之鈎菌環勾取些許菌液, 於新鮮之 2% 氯化鈉之 TSA 培養基上進行分離純化後, 勾取第三區的菌落, 於 2% 氯化鈉之 TSB 培養液及 28°C 下進行培養 24 hr, 將菌液濃度調整為 OD_{600nm} 為 0.4, 將各菌液以 10,000 × g、4°C 下離心 10 min, 收集菌體加入 5 ml 的生理食鹽水均勻震盪, 再以 10,000 × g、10 min、4°C 的條件離心, 收集菌體後加入含 0.01 ppm NTG 之 TSB 培養液 (pH6.0) 並於 28°C 下培養, 經 1 hr、2 hr 及 3 hr 培養後回收菌液, 將菌液以 10000 × g、4°C、10 min 的條件離心, 收集菌體加入 5 ml 的生理食鹽水均勻震盪重複三次後, 以生理食鹽水去除掉殘留的 NTG, 最後一次離心後加入 5 ml 新鮮之 TSB 培養液, 取生理食鹽水將各試管的菌液分別稀釋 10⁴、10⁵ 及 10⁶ 倍後, 各取出 0.1 ml 均勻塗抹於含 2% 氯化鈉之 TSA 培養基上, 培養 16 - 18 hr 後計算其死亡率及其突變率, 並挑取存活菌株進行抗菌環試驗。

(三) 紫外線及 NTG 複合誘變法

將 *B. pumilus* D5 於 2% 氯化鈉之 TSB 培養液及 28°C 下進行培養 24 hr, 將菌液濃度調整為 OD_{600nm} 為 0.4, 先將紫外燈預熱 30 min 後, 將試管於 15 W 紫外燈下距離 20 cm 照射最適時間 (紫外線照射之後益生菌死亡率於 60 - 80%) 後, 同上述亞硝基弧的誘變法, 於 3 hr 後回收菌液, 取生理食鹽水將各試管的菌液分別稀釋 10⁴、10⁵ 及 10⁶ 倍後, 各取出 0.1 ml 均勻塗抹於 2% 氯化鈉之 TSA 培養基上, 培養 16 - 18 hr 後計算其死亡率及其突變率, 並挑取存活菌株進行抗菌環試驗。

四、共同培養試驗

將 *B. pumilus* D5、*B. pumilus* NG24、*B. pumilus* NG25、*B. pumilus* UV35、*B. pumilus* UV37 及腸炎弧菌於 -80°C 冰箱取出後, 將之活化後於 2% 氯化鈉之 TSA 培養基上培養 16 - 18 hr, 取出單一菌落純化重複三次後, 再調整細菌濃度培養於 100 ml 2% 氯化鈉之 TSA 培養基, 並分成 12 組

試驗組，分別為腸炎弧菌 (10^3 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌 (10^2 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 *B. pumilus* D5 (10^3 CFU ml⁻¹; 10^6 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 NG24 (10^3 CFU ml⁻¹; 10^6 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 NG25 (10^3 CFU ml⁻¹; 10^6 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 UV35 (10^3 CFU ml⁻¹; 10^6 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 UV37 (10^3 CFU ml⁻¹; 10^6 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 D5 (10^2 CFU ml⁻¹; 10^7 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 NG24 (10^2 CFU ml⁻¹; 10^7 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 NG25 (10^2 CFU ml⁻¹; 10^7 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 UV35 (10^2 CFU ml⁻¹; 10^7 CFU ml⁻¹)、腸炎弧菌及 UV37 (10^2 CFU ml⁻¹; 10^7 CFU ml⁻¹)，每隔 3 hr 將菌液塗抹於弧菌的選擇性培養基上做腸炎弧菌總生菌數分析。選擇性培養基為含 2% 氯化鈉之弧菌顯色培養基 (CHROMagar™-vibrio)，在本選擇性培養基上腸炎弧菌為紫紅色菌落、創傷弧菌為藍綠色菌落而溶藻弧菌的菌落株為無色。

五、統計分析

實驗結果以三重複的平均值計算，不同處理組間先以 one-way ANOVA 分析，不同處理組間若差異達顯著水準 ($p < 0.05$)，再以鄧肯式多變域檢測 (Duncan's multiple range test) 進行組間平均值檢定。

結 果

一、紫外線誘變法

將已活化之 *B. pumilus* D5 置於 15W 紫外燈下距離 20 cm，分別照射不同時間後計算其死亡率，其結果如 Table 1，顯示紫外燈下誘變益生菌 10 - 80 min，可以使其死亡率由 53 - 100% 不等，其中紫外線誘變 20 min 時死亡率已達到 66%，而以紫外線誘變 30 min 時其死亡率則可達到 91%，因此推估最佳的突變率 (80%) 應介於紫外線誘變 20 - 30 min 之內，因此選取紫外線誘變平均時間 25 min 為最佳的突變時間。並以此突變條件下先行選取 91 株菌進行抗菌環試驗。整體而言，選取此 91 株菌在哈維氏弧菌抑菌環試驗中，結果有 35% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力優於 *B. pumilus* D5，有 37.5% 的突變益生菌其抑制弧菌的

能力低於 *B. pumilus* D5，另有 27.5% 的突變益生菌失去抑制弧菌的能力；在溶藻弧菌抑菌環試驗中，所挑選之 91 突變株菌完全沒有抑制溶藻弧菌的能力；在腸炎弧菌抑菌環試驗中，有 37.5% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力優於 *B. pumilus* D5，有 62.5% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力低於 *B. pumilus* D5。

Table 1 The mortality rate of *Bacillus pumilus* D5 caused by ultraviolet irradiation

UV irradiation time (min)	D5 mortality rate (%)
10	55.4 ± 1.4 ¹
20	64.8 ± 2.0
30	90.3 ± 0.8
40	91.7 ± 0.8
50	96.5 ± 0.3
60	97.8 ± 0.6
70	97.9 ± 0.3
80	99.8 ± 0.2

¹Data are mean±SD (n=3)

二、NTG 誘變法

以 0.01 ppm NTG 之 TSB 培養液 (pH6.0) 於 28°C 下培養，分別於不同時間後回收菌液並計算其死亡率，其結果如 Table 2，發現誘變 1hr 時死亡率為 7%、2 hr 死亡率為 46%、3 hr 死亡率為 59%、4 hr 死亡率為 60%，而誘變 5 hr 後死亡率為 60%，於此突變條件下選取 39 株突變菌進行抗菌環試驗。整體而言，此 39 株菌突變菌在哈維氏弧菌抑菌環試驗中，有 16.7% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力低於 *B. pumilus* D5，另有 83.3% 的突變益生菌失去抑制弧菌的能力；在溶藻弧菌抑菌環試驗中，此突變 39 株菌抑制弧菌的能力皆低於 *B. pumilus* D5；在腸炎弧菌抑菌環試驗中，有 3% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力優於 *B. pumilus* D5，有 97% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力低於 *B. pumilus* D5。

三、紫外線及 NTG 共同誘變法

在紫外線照射突變 25 min 的條件下，加入 0.01 ppm NTG 進行共同誘變，分別於不同時間後

回收菌液並塗抹於含 2% 氯化鈉之 TSA 上培養，24 hr 後計算其死亡率及其突變率，其結果如 Table 2，發現誘變 1 hr 的死亡率為 70%、2 hr 的死亡率為 86% 以及誘變 3 hr 死亡率可達 92%，於此突變條件下選取 40 株突變菌株進行抗菌環試驗。整體而言，選取此 40 株菌在哈維氏弧菌抑菌環試驗中，有 22.5% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力優於 *B. pumilus* D5，有 12.5% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力低於 *B. pumilus* D5，另有 65% 的突變益生菌失去抑制弧菌的能力；在溶藻弧菌抑菌環試驗中，此突變 40 株菌抑制弧菌的能力皆低於 *B. pumilus* D5；在腸炎弧菌抑菌環試驗中，有 20% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力優於 *B. pumilus* D5，有 67.5% 的突變益生菌其抑制弧菌的能力低於 *B. pumilus* D5，另有 12.5% 的突變益生菌失去抑制弧菌的能力。

Table 2 The mortality rate of *Bacillus pumilus* D5 treated with NTG and UV/NTG mutagenesis

Mutagenesis time (hr)	D5 mortality rate (%)	
	0.01 ppm NTG	0.01 ppm NTG after irradiated by UV for 25 mins
1	7	70
2	46	86
3	59	92
4	60	—
5	62	—

四、突變菌平均抑菌能力

選取以 UV 突變後的益生菌菌株 8 株 (命名為 UV12、UV13、UV18、UV19、UV20、UV35、UV37 及 UV39)，以及以 UV 和 NTG 共同誘變後的益生菌菌株 11 株 (命名為 NG4、NG13、NG14、NG15、NG16、NG21、NG24、NG25、NG28、NG34 及 NG35) 進行抑菌試驗，在哈維氏弧菌抑菌環試驗中，19 株突變菌平均抑菌環可達 1.64 ± 0.10 cm 與 *B. pumilus* D5 之平均抑菌環 (1.55 ± 0.12 cm) 有顯著性差異 ($p < 0.05$)；而在腸炎弧菌抑菌環試驗中，突變菌之平均抑菌環可達 1.68 ± 0.13 cm 與 *B. pumilus* D5 之平均抑菌環 (1.42 ± 0.18 cm) 有顯著性差異 ($p < 0.05$)。因此選取 19 株突變益生

菌中最強的四株細菌 NG24、NG25、UV35、UV37 進行抑菌環試驗結果如 Table 3，當哈維氏弧菌或腸炎弧菌菌液濃度調整為 10^6 CFU/ml⁻¹ 做抑菌試驗，並對抑菌環的大小進行統計，在信賴水準為 95% 的條件下，*B. pumilus* D5 之抑菌環和 NG24、NG25、UV35 均有顯著性差異 ($p < 0.05$)，腸炎弧菌抑菌環試驗中，當弧菌菌液濃度調整為 10^8 CFU/ml⁻¹ 做抑菌試驗，同樣對各菌抑菌環進行統計分析，在信賴水準 99% 的條件下，*B. pumilus* D5 之抑菌環和 NG24、NG25、UV35 及 UV37 皆有顯著性差異 ($p < 0.01$)，其中又以 NG25 及 UV35 對致病性弧菌有較高的抑制性 ($p < 0.001$) (Table 3)。

五、共同培養試驗結果

在腸炎弧菌和益生菌濃度為 1:1000 共培試驗中 (即腸炎弧菌與益生菌的濃度分別為 10^3 CFU ml⁻¹ 及 10^6 CFU ml⁻¹)，腸炎弧菌在單獨培養 3 - 48 hr 後其弧菌濃度可以由 3.20×10^5 CFU ml⁻¹ 提高至 2.90×10^8 CFU ml⁻¹，而在腸炎弧菌與其他益生菌共同培養的結果中，腸炎弧菌和 *B. pumilus* D5 的共培試驗培養 3 - 48 hr 後，腸炎弧菌的濃度為 $1.00 \times 10^5 - 2.97 \times 10^8$ CFU ml⁻¹；腸炎弧菌和 NG24 的共培試驗培養結果，腸炎弧菌的濃度為 $6.06 \times 10^4 - 2.60 \times 10^8$ CFU ml⁻¹；腸炎弧菌和 NG25 的共培試驗培養結果，腸炎弧菌的濃度為 $1.10 \times 10^5 - 2.56 \times 10^8$ CFU ml⁻¹；腸炎弧菌和 UV35 的共培試驗培養結果，腸炎弧菌的濃度為 $7.10 \times 10^4 - 2.14 \times 10^8$ CFU ml⁻¹，而腸炎弧菌和 UV37 的共培試驗培養結果是腸炎弧菌的濃度為 $2.00 \times 10^5 - 2.66 \times 10^8$ CFU ml⁻¹，結果顯示在相同的培養條件下，添加較低濃度的益生菌 *B. pumilus* D5 或突變後的益生菌，腸炎弧菌的生長不受到抑制 ($p > 0.05$) (Fig. 1)。

而在腸炎弧菌和益生菌濃度為 1:100000 共培試驗中 (即腸炎弧菌與益生菌的濃度分別為 10^2 CFU ml⁻¹ 及 10^7 CFU ml⁻¹)，腸炎弧菌在單獨培養 3 - 48 hr 後其濃度可以由 2×10^3 CFU ml⁻¹ 提高至 2.30×10^9 CFU ml⁻¹，而在腸炎弧菌與其他益生菌共同培養的結果中，腸炎弧菌和 *B. pumilus* D5 的共培試驗培養 3 - 48 hr 後，腸炎弧菌的濃度為 $8.00 \times 10^3 - 9.30 \times 10^5$ CFU ml⁻¹；腸炎弧菌和 NG24 的共培試驗培養結果，腸炎弧菌的濃度為 $8.00 \times 10^3 -$

Table 3 The diameters (mean±SD, in cm) of inhibition zones of 10^8 cfu/ml concentrations of *Bacillus pumilus* D5 and *B. pumilus* D5 mutants against 10^8 cfu/ml concentrations of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*, and 10^6 cfu/ml concentrations of *Vibrio harveyi*

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Bacillus pumilus</i> D5	0	1.53±0.19 ^a	1.89±2.07 ^a
Mutant <i>B. pumilus</i> NG24	0	1.73±0.12 ^b	2.03±0.23 ^b
Mutant <i>B. pumilus</i> NG25	0	1.74±0.14 ^b	2.05±0.19 ^b
Mutant <i>B. pumilus</i> UV35	0	1.75±0.11 ^b	2.04±0.23 ^b
Mutant <i>B. pumilus</i> UV37	0	1.65±0.17 ^b	1.97±0.21 ^{ab}

The lower-case letters denote significant differences in Duncan grouping ($p \leq 0.05$)

The sample size for each experimental group was thirty ($n=30$)

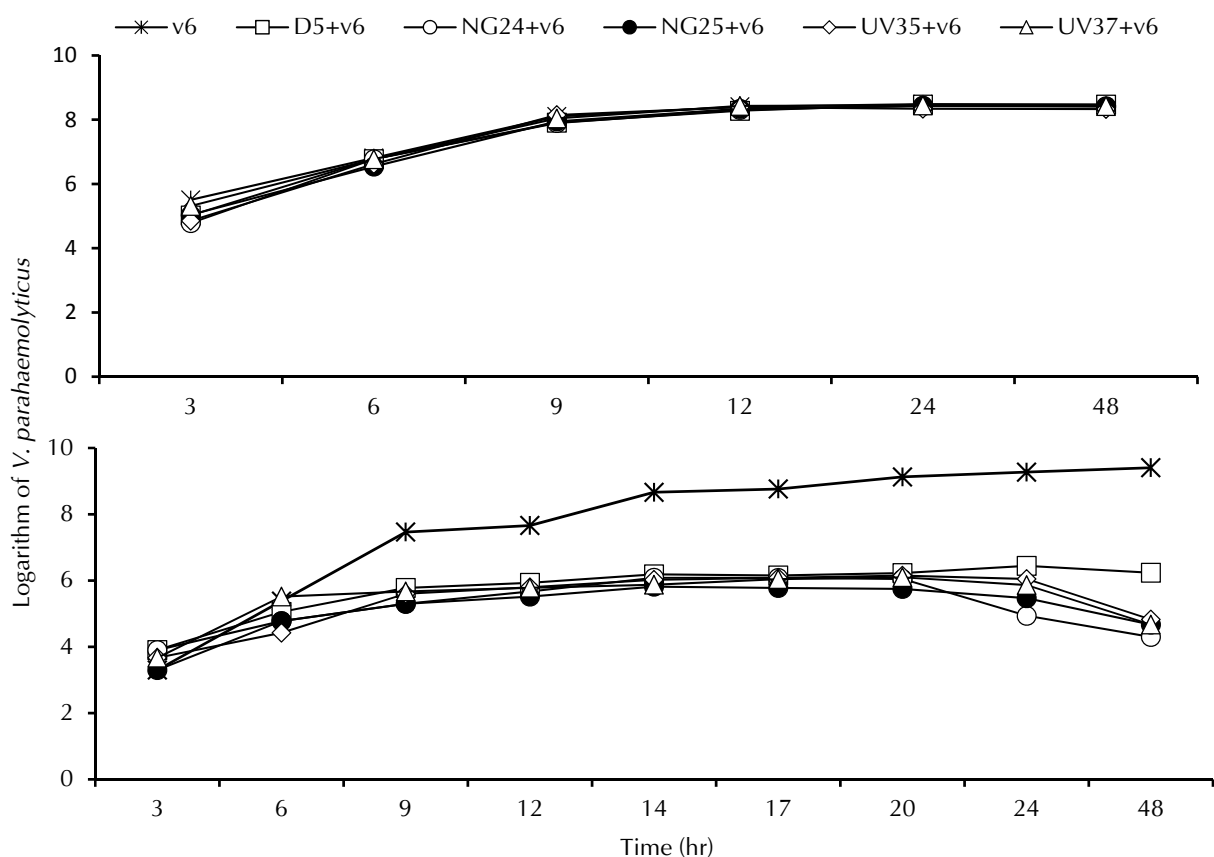


Fig. 1 Growth of *Vibrio parahaemolyticus* (v6), *Bacillus pumilus* (D5) with v6, mutant *B. pumilus* (NG24) with v6, mutant *B. pumilus* (NG25) with v6, mutant *B. pumilus* (UV35) with v6 and mutant *B. pumilus* (UV37) with v6 at ratios of (up) 1:1000 and (below) 1:100000 of initial inoculation. The X-axis=incubation time (hr), and the Y-axis is the concentration of bacteria.

5.40×10^3 CFU ml⁻¹；腸炎弧菌和 NG25 的共培試驗結果，腸炎弧菌的濃度為 $2.00 \times 10^3 - 3.20 \times 10^4$ CFU ml⁻¹；腸炎弧菌和 UV35 的共培試驗結果，腸炎弧菌的濃度為 $4.60 \times 10^3 - 4.70 \times 10^4$ CFU ml⁻¹；而腸炎弧菌和 UV37 的共培試驗結果是腸炎弧菌的濃度為 $4.60 \times 10^3 - 3.50 \times 10^4$ CFU ml⁻¹，顯示在相同的

培養條件下，添加高濃度 *B. pumilus* D5 或突變後的益生菌其弧菌的生長受到抑制 ($p < 0.001$) (Fig. 1) (Table 4)，同時也發現在各偵測時間點下，添加 D5 相較於 NG25 的弧菌生長量都有顯著差異 ($p < 0.05$)，顯示突變後的益生菌 NG25 對於抑制弧菌生長效果良好 (Table 4)。

Table 4 The analyses results for coculture tests of *V. parahaemolyticus* and *B. pumilus* D5 or the four mutant *B. pumilus* D5 strains, with those tests having been started at 1:100000 ratios of initial inoculation

Culture time (hr)	The <i>V. parahaemolyticus</i> concentration of six different coculture conditions (cfu/ml)					
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. pumilus</i> D5 with <i>V. parahaemolyticus</i>	Mutant <i>B. pumilus</i> NG24 with <i>V. parahaemolyticus</i>	Mutant <i>B. pumilus</i> NG25 with <i>V. parahaemolyticus</i>	Mutant <i>B. pumilus</i> UV35 with <i>V. parahaemolyticus</i>	Mutant <i>B. pumilus</i> UV37 with <i>V. parahaemolyticus</i>
3	(2.0±0.1 ^a)×10 ³	(8.0±0.1 ^b)×10 ³	(8.0±1.3 ^b)×10 ³	(2.0±0.1 ^b)×10 ³	(4.6±1.5 ^b)×10 ³	(4.6±0.8 ^b)×10 ³
6	(2.4±0.7 ^a)×10 ⁵	(1.1±0.5 ^b)×10 ⁵	(6.0±0.1 ^c)×10 ⁴	(6.0±0.5 ^c)×10 ⁴	(2.7±0.2 ^c)×10 ⁴	(3.2±0.2 ^a)×10 ⁵
9	(2.9±0.1 ^a)×10 ⁷	(6.0±0.2 ^b)×10 ⁵	(2.0±0.2 ^c)×10 ⁵	(1.1±0.2 ^c)×10 ⁵	(4.1±0.9 ^{bc})×10 ⁵	(4.7±1.9 ^b)×10 ⁵
12	(4.6±0.2 ^a)×10 ⁸	(8.5±1.1 ^b)×10 ⁵	(4.7±1.2 ^{cd})×10 ⁵	(3.2±1.1 ^d)×10 ⁵	(6.3±0.8 ^{bc})×10 ⁵	(6.1±1.5 ^{bc})×10 ⁵
14	(4.9±1.3 ^a)×10 ⁸	(1.5±0.2 ^b)×10 ⁶	(1.2±0.5 ^c)×10 ⁶	(6.5±0.2 ^c)×10 ⁵	(1.1±0.1 ^e)×10 ⁶	(7.5±0.1 ^d)×10 ⁵
17	(5.8±0.2 ^a)×10 ⁸	(1.4±0.2 ^b)×10 ⁶	(1.2±0.2 ^c)×10 ⁶	(6.0±0.2 ^d)×10 ⁵	(1.2±0.1 ^e)×10 ⁶	(1.1±0.1 ^e)×10 ⁶
20	(1.3±0.4 ^a)×10 ⁹	(1.7±0.1 ^b)×10 ⁶	(1.1±0.1 ^e)×10 ⁶	(5.6±0.2 ^d)×10 ⁵	(1.4±0.1 ^e)×10 ⁶	(1.3±0.1 ^d)×10 ⁶
24	(1.9±0.1 ^a)×10 ⁹	(2.8±0.1 ^b)×10 ⁶	(8.7±1.1 ^e)×10 ⁴	(3.0±0.3 ^e)×10 ⁵	(1.1±0.2 ^e)×10 ⁶	(9.4±1.2 ^d)×10 ⁵
48	(2.3±0.1 ^a)×10 ⁹	(9.3±0.2 ^b)×10 ⁵	(5.4±0.3 ^c)×10 ³	(3.2±1.1 ^e)×10 ⁴	(4.7±1.1 ^e)×10 ⁴	(3.5±1.2 ^e)×10 ⁴

Each value is a mean ± standard deviation (n=3). Different superscript letters in the same column indicate significantly different values ($p < 0.05$)

討 論

當水產養殖產業於世界各地蓬勃發展之際，造成養殖魚種越多就有相對更多的致病性弧菌被發現。在過去，弧菌性的疾病通常是使用著抗生素或是化學藥品來治療以控制疫情，因而造成了致病性弧菌對於常見的抗生素如安比西林 (ampicillin)、康新黴素 (amikacin)、康黴素 (kanamycin)、青黴素 G (penicillin G)、鏈黴素 (streptomycin) 和四環黴素 (tetracycline) 等抗生素產生了抗藥性 (Li *et al.*, 1999; Elmahdi *et al.*, 2016)。在目前現有的益生菌中，以牙孢桿菌以及乳酸菌的應用最為廣泛，在本研究中我們從白蝦的腸道中篩選出一株短小芽孢桿菌 (*Bacillus pumilus*)，其具有抗弧菌的功能。*B. pumilus* 所產生的抑菌物質不僅可以抵抗真菌類及細菌類疾病產生，也可以產生孢子型態通過腸道消化液，形成避免植物和動物被感染的優勢菌種。

利用紫外線及亞硝基弧突變細菌的研究不勝枚舉，但大多數的報告 (張等, 2008; 張, 2009; 涂等, 2010; 陳, 2015; 李等, 2016; 賈等, 2016) 皆指出利用亞硝基弧和紫外線的共同誘變可以達到最

好的效果，因此為了達到提高 *B. pumilus* D5 抗菌能力的目的，本研究利用突變細菌的方法來達成提高抗弧菌的功效。由本研究結果發現以紫外線突變平均可以得到 35% 的優勢突變菌種、以 NTG 突變平均只可獲得 8%、而以紫外線/NTG 共同誘變則可以有 21% 的突變優勢菌，本研究結果顯示紫外線突變及紫外線/NTG 共同誘變的方法對於 *B. pumilus* D5 突變是較為適合的。于等 (2006) 指出，以紫外線或是化學突變劑進行誘變時其挑選突變菌株之條件時，大約落在死亡率達 60-80% 的時間點下，而賈等 (2016) 在以 NTG 低劑量進行誘導細胞突變研究中發現，雖然死亡率低誘變量差但是會得到較多的正突變菌株，反之當使用高劑量 NTG 誘變細胞雖然誘變成功的細胞數增加，反而得到較少得正突變菌株，本研究中僅使用低劑量的 NTG 進行試驗，而在誘變進行 3-5 hr 間其死亡率並沒有顯著的改變，因此在共同誘變的試驗中選擇先以紫外線照射 *B. pumilus* D5 25 min 後，再將之浸泡於含 0.01 ppm 之 NTG 的培養基中進行 3 hr 的誘變。在突變菌的抑菌環試驗中，所篩選出的四株突變菌對於溶藻弧菌的濃度為 10⁸ CFU ml⁻¹ 時並無明顯的抑菌圈出現，而在腸炎弧菌

濃度為 10^8 CFU ml⁻¹ 下卻有明顯的抑菌圈出現，另在哈維氏弧菌的抑菌試驗則是要將細菌濃度下降至 10^6 CFU ml⁻¹ 其抑菌圈才有顯著性抑菌效果，由本研究結果發現 *B. pumilus* D5 及其突變菌株對於腸炎弧菌有較佳的抑制能力 (Fig. 2, Table 3)。

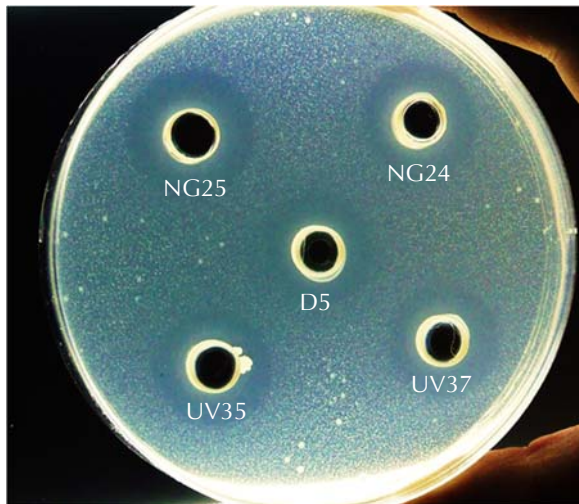


Fig. 2 The antagonistic activities of the *Bacillus pumilus* D5 strain (1.7 cm) and its mutants NG24 (2.25 cm), NG25 (2.35 cm), UV35 (2.0 cm) and UV37 (2.1 cm) against *Vibrio parahaemolyticus*.

另在突變菌的抑菌試驗中發現 3 株突變菌 *B. pumilus* NG24、*B. pumilus* NG25 及 *B. pumilus* UV35，無論是相較於腸炎弧菌或是哈維氏弧菌的抑菌測試，其平均抑菌圈和 *B. pumilus* D5 相較均有顯著性差異 ($p < 0.05$) (Table 3)，其中 *B. pumilus* NG25 相較 *B. pumilus* D5 對於腸炎弧菌或是哈維氏弧菌則有更顯著的抑菌能力 ($p < 0.01$)。其原因可能為 *B. pumilus* D5 及其突變菌皆對於腸炎弧菌有較高的敏感性，因此利用共培試驗來測試其應用性。許多研究顯示芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 的細菌有很多品系的菌株都能夠拮抗弧菌，如 *B. pumilus*、*B. indicus* 等 (蘇等, 2010; Nithya and Pandian 2010)，尤其以拮抗腸炎弧菌和哈維氏弧菌者居多。Wu *et al.* (2014) 利用三種芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis* DCU, *Bacillus pumilus* BP, *Bacillus cereus* HL7)，將其濃度調整為 10^5 CFU ml⁻¹ 後，分別添加於飼料中餵飼擬深穴青蟳 (*Scylla paramamosain*) 30 天，其腸炎弧菌的攻擊性試驗中，可以將擬深穴青蟳經腸炎弧菌攻擊後的存活

率由 54.88% 提高至 76.83%；Lee *et al.* (2017) 則指出利用 *Bacillus subtilis* WB60 10^8 CFU g⁻¹ 的菌液濃度添加入飼料中投餵日本鰻 (*Anguilla japonica*)，再以 *Vibrio anguillarum* 進行攻擊性試驗，添加 *Bacillus subtilis* 能有效提高日本鰻的存活率；Zhao *et al.* (2016) 發現每日投餵含 10^7 CFU g⁻¹ 的 *Bacillus cereus* EN25 的海藻粉狀飼料可提高仿刺蓼 (*Apostichopus japonicus*) 的總一氧化氮合酶活性 (total nitric oxide synthase activity)、吞噬細胞活性 (phagocytosis) 及呼吸爆指數 (respiratory burst activity)；而在黃等 (2016) 則也發現於飼料中添加濃度為 10^7 CFU ml⁻¹ *B. pumilus* D5，投餵 8 週可以抑制腸炎弧菌在腸道及水中的濃度，也可提高白蝦血液中酚氧化酶 (phenoloxidase) 活性及呼吸爆指數。在本研究中也發現，當利用以腸炎弧菌和益生菌濃度分別為 10^3 CFU ml⁻¹ 與 10^6 CFU ml⁻¹ 的比例培養下，無論是 *B. pumilus* D5 或是突變益生菌皆沒有抑制弧菌生長的能力，在腸炎弧菌和 *B. pumilus* D5 濃度為 10^2 CFU ml⁻¹ 與 10^7 CFU ml⁻¹ 的比例培養 48 hr，*B. pumilus* D5 或是突變益生菌皆可有效抑制弧菌生長的能力 ($p < 0.01$)，其中又以 NG25 的效果最佳，同時可以將腸炎弧菌的濃度抑制至 10^3 CFU ml⁻¹ 至 10^5 CFU ml⁻¹，其次為 NG24；另本研究的共培試驗的結果與黃等 (2016) 白蝦試驗的結果一致，在 48 hr 內可以完全抑制腸炎弧菌生長，在高比例的益生菌控制下，弧菌的生長可以受到抑制。由本試驗證實應用本突變平台可有效產生高抑菌性的益生菌。

結 論

本研究之 *B. pumilus* D5 是自白蝦所分離出之菌株為抗水產病原弧菌的拮抗菌，可應用在預防疾病的效力優於治療。而本突變菌株平台不但能夠突變益生菌且促發正向的抑制效果，未來可以應用於水質中控制弧菌生長。因此 *B. pumilus* D5 突變菌株的開發或許可以有效的解決目前貝類養殖受到弧菌污染卻又無法用藥的困境，利用「以菌抑菌」之模式推行綠色養殖概念，以創造生產與生態雙贏的局面，展開永續養殖的另一章。

參考文獻

- 于鵬, 張藍威, 許倩, 韓雪 (2006) 亞硝基弧誘變選育丁二酮高產菌株. 乳亞科學與技術, 5: 218-220.
- 王付轉, 梁秋霞, 李宗傳, 王雁萍, 吳健 (2002) 誘變和篩選方法在微生物育種中的應用. 洛陽師範學院報, 2: 95-99.
- 付保榮, 曹向宇, 冷陽 (2008) 光合細菌對水產養殖水質和水生生物的影響. 生態科學, 27(2): 102-106.
- 朱惠真, 黃美瑩, 劉旭展, 曾亮璋, 潘崇良, 張錦宜 (2016) 自海水蝦篩選抗水產病原弧菌之拮抗菌. 水產研究, 24(1): 37-50.
- 李亞晨, 包永明, 呂建發 (2004) 海洋水產動物弧菌病的生物防治. 食品科學, 38(8): 91-101.
- 李芬, 劉晨, 雪嬌, 張麗萍 (2016) 多種誘變法提高植物乳桿菌產苯乳酸能力的研究. 黑龍江八一農墾大學學報, 28(5): 68-72.
- 胡夢紅 (2006) 抗生素在水產養殖上的應用存在的問題及對策. 水產科技情報, 33(5): 217-211.
- 涂璇, 周雲, 葉榮華, 涂國全 (2010) NTG-LiCl複合誘變選育鏈黴菌702菌株. 江西農業大學學報, 32(4): 808-812.
- 馬歡歡, 呂欣然, 林洋, 白風翎, 勵建榮 (2017) 海水魚腸道源性抗哈維氏弧菌乳酸菌的篩選與鑒定. 食品科學, 38(8): 96-101.
- 張卓, 王德良, 傅力, 王輝 (2008) 優化亞硝基弧(NTG)誘變條件選育低產蛋白酶A菌株的研究. 釀酒, 35: 88-90.
- 張春鈴 (2009) 紫外線與亞硝基弧複合誘變選育高產海藻糖菌株的研究. 食品科學, 30: 188-191.
- 陳婕 (2015) 用於發酵黃耆的益生菌株FGM誘變選育及突變株特性研究. 中國農業科學院碩士論文, 中國.
- 黃美瑩, 朱惠真, 陳力豪, 劉旭展, 曾亮璋, 潘崇良, 張錦宜 (2016) 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. 水產研究, 24(2): 57-69.
- 賈佳, 林智, 曾密, 李慧, 張謙, 王劍英, 郭宏濤 (2016) 產脂肪酶黑曲霉原生質體NTG誘變研究. 中國飼料, 15: 9-15.
- 趙東, 徐桂芳, 邵曉平 (2012) 益生菌的作用機制. 國際消化病雜誌, 2012(32): 71-73.
- 蘇浩, 劉明泰, 鮑相渤, 張艷, 王志松 (2010) 芽孢桿菌對弧菌的抑制作用及其應用. 水產科學, 29(7): 412-415.
- Rizky, A. (2012) Antibiotic Abuse in developing countries. *Pharmaceut. Reg. Affairs* 1: e106. DOI: 10.4172/2167-7689.1000e106.
- Bose, J. L. (2016) Chemical and UV mutagenesis. *Methods Mol. Biol.*, 1373: 111-115.
- Chatterjee S. and S. Haldar (2016) *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Marine Sci. Res. Dev.* S 1: 002. DOI: 10.4172/2155-9910.S1-002.
- Elmahdi, S, L. V. DaSilva and S. Parveen (2016) Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. *Food Microbiol.*, 57: 128-134.
- Gao, X. Y., Y. Liu, L. L. Miao, E. W. Li, T. T. Hou and Z. P. Liu (2017) Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express*, 7(23): 1-10. DOI: 10.1186/s13568-017-0323-3.
- Han, J. E., K. F. Tang, L. H. Tran and D.V. Lightner (2015) Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aqua. Org.*, 113: 33-40.
- Hironobu, I. and O. Tetsuya (2011) The Mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res.*, 52(2): 115-125.
- Johnson, C. N., J. C. Bowers, K. J. Griffith, V. Molina, R. W. Clostio, S. Pei, E. Laws, R. N. Paranjpye, M. S. Strom, A. Chen, N. A. Hasan, A. Huq, N. F. Noriega III, D. J. Grimes and R. R. Colwell (2012) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(20): 7249-7257.
- Kathleen, M. M., L. Samuel, C. Felecia, E. L. Reagan, A. Kasing, M. Lesley, S. C. Toh (2016) Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo. *Int. J. Microbiol.*, 2016: Article ID 2164761, 9 pages. DOI: 10.1155/2016/2164761.
- Kokashvili, T, C. A. Whitehouse, A. Tskhvediani, C. J. Grim, T. Elbakidze, N. Mitaishvili, N. Janelidze, E. Jaiani, B. J. Haley, N. Lashkhi, A. Huq, R. R. Colwell and M. Tediashvili (2015) Occurrence and diversity of clinically important vibrio species in the aquatic environment of Georgia. *Front Public Health*, 13(3): 232. DOI: 10.3389/fpubh.2015.00232..
- Lee, S., K. Katya, Y. Park, S. Won, M. Seong, A. Hamidoghli and S. C. Bai (2017) Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance

- in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Shellfish Immunol., 61: 201-210.
- Li, J., J. Yie, R. W. T. Foo, J. M. L. Ling, H. Xu and N. Y. S. Woo (1999) Antibiotic resistance and plasmid profiles of *vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. Mar. Pollut. Bull., 39: 245-249.
- Nithya, C., and S. K. Pandian (2010) The *in vitro* antibiofilm activity of selected marine bacterial culture supernatants against *Vibrio* spp. Arch. Microbiol., 192(10): 843-854.
- Reyes-Becerril, M., G. Crystal, C. F. Dinan, A. Carlos and E. M. Ángeles (2017) Enhancing gilthead seabream immune status and protection against bacterial challenge by means of antigens derived from *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol., 60: 205-218.
- Reyes-Becerril, M., M. Maldonado-Garcia, G. Crystal, L. Amalia, R. M. Sergio, A. Felipe, H. Ikuo and A. Carlos. (2016) Evaluation of ToxA and *Vibrio parahaemolyticus* lysate on humoral immune response and immune-related genes in Pacific red snapper. Fish Shellfish Immunol., 56: 310-321.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002) Bacterial Pathogenesis, a Molecular Approach. ASM Press, Washington DC, 323-326.
- Westerdahl, A., J. C. Olsson, and S. Kjelleberg (1991) Isolation and characterization of turbot associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol., 57(2): 2223-2228.
- 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(2): 156-162.
- Zhao, Y., L. Yuan, J. Wan, Z. Sun, Y. Wang and H. Sun (2016) Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish Shellfish Immunol., 49: 237-242.

Using UV/NTG Mutagenesis to Develop *Bacillus pumilus* D5 Mutants with High Anti-*Vibrio* Abilities

Huei-Jen Ju¹, Mei-Ying Huang², Jinn-Rong Hseu³, Chin-I Chang⁴,
Feng-Cheng Wu¹ and Ching-Ying Deng^{5*}

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute

³Planning and Information Division, Fisheries Research Institute

⁴Fisheries Research Institute

⁵Hsinchu County Animal Disease Control Center

ABSTRACT

Vibriosis, a collective *Vibrio* infection, is a widespread epizootic disease that affects most wild and farmed fish species worldwide, and is currently the major limiting factor in the development of intensive mariculture industry. In our previous study, we found that a *Bacillus pumilus* strain, D5, isolated from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exhibited antibacterial ability against *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*. In order to get mutants with higher antibacterial abilities, the *B. pumilus* D5 strain was irradiated with ultraviolet (uv) radiation and treated with nitrosoguanidine (NTG). After three screenings, four mutant strains named *B. pumilus mutant* NG24, NG25, UV35 and UV37 were selected. The experimental results showed that the average bacteria inhibition zones against *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* of these four mutant strains provide significantly higher inhibition than *B. pumilus* D5 ($p < 0.05$). In a co-culture test, the *B. pumilus* D5 strain and its mutants suppressed the growth of *V. parahaemolyticus in vitro* only if the initial inoculum of the given strain was up to 100000 times higher than the inoculum of *V. parahaemolyticus*. Furthermore, *B. pumilus* NG25 showed higher antagonistic abilities against pathogenic *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* than *B. pumilus* D5 ($p < 0.05$). These study results reveal that the *B. pumilus* D5 mutants have potential applications for controlling pathogenic *Vibrio* spp. in aquaculture practices.

Key words: mutagenesis, nitrosoguanidine, ultraviolet, *Bacillus pumilus*, *Vibrio*, antimicrobial activity

*Correspondence: Hsinchu County Government, No.10, Guangming 6th Rd., Zhubei City, Hsinchu County 30210, Taiwan. TEL: (03) 551-8101; E-mail: ycdeng153@gmail.com