

點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 飼料中添加 益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與 葡聚糖產物對於魚隻抵抗病原菌之影響

黃美瑩¹ · 朱惠真^{2*} · 曾亮璋²

¹ 行政院農業委員會水產試驗所海洋漁業組

² 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘要

本研究探討點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 餵飼益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖對於魚隻腸道細菌數、糞便中短鏈脂肪酸、免疫指數及抵抗病原菌之影響。結果顯示，點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L.mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖飼料 8 週，試驗組魚隻腸道中弧菌數均較對照組為低。糞便中短鏈脂肪酸方面，點帶石斑於飼養第 4 及 8 週時，試驗組魚隻之糞便中總短鏈脂肪酸之含量均高於對照組。免疫指數方面，點帶石斑分別餵飼 5 種不同飼料，及以哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 攻擊後，試驗組魚隻血清中抗蛋白酶及溶菌酶活性均較對照組高 ($p < 0.05$)；而呼吸爆則以 (4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖組及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。點帶石斑分別餵飼 5 種不同飼料 8 週，以哈維氏弧菌攻擊後，以 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖及(5)添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組魚隻存活率最高，與對照組有明顯差異 ($p < 0.05$)。以上結果顯示，點帶石斑飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物，有助於提升魚隻抵抗病原菌的能力。

關鍵詞：點帶石斑、益生菌、異麥芽寡糖、葡聚糖、病原菌抵抗力

前言

世界水產品有 47% 來自水產養殖，而影響水產養殖產量的重要因素為疾病導致的大量損失。面對水產養殖生物遭受細菌感染威脅，養殖戶常使用抗生素加以預防與治療，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。目前有相當多的研究報告顯示，適當的使用益生菌 (probiotics) 及免疫激活物 (immunostimulants)，對於提升水產生物的養殖成效、疾病的預防與抵抗具有相當好的效果 (Hoseinifar *et al.*, 2018; Syed Raffic Ali and Ambasankar, 2018)。

益生菌通常定義為：用以提升宿主健康所使用的微生物，而水產用的益生菌尚包括可以改善水質的微生物 (Nayak, 2010)。水產上所使用益生菌的範圍較陸上動物為廣，而主要種類為芽孢桿

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02)2463-3101
轉 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjeng@mail.tfrin.gov.tw

菌類 (*Bacillus* spp.)、乳酸菌及酵母菌等 (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008)。水產的益生菌其功能包含下列幾項：增加營養及改進飼料消化性、提升生物免疫能力、與病原菌競爭進而排斥病菌、改善水質及抵抗病毒等。因此在水產養殖上使用益生菌可以 (1) 促進養殖生物成長、(2) 減少抗生素的濫用、(3) 降低養殖生物疾病之發生、(4) 增加抗病能力、(5) 減低死亡率及(6) 改善養殖環境 (Garriques and Arevalo, 1995; Gatesoupe, 1999; Tucker and Kennedy, 2001; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Nayak, 2010)。

魚類對於感染原的入侵會啟動非特異性及特異性的免疫防禦機制，尤其以非特異性的免疫更為重要。許多研究報告顯示，適當的使用免疫激活物可以增加非特異性及特異性的免疫反應，以增強魚隻的抗病能力，提高水產生物的養殖成效 (He *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2011)。一般免疫激活物主要包括益生菌、寡糖及聚糖等。報告指出，以聚糖及寡糖作為飼料添加物可有效增進魚蝦類的成長及免疫能力，如：聚葡萄糖 (glucan)、果聚糖 (levan)、脂多糖 (lipopolysaccharide)、幾丁質、幾丁聚糖及寡糖類可增強鯉魚 (*Cyprinus carpio*)、鰱魚 (*Seriola quinqueradiata*)、虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*)、野鯪 (*Labeo rohita*) 及斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 等水產生物之成長及對細菌性疾病的抵抗力 (Yano *et al.*, 1989; Matsuyama *et al.*, 1992; Jeney and Anderson, 1993; Itami *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1994; Geng *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008)。

合併使用益生菌及寡糖或聚糖，其所產生效益通常比二者單獨使用的效果更佳。飼料中添加甘露寡糖配合乳酸菌-糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)，可以增加虹鱒成長並活化免疫系統 (Rodriguez-Estrada *et al.*, 2009)。而牙鯪 (*Paralichthys olivaceus*) 飼餵含寡糖 (甘露寡糖、果寡糖) 及益生菌 (*Bacillus clausii*) 飼料後，對於成長及抗病力有加乘的效用 (Ye *et al.*, 2011)。飼料中添加果寡糖及 *B. subtilis* 不只提升大黃魚 (*Larimichthys crocea*) 的成長及飼料利用率，同時也提高疾病抵抗力 (Ai *et al.*, 2011)。而飼料中適量的幾丁聚糖及 *B. subtilis* 的添加，明顯提升海鱸 (*Rachycentron canadum*) 生長及抵抗病原菌感染的能力 (Geng *et al.*, 2011)。飼料添加商業的益生

菌+寡糖可增加虹鱒成長、活存率、血清總蛋白及白蛋白等，並能提升飼料效率 (Mehrabi *et al.*, 2012)。

異麥芽寡糖是一種 3 - 10 個單糖的寡糖，以 $\alpha(1-6)$ 糖苷鍵所連接，主要包括 isomaltose、panose、isomaltotetraose, isomaltopentaose 等，已知有多種微生物可以以分泌的葡聚糖蔗糖酶 (dextranucrase) 自蔗糖轉移 D-glucosyl 到接合的麥芽糖分子上，合成異麥芽寡糖 (Korakli and Vogel, 2006)。在日本與台灣異麥芽寡糖被用作為甜味劑已行之有年。少量異麥芽寡糖通常被發現在發酵的食品中，如味增、醬油等。現今的研究顯示，異麥芽寡糖對人體有著良好的保健功效，包括：改善便秘 (Liu *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001)、增加體內益生菌 - 雙歧桿菌 (*bifidobacteria*) 的數量 (Kohmoto *et al.*, 1988, 1991; Cheng *et al.*, 2000)、預防齲齒 (Hamada *et al.*, 1984; Kanno, 1990)、還原消化代謝產物 (如吡啶和對甲酚) (Liu *et al.*, 1994; Lin and Lee, 2005) 及降低血液中總膽固醇和三酸甘油酯 (Liu and Tsai, 1995; Wang *et al.*, 2001; Lin and Lee, 2005)。

家禽類攝食含有異麥芽寡糖的飼料，顯著地增加腸道內益生菌 - 雙歧桿菌，且減少壞菌 - 產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) (Zhang *et al.*, 2003; Chung and Day, 2004)。白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 分別餵食對照組及含有 *Bacillus* OJ + 異麥芽寡糖的飼料後，試驗組對於白斑病毒 (white spot syndrome virus) 的抵抗力顯著高於對照組 (Li *et al.*, 2009)。斑節蝦分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料後，以溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 進行攻擊感染，結果顯示試驗組的活存率顯著地高於對照組 (Zhang *et al.*, 2011)。

葡聚糖 (dextran) 是葡萄糖的聚合物，由葡聚糖蔗糖酶自蔗糖轉移 D-glucosyl 到接合的蔗糖分子上，產物為葡聚糖並放出果糖。其主要鍵結為 $\alpha(1-6)$ ，也可能有支鏈，其支鏈主要為 $\alpha(1-3)$ ，也有 $\alpha(1-4)$ 或 $\alpha(1-2)$ 的鍵結 (Korakli and Vogel, 2006)。依微生物的種類不同，所形成的葡聚糖分子量大小及結構可能不同 (Leathers, 2002)。目前有關葡聚糖的研究主要來自 *Leuconostoc mesenteroides*，尤其是 *L. mesenteroides* NRRC B-512F。

葡聚糖在食物加工上可當乳化劑、成型劑、穩定劑、增稠劑及風味攜帶劑等 (Aman *et al.*, 2012; Zannini *et al.*, 2016)。又，葡聚糖也具有身體保健方面的功效，包括含鐵的葡聚糖可增加缺鐵性貧血之病人對鐵的吸收、含硫酸基的葡聚糖可抗血液凝固，類似肝素 (heparin) 及含硫酸基的葡聚糖可作為抗人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 之藥物 (Blanshard and Mitchell, 1979; Alsop, 1983; Piret *et al.*, 2000)，此外，葡聚糖配合普魯蘭 (pullulan) 亦有助於骨骼修補及礦物化 (Schlaubita *et al.*, 2014)。

自肉製品分出的 *Lactobacillus sakei* MN1 及 *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 在含蔗糖之培養液中可以產生分子量大於 2×10^6 Da 的葡聚糖，該 2 種菌所產生的葡聚糖在 1 mg/ml 的濃度時，對於虹鱔的傳染性胰壞死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 及傳染性造血器官壞死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 均具有 50% 的抑制效果。動物試驗方面，餵食虹鱔予 *L. sakei* MN1 所產的葡聚糖 (50 μ g)，可以顯著降低虹鱔受 IPNV 及 IHNV 感染後的死亡率 (Nácher-Vázquez *et al.*, 2015)。此外，餵食鯉魚添加 0.2% Mito (含有 1 - 4% 葡聚糖) 的飼料，試驗組魚隻的成長明顯優於對照組 (Jaber and Masoumeh, 2017)。

研究發現，會產生葡聚糖與寡糖的乳酸菌主要為 *Lactobacillus* spp.、*Leuconostoc* spp.、*Streptococcus* spp. 及 *Weissella* spp. 等 (Leemhuis *et al.*, 2013)。此類乳酸菌在特殊醱類條件下，利用本身分泌的葡聚糖蔗糖酶生物合成葡聚糖與寡糖 (Korakli and Vogel, 2006)。*L. mesenteroides* 存在於許多水產生物的腸道中，具有抑制多種病原菌之功能，具備作為益生菌的特點。虹鱔、鮭魚 (Salmonids)、紋鱧 (*Channa striatus*)、尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 及白蝦腸道中均曾分離出 *L. mesenteroides* (Balcázar *et al.*, 2007a; Kosin and Rakshit, 2010; Allameh *et al.*, 2012; Desai, *et al.*, 2012; Zapata and Lara-Flores, 2013)。自鮭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 具有抑制 13 種產氣單胞桿菌屬 (*Aeromonas* spp.) 病原菌之效果 (Balcázaret *al.*, 2006a)。自虹鱔腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 會產生抗菌物質，具有抑制乳酸鏈球

菌 (*Lactococcus garvieae*) 之作用 (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。紋鱧腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，具有抑制親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、腐敗希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*) 及綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 之生長的效果 (Allameh *et al.*, 2012)。自吳郭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 具有抑制綠膿桿菌、戀臭假單胞菌 (*P. putida*)、哈維氏弧菌 (*V. harveyi*) 及海洋分枝桿菌 (*Mycobacterium marinum*) 之特性 (Zapata and Lara-Flores, 2013)。

黃等 (2017) 先前研究中述及自鱸魚腸道篩選出 *L. mesenteroides* B4，該菌在特殊醱類條件下會產生葡聚糖與寡糖；由於 *L. mesenteroides* 為許多水產生物腸道中常在菌之一，且具有抑制多種病原菌之功能 (Balcázar *et al.*, 2006a; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Allameh *et al.*, 2012; Zapata and Lara-Flores, 2013)；基於 *L. mesenteroides* 具有作為益生菌的特點，葡聚糖與寡糖有作為免疫激活物之特性，結合該菌及其聚糖與寡糖產物在水產養殖應該有良好的發展潛力，不過，目前文獻上有關此類組合於水產養殖的相關研究仍不多；Huang *et al.* (2017, 2018) 報導，*L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖之產物有助於增加白蝦成長、降低肝胰腺之弧菌數、提升免疫反應及提高白蝦在腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 攻擊後之存活率。先前黃等 (2018) 指出，點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 及異麥芽寡糖或葡聚糖有助於提升魚隻成長。本研究探討點帶石斑飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 及異麥芽寡糖或葡聚糖，對於石斑魚隻腸道細菌數、糞便中短鏈脂肪酸、免疫指數及抵抗病原菌之影響，以作為將來水產養殖應用之參考。

材料與方法

一、益生菌來源

具有合成葡聚糖及異麥芽寡糖能力之益生菌 - 乳酸菌 *L. mesenteroides* B4 係自大口黑鱸 (*Micropterus salmoides*) 腸道中分離篩選出來 (黃

等, 2017), 以 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS, Difco) 培養液培養。

二、實驗用飼料之製作

益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖之製備與實驗用飼料之製作請參閱黃等 (2018)。

益生菌 *L. mesenteroides* B4 產生異麥芽寡糖與葡聚糖之製備方式如下：將益生菌 *L. mesenteroides* B4 接種於含 10% 蔗糖及 10% 麥芽糖之 MRS 培養液，28°C 震盪培養 36 hr，可得到含有益生菌及異麥芽寡糖之培養液。益生菌 *L. mesenteroides* B4 接種於含 20% 蔗糖之 MRS 培養液，28°C 震盪培養 36 hr，得到含有益生菌及葡聚糖之培養液。益生菌菌數達 10^8 CFU/mL 以上，此益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖之培養液作為飼料中益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖的添加來源。

三、益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻之腸道細菌數影響

(一) 實驗動物

實驗所用之點帶石斑購自民間養殖場，蓄養於水產試驗所內循環 FRP 桶中 2 週，水溫維持在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

(二) 益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻之腸道細菌數影響

實驗共有 5 組，(1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料。取體型大小約 14 g 的魚 300 隻進行實驗，每缸 20 尾魚，每組進行 3 重複，隨機選取魚隻並放置於 15 座 82 L 大的玻璃缸。於每日上午 9 點及下午 5 點投餵飼料，投餵量為魚隻體重的 2.0%，實驗期間水溫控制在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ，試驗共進行 8 週。

魚隻餵食 5 組不同飼料 8 週，停止餵食 2 天後，每組分別採集 3 隻魚腸道混合後，進行總生菌、弧菌數及乳酸菌數量計算。將魚隻先予麻醉後，以酒精進行表面殺菌，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，秤重後剪成數小段，加入適量生理食鹽水稀釋後以均質刀充分打碎，適當稀釋後分別塗抹於含有 2.5% 氯化鈉之胰化蛋白大豆培養基 (tryptic soy agar, TSA, 購自 Difco) 及硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖洋菜培養基 (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS, 購自 Difco) 上面，於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 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。另將腸液樣品塗抹於含有 2.5% 氯化鈉之 MRS 固體培養基，於厭氧缸 (anaerobic jar, Oxoid Limited, Hampshire, UK) 內配合厭氧包 (generating packet, AnaeroPack · Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) 於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 96 hr 後計數菌落數，以計數乳酸菌數量 (Hoseinifar *et al.*, 2011)。

四、飼料中添加益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻糞便中短鏈脂肪酸之影響

動物試驗第 4 及 8 週時，收集各對照組及試驗組之魚隻糞便，經離心 ($5,000 \times g$ 、15 min)，收集上清液以 $0.22 \mu\text{m}$ 膜過濾後，再以 HPLC (Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 進行分析各短鏈脂肪酸 (乳酸、醋酸、丙酸、丁酸及異丁酸) 組成 (Kihara and Sakata, 1997)，檢測器為折射計 (Waters, 2414)，分離管柱為 IC9ep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., USA)，操作條件為流速 0.4 mL/min，移動相為 0.01 N 硫酸，管柱溫度為 65°C ，並以各短鏈脂肪酸 (乳酸、醋酸、丙酸、丁酸及異丁酸) 標準品 (Merck) 進行比對，分析後之圖譜以 Breeze 軟體 (Waters) 計算出滯留時間，對應各短鏈脂肪酸之標準曲線，換算成各組成含量，單位為 mM。

五、飼料中添加益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻之非特異性免疫反應之影響

魚隻分別餵食 5 組飼料 8 週及病原菌攻擊後 14 天，每組分別採集 9 尾魚隻之血液進行免疫指數分析。

(一) 血清採集

用 1 mL 塑膠針筒配 25G 針頭，自尾柄採集血液，將採得之血液於 4°C 靜置一夜後，離心 (3000 × g, 10 min, 4°C)，吸取上層血清，存放於 -80°C 冰櫃保存，用於血清溶菌酶活性及抗蛋白酶 (antiprotease) 活性等免疫指數分析。

(二) 採集血液分離白血球

參照何等(2013)方法，自石斑魚採集血液並分離白血球，用 1 mL 塑膠針筒配 25G 針頭自尾柄採集血液 0.7 mL，與 1 mL L-15 medium (內含 50 μL 125 mM EDTA) 混合，加入 4 mL 50% percoll (Sigma) 使其分層後，離心 (400 × g, 15 min, 4°C)，抽取分層之界面液體 2 mL 加入 3 mL Hank's balance salt solution (HBSS, Sigma)，離心 (600 × g, 10 min, 4°C) 及去除上清液，重複清洗步驟三次後，溶入 1 mL L-15 medium，以血球計數盤計算白血球濃度。所分離之白血球用於呼吸爆之測定。

(三) 免疫指數分析

1. 血清中抗蛋白酶活性測定

實驗參照 Bowden *et al.* (1997) 方法進行，並稍做修飾。先將 10 μL 血清與 35 μL 的 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液 [Trypsin bovine pancreas 溶於 0.01 M Tris-HCl (pH 8.2) 緩衝液] 混合，加入 500 μL 2 mM BAPNA (Sodium-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide HCl)，以 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) 緩衝液加至體積為 1 mL，於 28°C 反應 25 min；以 150 μL 的 30% 醋酸中止反應後，以盤式分光光度儀 (microplate spectrophotometer, Benchmark plus, Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA) 於波長 415 nm 下測定吸光值。血清中抗蛋白酶活性係以抑制胰蛋白酶百分比 (percentage trypsin inhibition) 表示，由下列公式計算：

$$\text{抑制胰蛋白酶百分比} = \frac{(\text{空白組胰蛋白酶的吸光值} - \text{樣品的吸光值})}{\text{空白組胰蛋白酶的吸光值}} \times 100\%$$

2. 溶菌酶 (lysozyme) 活性測定

實驗參照 Ellis (1999) 的方法。將雞蛋白溶菌酶溶於 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2) 配製溶菌酶標準溶液，其濃度分別為 0、2、4、6、

8、16 及 32 μg/mL。另以 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2) 配製 0.2 mg/mL *Micrococcus lysodeikitus* 之菌液。取溶菌酶標準溶液 10 μL，加入 200 μL *M. lysodeikitus*，於 28°C 反應，以盤式分光光度儀分別於第 1 分鐘及第 6 分鐘記錄在波長 530 nm 下之吸光值，根據不同濃度溶菌酶之標準溶液其每分鐘吸光值的改變量對溶菌酶濃度作圖，即得到檢量線。以魚隻血清代替溶菌酶的標準溶液重複以上步驟，記錄第 1 分鐘及第 6 分鐘之吸光值，依據其吸光值的改變由檢量線推估血清中溶菌酶之濃度，以雞蛋白溶菌酶之濃度表示為溶菌酶活性，1 單位溶菌酶活性定義為 1 μg/mL 的雞蛋白溶菌酶。

3. 呼吸爆之測定

呼吸爆之測定方法是參照 Secombes (1990) 及 Stasiack and Baumann (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。於 96 孔槽平底微量滴定盤中，每槽加入 100 μL 0.2% poly-L-lysine 覆蓋 30 min 後取出 poly-L-lysine，以增加血球吸附槽面。取 100 μL 巨噬細胞懸浮液加入處理過之 96 孔槽平底微量滴定盤中，於室溫培養 2 hr 使血球貼附槽底部，去除上清液後分別加入 100 μL 之 zymosan (0.2%) 及 HBSS，於室溫誘發反應 30 分鐘後去除上清液，加入 100 μL NBT (0.3%) 在室溫中作用 30 min，加入 100% 酒精終止反應。以 70% 酒精沖洗三次後，風乾加入 120 μL 2 M KOH 及 140 μL dimethylsulfoxide (DMSO) 以溶解 cytoplasmic formazan，以盤式分光光度儀於波長 630 nm 下測定吸光值。未誘發免疫刺激組添加 HBSS 處理為 basal activity (BA)，誘發免疫刺激組添加 zymosan 處理為 stimulated activity (SA)，兩者之差值為呼吸爆裂活性 (respiratory burst activity, RBA) (Pick and Mizel, 1981)，用以表示巨噬細胞產生超氧陰離子之增減。

六、飼料中添加益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻抵抗病原菌之試驗

實驗方法參照 Shoemaker and Klesius (1997) 及 Klesius *et al.* (2000) 並修改之。

(一) 細菌懸浮液製備

將哈維氏弧菌接種於胰蛋白酶大豆液體培養基 (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。

(二) 攻擊試驗

魚隻分別餵 5 組不同飼料 8 週後，以病原菌懸浮液注射於魚隻腹部肌肉，注射量為魚隻體重的 0.5%，攻擊感染劑量為 5.5×10^4 CFU/g；並另取數尾魚注射等量生理食鹽水以作為對照，注射後觀察並記錄魚隻死亡數目，持續 2 週。

七、統計分析方法

各試驗結果以 SAS 套裝軟體 (Version 14.0) 進行變異數 (one way analysis of variance, ANOVA) 統計分析，測試各處理組間是否有顯著差異，所有試驗使用顯著水準為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

一、飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖對魚隻腸道中總生菌數、弧菌數及乳酸菌數之影響

點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料 8 週，對照組之魚隻腸道中總生菌數最高 (為 2.28×10^5 CFU/g) (Table 1)；添加 (2) 異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖三組，魚隻腸道中總生菌分別為 3.71×10^4 、 3.02×10^4 及 5.70×10^4 CFU/g，低於對照組約 1 個對數值；(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組，魚隻腸道中總

生菌為 8.04×10^3 CFU/g，低於對照組約 1.5 個對數值。

弧菌數方面，點帶石斑動物試驗第 8 週，對照組弧菌數為 2.73×10^4 CFU/g，(2) 添加異麥芽寡糖組及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組，魚隻腸道中弧菌數分別為 1.14×10^3 及 4.10×10^3 CFU/g，較對照組低約 1 個對數值 (Table 1)；(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 以及 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖兩組，魚隻腸道中弧菌數分別 3.64×10^2 及 1.82×10^2 CFU/g，低於對照組約 2 個對數值。結果顯示，試驗組腸道中之弧菌數均明顯較對照組低。

乳酸菌方面，對照組及試驗組魚隻腸道樣品以 MRS 培養基培養後，均未發現典型乳酸菌的菌落。

自鮭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 具有抑制 13 種產氣單胞桿菌屬病原菌之效果 (Balcázar *et al.*, 2006a)。虹鱒腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 會產生抗菌物質，具有抑制乳酸鏈球菌之特性 (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。自鱒魚 (*Huso huso*) 腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 具有抑制金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之效果 (Salma *et al.*, 2011)。紋鱧腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，具有抑制親水性產氣單胞菌、腐敗希瓦氏菌及綠膿桿菌之生長之特性 (Allameh *et al.*, 2012)。自吳郭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 具有抑制綠膿桿菌、戀臭假單胞菌、哈維氏弧菌及海洋分枝桿菌之效果 (Zapata and Lara-Flores, 2013)。El-Jeni *et al.* (2015) 報導，分離自烏魚 (*Mugil cephalus*) 及吳郭魚的 *L. mesenteroides* 具有抑制溶藻弧菌、鰻弧菌 (*V. anguillarum*) 及 *V. tapetis* 的作用。Paray *et al.* (2018) 指出，分離自吳郭魚的 *L. mesenteroides* 具有抑制大腸菌 (*Escherichia coli* O157:H7)、腸道沙門氏菌 (*Salmonella enterica*)、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 及金黃色葡萄球菌的特性。褐鱒 (*Salmo trutta*) 分別餵食對照組與含有 *L. mesenteroides* (10^6 CFU/g) + *Lactobacillus lactis* (10^6 CFU/g) 的飼料 30 天，試驗組魚隻腸道中鮭產氣單胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 的數量明顯較對照組減少 (Balcázar *et al.*, 2009)。本研究試驗組添

Table 1 Counts of cultivable bacteria, lactic acid bacteria, and *Vibrio* spp. in the intestines of orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*) fed with the different diets described in the materials and methods for 8 weeks

Treatment	Cultivable bacteria (CFU/g)	Lactic acid bacteria (CFU/g)	<i>Vibrio</i> spp. (CFU/g)
Control	2.28×10 ⁵	<10 ¹	2.73×10 ⁴
Isomaltooligosaccharide	3.71×10 ⁴	<10 ¹	1.14×10 ³
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B4	3.02×10 ⁴	<10 ¹	3.64×10 ²
<i>L. mesenteroides</i> B4 + isomaltooligosaccharide	8.04×10 ³	<10 ¹	1.82×10 ²
<i>L. mesenteroides</i> B4 + dextran	5.70×10 ⁴	<10 ¹	4.10×10 ³

加益生菌 *L. mesenteroides* B4 魚隻腸道中弧菌數較對照組低的趨勢與 Balcázar *et al.* (2009) 相近。

Balcázar (2006) 報導，自鮭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 對於腸黏膜具有很強的附着力。虹鱒分別餵食對照組與含有 *L. mesenteroides* 飼料 (10⁶ CFU/g) 2 週，試驗組魚隻腸道中有高量 *L. mesenteroides* (10⁷ CFU/g) (Balcázar *et al.*, 2007b)。褐鱒分別餵食對照組與含有 *L. mesenteroides* 飼料 (10⁶ CFU/g) 2 週，試驗組魚隻腸道中亦有高量 *L. mesenteroides* (10⁷ CFU/g) (Balcázar *et al.*, 2007c)。虹鱒分別餵食對照組與 *L. mesenteroides* (10⁷ CFU/g) + *Lactobacillus plantarum* (10⁷ CFU/g) 30 天，試驗組魚隻腸道中有高量 *L. mesenteroides* (10⁶ CFU/g) (Vendrell *et al.*, 2008)。但是，Pérez-Sánchez *et al.* (2011) 指出，虹鱒分別餵食對照組與含有 *Lactobacillus plantarum* 飼料 (10⁶ CFU/g) 36 天後，檢測試驗組魚隻腸道中並未發現 *Lacto. plantarum*。本研究試驗組魚隻腸道中均未發現典型乳酸菌的菌落，表示所投餵之益生菌 *L. mesenteroides* B4 在腸道中存在之數量低於傳統微生物操作可以檢測之極限，與 Balcázar *et al.* (2007b, c) 及 Vendrell *et al.* (2008) 的研究有很大差異，此種差異可能是來自宿主或是細菌本身，與 Pérez-Sánchez *et al.* (2011) 研究相近。

白蝦分別餵食對照組與含有 *Bacillus* OJ (10⁸ CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.2%) 的飼料 14 天，試驗組蝦隻肝胰腺中總生菌數及弧菌數較對照組低 (Li *et al.*, 2009)。斑節蝦分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* (10⁸ CFU/g) + *B. subtilis* (10⁸ CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.2%) 的飼料 8 週，試驗組蝦隻肝胰腺中總生菌數較對照組高，而弧菌數則較對照組低

(Zhang *et al.*, 2011)。褐鱒分別餵食對照組與 *B. subtilis* (10⁶ CFU/g) + *B. licheniformis* (10⁶ CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.2%) 7 週，試驗組魚隻腸道中總生菌數及乳酸菌數較對照組高 (Aftabgard *et al.*, 2017)。

此外，家禽類攝食異麥芽寡糖後，顯著增加腸道內益生菌 - 雙歧桿菌，而減少壞菌 - 產氣莢膜梭菌 (Zhang *et al.*, 2003; Chung and Day, 2004)。Syed Raffic Ali and Ambasankar (2018) 報導，異麥芽寡糖具有拮抗腸內病原菌之功能。Huang *et al.* (2017, 2018) 指出，*L. mesenteroides* B4 (10⁷ CFU/g) 及其葡聚糖 (0.15%) 之產物有助於降低白蝦肝胰腺之弧菌數。Fukata *et al.* (1999) 報導，雞隻分別餵食對照組及含有 0.3% 葡聚糖的飼料 7 天後，試驗組糞便中腸道沙門氏菌的數量較對照組顯著減少。Bozkurt *et al.* (2008) 指出，雞隻分別餵食對照組及含有 0.1% 葡聚糖的飼料 21 天後，試驗組雞隻腸道中酸鹼度下降，病原性沙門氏菌及大腸菌的數量較對照組顯著減少 ($p < 0.05$)。Bozkurt *et al.* (2008) 認為，飼料中添加葡聚糖，可以提供雞隻腸道中的乳酸菌有較多能量來源，刺激產生較多有機酸，使得腸道中酸鹼度下降，病原性沙門氏菌及大腸菌的數量減少。

本研究試驗組魚隻腸道中總生菌數較對照組低的趨勢與 Li *et al.* (2009) 相近，而試驗組魚隻腸道中弧菌數較對照組低的趨勢與 Li *et al.* (2009)、Zhang *et al.* (2011) 及 Huang *et al.* (2017, 2018) 一致。綜合上述文獻顯示，分離自不同種魚隻腸道之 *L. mesenteroides* 具有抑制多種水產生物及人類病原菌之特性 (Balcázar *et al.*, 2006a; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Salma *et al.*, 2011; Allameh *et al.*, 2012; Zapata and Lara-Flores, 2013; El-Jeni *et al.*, 2015;

Paray *et al.*, 2018), 鱒魚腸道來源的 *L. mesenteroides* 也具有保護鱒魚腸道黏膜表皮細胞完整之功能 (Salma *et al.*, 2011)。家禽類攝食異麥芽寡糖後, 顯著增加腸道內益生菌, 減少壞菌 (Zhang *et al.*, 2003; Chung and Day, 2004), 此外, 異麥芽寡糖具有拮抗腸內病原菌之功效 (Syed Raffic Ali and Ambasankar, 2018)。腸內細菌發酵葡聚糖, 能夠產生較多有機酸, 減少病原性細菌 (Bozkurt *et al.*, 2008), 因此, 推測 *L. mesenteroides* B4 及其所產異麥芽寡糖與葡聚糖均有降低石斑魚腸道中弧菌數之功用。

二、飼料中添加益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻糞便中短鏈脂肪酸含量之影響

收集點帶石斑動物試驗第 4 及 8 週魚隻之糞便, 進行短鏈脂肪酸 (乳酸、醋酸、丙酸、丁酸及異丁酸) 之含量分析; 結果顯示, 第 4 週時, 試驗組石斑糞便內該 5 種短鏈脂肪酸之總含量, 在 (2) 添加異麥芽寡糖組為 5.67 mM、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組為 6.25 mM、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖組為 6.15 mM 及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組為 6.20 mM, 均高於對照組的 4.93 mM (Fig. 1 up)。第 8 週時, 在(2)添加異麥芽寡糖組為 6.63 mM、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組為 7.06 mM、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖組為 7.23 mM 及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組為 6.41 mM 亦較對照組 (6.13 mM) 為高 (Fig. 1 down)。點帶石斑動物試驗第 4 及 8 週, 試驗組點帶石斑糞便內 5 種短鏈脂肪酸之總含量均較對照組高。

Kihara and Sakata (1997) 報導, 吳郭魚分別餵食對照組及含有 15% α 澱粉的飼料 14 天後, 試驗組魚隻腸道中短鏈脂肪酸之總含量較對照組高, 因此, Kihara and Sakata (1997) 認為, 吳郭魚腸道中的細菌可以發酵 α 澱粉產生短鏈脂肪酸。Kihara and Sakata (2002) 指出, 鯉魚腸道中的細菌可以發酵異麥芽寡糖產生短鏈脂肪酸。Romano *et al.* (2018) 報導, 非洲鯰魚 (*Clarias gariepinus*) 分別餵食對照組及含有 0.5% 異麥芽寡糖的飼料 8 週

後, 試驗組腸道中短鏈脂肪酸之總含量較對照組高。

Vázquez *et al.* (2005) 指出, 分離自凝乳 (pressed cured) 的 *L. mesenteroides* 所產之乳酸及醋酸是抑制病原弧菌生長之主要原因, 而非抑菌素 (bacteriocin)。本研究顯示, 點帶石斑動物試驗第 4 及 8 週, 試驗組點帶石斑糞便內 5 種短鏈脂肪酸之總含量均較對照組為高, 而腸道中弧菌量則低於對照組 (Table 1), 推測試驗組中異麥芽寡糖或葡聚糖可以增加點帶石斑腸道內細菌發酵基質, 或腸道中益生菌作用益生素的效率較佳, 產生較多的短鏈脂肪酸, 使腸道造成較酸的環境, 抑制有害微生物之繁生, 有利於維持飼養生物的健康。

三、飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻免疫指數之影響

點帶石斑分別餵飼 5 種不同飼料 8 週後, (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組抗蛋白酶活性分別為 44.53、48.54、46.28、47.60 及 46.15%, 試驗組抗蛋白酶活性均顯著地高於對照組 ($p < 0.05$), 而以哈維氏弧菌攻擊後, (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組抗蛋白酶活性分別為 41.24、60.37、51.29、54.45 及 51.29%, 試驗組魚隻血液中抗蛋白酶活性亦較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 2)。

點帶石斑分別餵飼 5 種不同飼料 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組 8 週, 魚隻血清中溶菌酶活性分別為 1.43、1.90、2.10、2.16 及 2.62 U/mL, 試驗組溶菌酶活性均顯著高於對照組 ($p < 0.05$), 而以哈維氏弧菌攻擊後, (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益

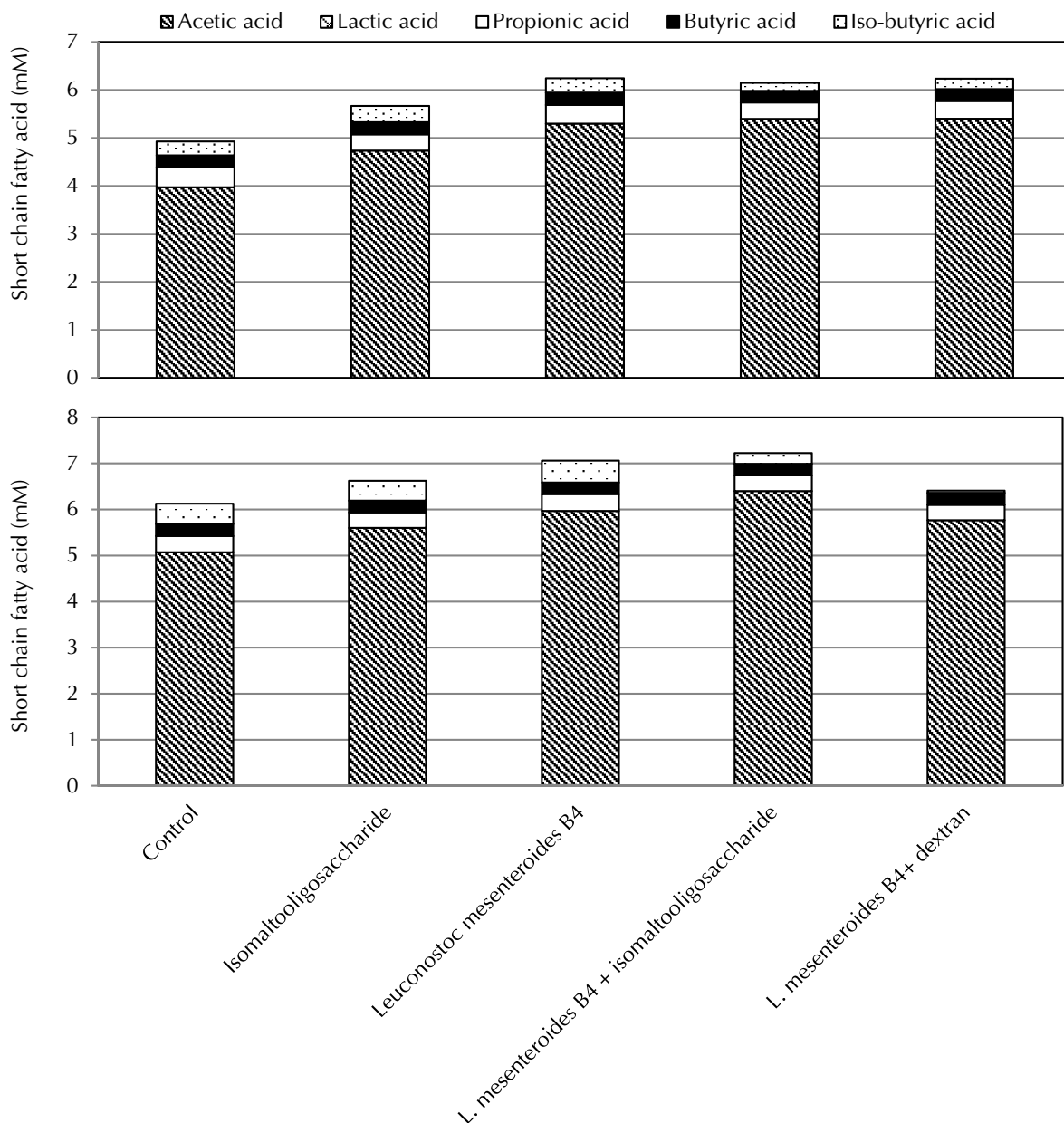


Fig. 1 The levels of short chain fatty acids in the feces of orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*) fed with the different diets described in the materials and methods for 4 (up) and 8 (down) weeks, respectively.

生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組溶菌酶活性分別為 1.43、2.38、2.38、2.62 及 2.83 U/mL，試驗組魚隻血液中溶菌酶活性亦較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 2)。

點帶石斑分別餵飼 5 種不同飼料 8 週後，(1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及(5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組血液中呼吸爆分別為 0.17、0.17、

0.20、0.28 及 0.26，(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組呼吸爆顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。而以哈維氏弧菌攻擊後，(1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及(5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組呼吸爆分別為 0.50、0.48、0.49、0.66 及 0.77，(4) 添加異麥芽寡糖 + 益生菌 *L.*

Table 2 Pre- and post- *Vibrio harveyi* challenge levels of serum antiprotease activity, lysozyme activity, and respiratory bursts of spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed with the different diets described in the materials and methods for 8 weeks.

	Antiprotease activity (%)		Lysozyme activity (U/ml)		Respiratory burst	
	Pre-*	Post-*	Pre-*	Post-*	Pre-*	Post-*
Control	44.53 ± 0.68 ^a	41.24 ± 0.41 ^a	1.43 ± 0.12 ^a	1.43 ± 0.13 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.50 ± 0.02 ^a
Isomaltooligosaccharide	48.54 ± 0.62 ^c	60.37 ± 0.47 ^d	1.90 ± 0.12 ^b	2.38 ± 0.23 ^b	0.17 ± 0.04 ^a	0.48 ± 0.01 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B4	46.28 ± 0.85 ^b	51.29 ± 0.10 ^b	2.10 ± 0.41 ^b	2.38 ± 0.49 ^b	0.20 ± 0.03 ^a	0.49 ± 0.01 ^a
<i>L. mesenteroides</i> B4 + isomaltooligosaccharide	47.60 ± 0.41 ^b	54.45 ± 0.47 ^c	2.16 ± 0.03 ^b	2.62 ± 0.11 ^b	0.28 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.01 ^b
<i>L. mesenteroides</i> B4 + dextran	46.15 ± 0.27 ^b	51.29 ± 0.41 ^b	2.62 ± 0.04 ^c	2.83 ± 0.01 ^c	0.26 ± 0.08 ^b	0.77 ± 0.14 ^c

*pre- and post- challenge with *V. harveyi*.

Values are expressed as mean ± SE of nine replicates.

Columns with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

mesenteroides B4 及(5) 添加葡聚糖 + 益生菌 *L. mesenteroides* B4 兩組呼吸爆均顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。試驗組魚隻血液中呼吸爆在病原菌攻擊前後以 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組顯著地高於對照組 ($p < 0.05$) (Table 2)。

虹鱔分別餵食對照組與含有 *L. mesenteroides* 的飼料 2 週，試驗組魚隻血液中白血球的吞噬比例、替代性補體活性 (alternative complement activity, ACP)、超氧歧化酶活性 (superoxide dismutase activity, SOD) 及溶菌酶活性均較對照組高 (Balcázar *et al.*, 2007b)。褐鱔分別餵食對照組與含有 *L. mesenteroides* 的飼料 2 週，試驗組魚隻血液中替代性補體活性及溶菌酶活性均較對照組高 (Balcázar *et al.*, 2007c)。褐鱔分別餵食對照組與含有 *L. mesenteroides* + *Lactobacillus lactis* 的飼料 30 天，試驗組魚隻頭腎中白血球的吞噬活性增強，腸道中病原菌增殖能力減弱 (Balcázar *et al.*, 2009)。本研究顯示，點帶石斑餵食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 的飼料 8 週後，魚隻血清中溶菌酶活性較對照組高 ($p < 0.05$)，與虹鱔及褐鱔飼餵添加益生菌 *L. mesenteroides* 飼料的結果一致 (Balcázar *et al.*, 2007b, c)。

Romano *et al.* (2018) 報導，非洲鯰魚分別餵

食對照組及含有 0.5% 異麥芽寡糖的飼料 8 週後，試驗組魚隻血液中白血球的數量及吞噬能力較對照組高。此外，應用芽孢桿菌配合異麥芽寡糖也有不錯效果，白蝦分別餵食對照組與含有 *Bacillus* OJ + 異麥芽寡糖的飼料 14 天，試驗組蝦隻血液中白血球的吞噬比例、酚氧化酶活性及呼吸爆均顯著地高於對照組 (Li *et al.*, 2009)。斑節蝦分別餵食對照組及含有 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料 8 週，血液中總白血球的數量顯著地高於對照組，試驗組蝦隻血清中溶菌酶活性、超氧歧化酶活性、酚氧化酶、呼吸爆裂活性均顯著地高於對照組 (Zhang *et al.*, 2011)。褐鱔分別餵食對照組與添加 *B. subtilis* + *B. licheniformis* + 異麥芽寡糖的飼料 7 週，試驗組魚隻血清中溶菌酶的活性顯著地較對照組高 (Aftabgard *et al.*, 2017)。Syed Raffic Ali and Ambasankar (2018) 指出，異麥芽寡糖有助於調節水產動物之免疫。本研究顯示，點帶石斑餵食添加異麥芽寡糖及益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組飼料 8 週後，魚隻血清中溶菌酶活性較對照組高 ($p < 0.05$)，與褐鱔及斑節蝦攝食添加芽孢桿菌 + 異麥芽寡糖飼料的結果一致 (Zhang *et al.*, 2011; Aftabgard *et al.*, 2017)。點帶石斑餵食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組飼料後，魚隻血清中呼吸爆活性

較對照組高 ($p < 0.05$)，與斑節蝦及白蝦攝食添加芽孢桿菌+異麥芽寡糖飼料的結果相近 (Li *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2011)。

Huang *et al.* (2017, 2018) 報導，白蝦飼料含有 *L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖之產物，血液中白血球的酚氧化酶活性及呼吸爆均顯著地高於對照組，有助於提升免疫反應。本研究顯示，點帶石斑飼料添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組飼料 8 週後，魚隻血液中呼吸爆較對照組高 ($p < 0.05$)，與白蝦攝食添加 *L. mesenteroides* B4 及葡聚糖之飼料的結果一致 (Huang *et al.*, 2017, 2018)。

四、飼料中添加益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻抵抗病原菌之影響

點帶石斑分別飼料 5 種不同飼料 8 週，以哈維氏弧菌攻擊後，在 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組魚隻存活率分別為 53.34、60.28、62.54、73.33 及 76.67% (Fig. 2)，其中以飼料 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+葡聚糖組的魚隻存活率最高，且統計上與對照組有明顯地差異 ($p < 0.05$)。

虹鱒分別飼料對照組與 *L. mesenteroides* 2 週，以鮭產氣單胞菌攻擊後，試驗組的活存率顯著地高於對照組 (Balcázar *et al.*, 2007b)。虹鱒分別飼料對照組與添加 *L. mesenteroides* + *Lactobacillus plantarum* 的飼料 30 天，以乳酸鏈球菌攻擊後，試驗組的活存率顯著地高於對照組 (Vendrell *et al.*, 2008)。褐鱒分別飼料對照組與含有 *L. mesenteroides*+*Lactobacillus lactis* 的飼料 30 天，以鮭產氣單胞菌攻擊後，試驗組的活存率顯著地高於對照組 (Balcázar *et al.*, 2009)。Pérez-Sánchez *et al.* (2011) 指出，虹鱒分別飼料對照組與含有 *Lactobacillus plantarum* 飼料 36 天，檢測試驗組魚隻腸道中並未發現 *Lacto. plantarum*，但以乳酸鏈球菌攻擊後，試驗組魚隻活存率顯著地高於對照組。此外，Salma *et al.* (2011) 報導，以鱒魚腸道進行體外試驗，腸道先以分離自鱒魚腸道中的 *L. mesenteroides* 處理，再以金黃色葡萄球菌攻擊，結

果顯示，*L. mesenteroides* 具有保護腸道黏膜表皮細胞完整之特性；而以分離自起司 (cheese) 的 *L. mesenteroides* 預先處理組，再以金黃色葡萄球菌攻擊，則出現腸道黏膜表皮細胞損傷，絨毛不順，顯示分離自起司的 *L. mesenteroides* 並沒有保護鱒魚腸道之效果。

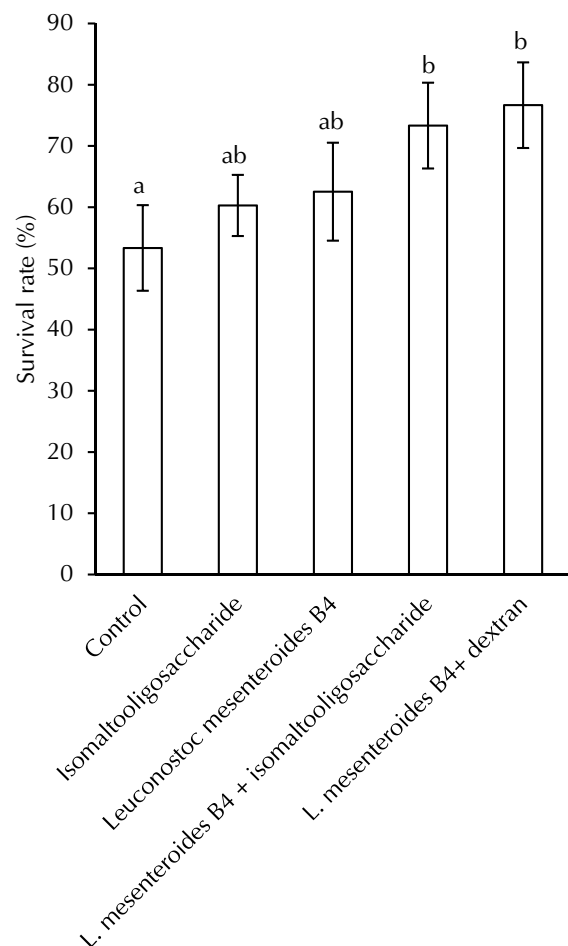


Fig. 2 The survival rate after *V. harveyi* challenge of spotted groupers (*E. coioides*) fed with the different diets described in materials and methods for 8 weeks. Columns with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

本研究顯示，點帶石斑飼料添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 飼料 8 週後，魚隻以哈維氏弧菌攻擊後，存活率較對照組高的趨勢，與虹鱒及褐鱒攝食添加 *L. mesenteroides* 之飼料的結果一致 (Balcázar *et al.*, 2007b; Vendrell *et al.*, 2008; Balcázar *et al.*, 2009)。雖然本研究發現，所投餵之益生菌 *L. mesenteroides* B4 在試驗組魚隻腸道中存在之數量

低於傳統微生物操作檢測之極限，但是，以病原菌攻擊後存活率較對照組高，此現象類似虹鱖飼食含有 *Lactobacillus plantarum* 飼料的結果 (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。Pérez-Sánchez *et al.* (2011) 認為，益生菌誘發宿主免疫力，增強抗病力，並不一定有益生菌與腸道的直接交互作用，也就是益生菌不一定要在腸道定殖才有效果，而是益生菌調節宿主體內免疫作用，進而提升宿主的免疫能力。此外，*L. mesenteroides* 也具有避免病原菌造成腸道損傷，保護腸道之功效，有助於維持魚體健康 (Salma *et al.*, 2011)。

白蝦分別飼食對照組與含有 *Bacillus* OJ+異麥芽寡糖的飼料，以白斑病毒攻擊後，試驗組的存活率顯著地高於對照組 (Li *et al.*, 2009)。斑節蝦分別飼食對照組及含有 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料 8 週，以溶藻弧菌攻擊後發現，試驗組的存活率均顯著地高於對照組 (Zhang *et al.*, 2011)。

本研究顯示，點帶石斑飼食添加異麥芽寡糖及益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組 8 週，魚隻以病原菌攻擊後，存活率較對照組高的趨勢，其與白蝦及斑節蝦攝食添加芽孢桿菌 + 異麥芽寡糖飼料的結果類似 (Li *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011)。此外，Syed Raffic Ali and Ambasankar (2018) 指出，異麥芽寡糖有助於增強水產動物抵抗疾病。

Huang *et al.* (2017, 2018) 報導，白蝦飼食 *L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖之產物，以腸炎弧菌攻擊後，試驗組的存活率顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。此外，飼食虹鱖予 *L. sakei* MN1 所產的葡聚糖 (50 μg) 3 天，可以降低虹鱖受 IPNV 及 IHNV 感染後的死亡率 (Nácher-Vázquez *et al.*, 2015)。本研究顯示，點帶石斑飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組飼料 8 週，魚隻以病原菌攻擊後，存活率較對照組高 ($p < 0.05$)，此現象與白蝦攝食添加 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料，及虹鱖攝食含有葡聚糖飼料的結果一致 (Nácher-Vázquez *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017, 2018)。

參考文獻

- 何書廷, 黃美瑩, 林金榮 (2013) 點帶石斑血液中白血球分離技術探討. 水試專訊, 41: 9-12.
- 黃美瑩, 朱惠真, 曾亮瑋 (2018) 點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 飼料中添加益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物對於魚隻成長之影響. 水產研究, 26(2): 1-19。
- 黃美瑩, 朱惠真, 曾亮瑋, 許晉榮 (2017) 美洲大嘴鱸腸道中葡聚糖產生菌 (*Leuconostoc mesenteroides* B4) 之篩選. 水產研究, 25(2): 23-33.
- Aftabgard, M., A. Salarzadeh, M. Mohseni, A. H. B. Shabanipour and M. E. J. Zorriehzahra (2017) The combined efficiency of dietary isomaltooligosaccharides and *Bacillus* spp. on the growth, hemato-serological, and intestinal microbiota indices of caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). Probiotics Antimicro., 10: 1-9.
- Ai, Q., H. Xu, K. Mai, W. Xu, J. Wang and W. Zhang (2011) Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture, 317: 155-161.
- Allameh, S. K., H. Daud, F. M. Yusoff, C. R. Saad and A. Ideris (2012) Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). Afr. J. Biotechnol., 11(16): 3810-3816.
- Alsop, R. M. (1983) Industrial production of dextrans. In Microbial Polysaccharides (M. E. Bushell ed.), Elsevier, Amsterdam, pp 1-44.
- Aman, A., N. N. Siddiqui and S. A. U. Qader (2012) Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. Carbohydr. Polym., 87: 910-915.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, M. D. Evora and J. L. Múzquiz (2006a) Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microb. Ecol. Health Dis., 18: 61-63.
- Balcázar, J. L. (2006) Selection and characterization of probiotic strains for the prevention of furunculosis in brown trout (*Salmo trutta fario*). PhD Thesis, University of Zaragoza, Spain.

- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés and J. L. Muzquiz (2007a) Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 30(2):111-118.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés and J. L. Muzquiz (2007b) Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, 51: 185-193.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. C. Calvo, I. Marquez, O. Gironés and J. L. Muzquiz (2007c) Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *Brit. J. Nutr.*, 97: 522-527.
- Balcázar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela and J. L. Muzquiz (2009) Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 153-157.
- Blanshard, J. M. V. and J. R. Mitchell (1979) Polysaccharides in Food. Butterworth, London, pp 253-254.
- Bowden, T., R. Butler, I. R. Bricknell and A. E. Ellis (1997) Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 377-385.
- Bozkurt, M., K. Küçükyılmaz, A. U. Çatli and M. Çinar (2008) Growth performance and slaughter characteristics of broiler chickens fed with antibiotic, mannan oligosaccharide and dextran oligosaccharide supplemented diets. *Int. J. Poult. Sci.*, 7: 969-977.
- Chen, H. L., Y. H. Lu, J. J. Lin and L. Y. Ko (2001) Effects of isomaltooligosaccharides on bowel functions and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20: 44-49.
- Cheng, A. L., T. M. Pan, H. P. Hung and C. J. Huang (2000) Intestinal microflora is improved by the feeding of an oligosaccharide containing soft drink in rats. *Nutr. Sci. J. (Taiwan)*, 25: 232-242.
- Chung, C. H. and D. F. Day (2004) Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poult. Sci.*, 83(8): 1302-6.
- Cook, M. T., M. L. Ng, K. L. Ng, J. J. Loo and J. Y. Wee (2001) The efficacy of a commercial beta-glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 611-672.
- Desai, A. R., M. G. Links, S. A. Collins, G. S. Mansfield, M. D. Drew, A. G. Van Kessel and J. E. Hill (2012) Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350: 134-142.
- Düğenci, S. K., N. Arda and A. Candan (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J. Ethnopharmacol.*, 88: 99-106.
- El-Jeni, R., M. El Bour, P. Calo-Mata, K. Böhme, I. C. Fernández-No, J. Barros-Velázquez and B. Bouhaouala-Zahar (2015) *In vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Can. J. Microbiol.*, 62(1): 60-71.
- Ellis, A. E. (1999) Lysozyme assays. *In Techniques in Fish Immunology: Fish Immunology Technical Communication I* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. Muiswinkel eds.), SOS Publication, Fair Haven, NJ, USA. pp. 101-103.
- Fukata, T., K. Sasai, T. Miyamoto and E. Baba (1999) Effect of mixed feed containing dextran of Salmonella colonization in chicks. *J. Japon. Vet. Med. Assoc.*, 52: 125-128.
- Garrigues, D. and G. Arevalo (1995) An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. *In Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95: Swimming Through Troubled Waters* (C. L. Browdy and J. S. Hopkin eds), World Aquaculture Annual Meeting, San Diego, California. 2-6 February, 1995. pp. 53-59.
- Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Genc, M. A., E. Yilmaz, E. Genc and M. Aktas (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Isr. J. Aquacult. - Bamidgeh*, 59(1): 10-16.
- Geng, X., X. H. Dong, B. P. Tan, Q. H. Yang, S. Y. Chi, H. Y. Liu and X. Q. Liu (2011) Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth

- performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish shellfish Immunol., 31: 400-406.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. Dalvi, V. Kumar and S. C. Mukherjee (2008) Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. J. Fish Dis., 31: 649-657.
- Hamada, S., T. Koga, T. Fujiwara and T. Ooshima (1984) Role of oligosaccharides in dental caries development. Jpn. Soc. Starch Sci., 31: 83-91.
- He, S., G. Xu, Y. Wu, H. Weng and H. Xie (2003) Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. Chinese Feed, 23: 14-15.
- 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.
- Hoseinifar, S. H., Y. Sun, A. Wang and Z. Zhou (2018) Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. Front. Microbiol., 9: 1-18.
- Huang, M. Y., H. J. Ju, L. W. Tseng and C. J. Hsu (2017) Effects of a probiotic collected from fish's intestine and its dextran product on growth performance, immunity status, and pathogen resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Abstract Book of ISNFF 2017. The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods. October 22-25, 2017, GSCO, Gunsan, Jeonbuk, Korea, p. 352.
- Huang, M. Y., H. J. Ju, L. W. Tseng and F. C. Wu (2018) The effect of a probiotic, *Leuconostoc mesenteroides* B4, and its dextran product on growth performance and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Asian-Pacific Aquaculture 2018, April 23-26, 2018. Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan.
- Itami, Y., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). The Third Asian Fisheries Forum, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 375-378.
- Jaber, N. and B. Masoumeh (2017) Effect of diets containing different levels of prebiotic Mito on the growth factors, survival, body composition, and hematological parameters in common carp *Cyprinus Carpio* Fry. J. Mar. Biol. Aquac., 3: 1-6.
- Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 116: 315-329.
- Kanno, T. (1990) Some functional properties of so-called isomaltooligosaccharides and their applications to food industry. J. Jpn. Soc. Starch Sci., 37: 87-97.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan and L. Gibson (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274: 1-14.
- Kihara, M. and T. Sakata (1997) Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comp. Biochem. Physiol., 118A (4): 1201-1207.
- Kihara, M. and T. Sakata (2002) Production of short-chain fatty acids and gas from various oligosaccharides by gut microbes of carp (*Cyprinus carpio* L.) in micro-scale batch culture. Comp. Biochem. Physiol., 132A: 333-340.
- Klesius, P. H., C. A. Shoemaker and J. J. Evans (2000) Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 188: 237-246.
- Kohmoto, S., F. Fukui, H. Takaku, Y. Machida, M. Arai and T. Mitsuoka (1988) Effect of isomaltooligosaccharides on human fecal flora. Bifidobact. Microflora, 7: 61-69.
- Kohmoto, T., F. Fukui, H. Takaku and T. Suoka (1991) Dose-response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria. Agric. Biol. Chem., 55: 2157-2159.
- Korakli, M. and R. F. Vogel (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosucrases and therapeutic potential of their synthesized glycans. Appl. Microbiol. Biotechnol., 71: 790-803.
- Kosin, B. and S. K. Rakshit (2010) Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous probiotics for application to white shrimp feed. Aquaculture, 306: 302-309.

- Leathers, T. D. (2002) Biopolymers. In Polysaccharides I: polysaccharides from prokaryotes (E. J. Vandamme, S. De Baets and A. Steinbuechel eds), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 229-321.
- Leemhuis, H., T. Pijning, J. M. Dobruchowska, S. S. van Leeuwen, S. Kralj, B. W. Dijkstra and L. Dijkhuizen (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J. Biotechnol.*, 163: 250-272.
- Li, J., B. Tan and K. Mai (2009) Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1-2): 35-40.
- Lin, S. D. and C. C. Lee (2005) Qualities of chiffon cake prepared with indigestible dextrin and sucralose as replacement for sucrose. *Cereal Chem.*, 82: 405-413.
- Liu, S. F., Y. S. Ling and C. M. E. Tsai (1994) Biotechnically synthesized oligosaccharides and polydextrose reduce constipation and putrefactive metabolites in the human. *Nutr. Sci. J. (Taiwan)*, 19: 221-232.
- Liu, S. F. and C. M. E. Tsai (1995) Effects of biotechnically synthesized oligosaccharides and polydextrose on serum lipids in the human. *Nutr. Sci. J. (Taiwan)*, 20: 1-12.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203.
- Mehrabi, Z., F. Firouzbakhsh and A. Jafarpour (2012) Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*, 96(3): 474-481.
- Nácher-Vázquez, M., N. Ballesteros, Á. Canales, S. R. Saint-Jean, S. I. Pérez-Prieto, A. Prieto, R. Aznar and P. López (2015) Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydr. Polym.*, 124: 292-301.
- Nayak, S. K. (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2-14.
- Paray, B. A., I. A. Rather, M. K. Al-Sadoon and A. S. F. Hamad (2018) Pharmaceutical significance of *Leuconostoc mesenteroides* KS-TN11 isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Saudi Pharm. J.*, 26: 509-514.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield and I. Ruiz-Zarzuela (2011a) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.*, 34: 499-507.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, D. L. Merrifield, O. Carnevali, G. Gioacchini, I. de Blas and I. Ruiz-Zarzuela (2011b) Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 31: 196-201.
- Pick, E. and D. Mizel (1981) Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, 46: 211-216.
- Piret, J., J. Lamontagne, J. Bestman-Smith, S. Roy, P. Gourde, A. Desormeaux, R. F. Omar, J. Juhasz and M. G. Bergeron (2000) In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human deficiency viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 38:110-119.
- Robertsen, B., R. E. Ehgstad and J. B. Jørgensen (1994) β -glucan as immunostimulants in fish. In *Modulators of Fish Immune Response 1* (J. S. Stolen and T. C. Fletcher eds.), SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA. pp. 83-99.
- Rodríguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga, H. Fushimi and J. Sweetman (2009) Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharides and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult. Sci.*, 57: 609-617.
- Romano, N., N. Kanmani, M. Ebrahimi, C. M. Chong, J. C. Teh, S. H. Hoseinifar, S. M. N. Amin, M. S. Kamarudin and V. Kumar (2018) Combination of dietary pre-gelatinized starch and isomaltooligosaccharides improved pellet characteristics, subsequent feeding efficiencies and physiological status in African catfish, *Clarias gariepinus*, juveniles. *Aquaculture*, 484: 293-302.
- Salma, W., Z. Zhou, W. Wang, F. Askarian, A. Kousha, M. T. Ebrahimi and E. Ringø (2011) Histological and bacteriological changes in intestine of beluga

- (*Huso huso*) following ex vivo exposure to bacterial strains. *Aquaculture*, 314(1-4): 24-33.
- Schlaubitz, S., S. M. Derkaoui, L. Marosa, S. Miraux, M. Renard, S. Catros, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee and J. C. Fricain (2014) Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. *PLoS one*, 9: e110251.
- 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, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In* Techniques in Fish Immunology (J. S. Stoken, D. P. Fletcher, B. S. Anderson & W. B. Van Muiswinkel eds), S.O.S Publication, Fair Haven, NJ, USA., pp. 137-152.
- Shoemaker, C. and P. Klesius (1997) Streptococcal disease problems and control: A review. *In* Tilapia Aquaculture Vol. 2 (K. Fitzsimmon ed.), Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY, USA., pp. 671-680.
- Stasiack, A. S. and C. P. Baumann (1996) Neutrophil activity as a potent indicator of concomitant analysis. *Fish shellfish Immunol.*, 37: 539-542.
- Syed Raffic Ali, S. and K. Ambasankar (2018) Prebiotics in aquaculture. *Aquac. Time*, 2(3): 14-16.
- Tucker, J. W. Jr and S. Kennedy (2001) Snook culture. *Aquaculture 2001, Book of abstract. World Aquacult. Soc., USA*, p. 651.
- Vázquez, J. A., M. P. González and M. A. Murado (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149-161.
- Vendrell, D., J. L. Balcázar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, O. Gironés and J. L. Múzquiz (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31 (4): 337-345.
- Wang, H. F., P. S. Lim, M. D. Kao, E. C. Chan, L. C. Lin and N. P. Wang (2001) Use of isomaltooligosaccharide in the treatment of lipid profiles and constipation in hemodialysis patients. *J. Renal Nutr.*, 11: 73-79.
- 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.
- Witte, W. (2000) Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 16: S19-S24.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by β -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakk.*, 55: 1815-1819.
- Ye, J. D., K. Wang, F. D. Li and Y. Z. Sun (2011) Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr.*, 17: 902-911.
- Zannini, E., D. M. Waters, A. Coffey and E. K. Arendt (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 1121-1135.
- Zapata, A. A. and M. Lara-Flores (2013) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Nile tilapia intestine (*Oreochromis niloticus*). *J. Biol. Life Sci.*, 4(1): 164-171.
- Zhang, W. F., D. F. Li, W. Q. Lu and G. F. Yi (2003) Effects of isomalto-oligosaccharides on broiler performance and intestinal microflora. *Poult. Sci.*, 82(4): 657-63.
- Zhang, Q., B. P. Tan, K. S. Mai, W. B. Zhang, H. M. Ma, Q. H. Ai, X. J. Wang and Z. G. Liufu (2011) Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquac. Res.*, 42: 943-952.

The Effect of the Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* B4 and Its Isomaltooligosaccharide and Dextran Products on the Pathogen Resistance of Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

Mei-Ying Huang¹, Huei-Jen Ju^{2*} and Liang-Wei Tseng²

¹Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute

²Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The effects of diets containing the probiotic *Leuconostoc mesenteroides* B4 and its products, isomaltooligosaccharide and dextran, on the viable bacterial counts in the intestine, short chain fatty acids in feces, immune status, and pathogen resistance of spotted grouper (*Epinephelus coioides*) were investigated in the present study. Spotted grouper were fed (1) control, (2) isomaltooligosaccharide, (3) *L. mesenteroides* B4, (4) *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide, and (5) *L. mesenteroides* B4 + dextran supplemented diets for up to 8 weeks, and the *Vibrio* spp. counts of the intestines of the groupers that were fed with all the experimental diets were significantly lower than that of the control group, while the levels of total short chain fatty acids in the feces of the fish fed with the experimental diets for 4 and 8 weeks were significantly increased compared to that of the control group fish. Before and after *Vibrio harveyi* challenge, the antiprotease and lysozyme activity levels of the fish fed with the experimental diets were also significantly higher than those of the control group fish ($p < 0.05$); the respiratory bursts of the fish fed with the *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide and *L. mesenteroides* B4 + dextran diets were significantly higher than those of the control group ($p < 0.05$). The highest survival rates were observed in the fish fed with the *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide and *L. mesenteroides* B4 + dextran diets for 8 weeks and then challenged with *V. harveyi*, with the survival rates of those groups being significantly increased compared to that of the control group ($p < 0.05$). Overall, the results of this study indicate that the dietary administration of *L. mesenteroides* B4 and its products, isomaltooligosaccharide and dextran, could be of benefit in terms of enhancing the resistance to pathogens of orange-spotted grouper.

Key words: orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, probiotic, isomaltooligosaccharide, dextran, pathogen resistance

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Rd, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2463-3101 ext. 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjeng@mail.tfrin.gov.tw