

飼料中添加益生菌 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 及其發酵產物 - 乳果糖與果聚糖對點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 抵抗病原菌之影響

黃美瑩 · 朱惠真* · 廖哲宏 · 曾福生

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 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 及其發酵產物-乳果糖 (lactosucrose) 與果聚糖 (levan) 對於魚隻糞便中短鏈脂肪酸 + 乳酸、免疫指數及抵抗病原菌之影響。點帶石斑分別餵飼對照組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖飼料 10 週。結果顯示，點帶石斑分別餵飼 3 種飼料 5 及 10 週後，試驗組魚隻糞便中短鏈脂肪酸及乳酸之含量均高於對照組。免疫指數方面，以病原菌-哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 攻擊前後，試驗組魚隻血清中溶菌酶活性均較對照組高 ($p < 0.05$)；而以哈維氏弧菌攻擊後，試驗組魚隻血液中呼吸爆均較對照組高 ($p < 0.05$)，且試驗組魚隻存活率均高於對照組 ($p < 0.05$)。以上結果顯示，點帶石斑飼料中添加益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其乳果糖與果聚糖產物，有助於提升魚隻抵抗病原菌的能力。

關鍵詞：點帶石斑、地衣芽孢桿菌、乳果糖、果聚糖、病原菌抵抗力

前 言

石斑魚具有肉質佳、味道鮮美、成長快速、飼料效率佳及經濟價值高等特性，為世界重要的養殖魚種之一 (Heemstra and Randall, 1993)。由於石斑魚在較高密度環境下仍能生存且快速成長，因此，石斑魚集約養殖方式在臺灣已相當普遍；然集約養殖因為養殖環境快速惡化，容易造成疾病發生，導致養殖失敗，造成經濟重大損失 (Chua *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1999)。當養殖生物爆發疾病時，養殖戶常使用抗生素或化學藥劑加以治療，然而抗生素使用過量易發生殘留及抗藥性問題，且危及人體健康，而化學藥劑則易污染環境，目前許多國家在動物生產上已設定嚴格的抗生素及化學藥劑使用規範，因此必須尋求其他方式以維持養殖生物之健康。

魚類對於感染源的入侵會啟動非特異性及特異性的免疫機制，尤其以非特異性的免疫較為重要，因此強化魚類自體免疫能力，可以提升魚隻的健康狀況。目前有相當多的研究報告顯示，適當的使用免疫激活物 (immunostimulants)，包括益生菌 (probiotics) 及益菌質 (prebiotics) 等，可以增加非特異性及特異性的免疫反應，增強魚隻的抗病能力，因此對於提升水產生物的養殖成效及疾病的預防與抵抗具有良好的效果 (He *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2011)。

Bacillus licheniformis 為許多水產生物腸道中常在菌相之一 (Ramesh *et al.*, 2015)，且具有抑制多種病原菌之功能 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Andriani *et al.*, 2017)，因此，*B. licheniformis* 具有作為益生菌的特點。

益菌質是指非消化性的碳水化合物，包括寡糖及聚糖等 (Gibson and Roberfroid, 1995)，它可以選擇性的刺激體內益生菌的生長，進而促進宿主的健康。乳果糖 (lactosucrose) (4G-β-D-

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

lactosylfructoside, galactosylsucrose) 是一種 3 糖的寡糖，為益菌質的一種，由葡萄糖、半乳糖及果糖組成，已知有多種微生物可以分泌果聚糖蔗糖酶 (levansucrase) 作用於蔗糖及乳糖以生產乳果糖 (Han, 1990)。嘉鱾 (*Pagrus major*)、虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 及鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸 (Kihara *et al.*, 1995; Kihara and Sakata, 2001, 2002)。Tran *et al.* (2020) 指出，魚隻腸道中短鏈脂肪酸 (醋酸、丙酸及丁酸等) 主要來自腸道中厭氧菌發酵碳水化合物，有助於強化腸道構造與功能，提升魚隻成長、食物消化、活存率、免疫反應與疾病抵抗能力。Silverio *et al.* (2015) 報導，人類、狗、貓及雞攝食乳果糖後顯著增加腸道內益生菌 - 乳酸桿菌 (*Lactobacillus* spp.) 及雙歧桿菌 (*bifidobacteria*)，而減少害菌 - 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium perfringens*) 的產生。

果聚糖 (levan) 是一種果糖的聚合物，已知有多種微生物可以分泌果聚糖蔗糖酶作用於蔗糖而生產果聚糖 (Han, 1990)。果聚糖具益菌質功能 (Dal Bello *et al.*, 2001; Korakli *et al.*, 2002; Semjonovs and Zikmanis, 2007; Huang *et al.*, 2013)，並具有抗腫瘤 (Calazans *et al.*, 1997; 黃等, 2010; Yoon *et al.*, 2004) 及提升免疫能力 (Calazans *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010) 等保健功效。

在水產養殖研究上，果聚糖對於鯉魚及露斯塔野鯪 (*Labeo rohita*) 稚魚具有免疫調節的效果，並且提升對產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 之抵抗能力 (Rairakhwada *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008, 2014, 2018)。Gupta *et al.* (2010) 將果聚糖添加於露斯塔野鯪稚魚飼料中餵食後，魚隻體內熱休克蛋白質 70 (heat shock protein 70) 含量明顯增加，對於較高溫 (35°C) 環境之耐受能力明顯提高。因此，Gupta *et al.* (2011) 認為，微生物所產果聚糖在水產養殖上是很理想的免疫激活物。Huang *et al.* (2015) 指出，點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 經餵食添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 所產果聚糖飼料後，試驗組最終體重及增重率均較對照組明顯增加 ($p < 0.05$)。餵食添加果聚糖組石斑魚腸道中的總好氣性生菌數及弧菌數均明顯較對照組為低 ($p < 0.05$)，此外，血清中免疫指數及哈維氏菌 (*Vibrio harveyi*) 攻擊後活存率，均以

餵食含果聚糖飼料的魚隻最高，且統計上與對照組有明顯差異 ($p < 0.05$)。

一般合益素 (synbiotic) 為結合使用益生菌及益菌質，其所產生提升水產生物成長及細菌性疾病的抵抗力之效益，通常比二者單獨使用效果的總合還高，牙鯪 (*Paralichthys olivaceus*) 餵食含有 *Bacillus* spp. + β -gluco-oligosaccharides 飼料，對於成長及抗病力有加乘的效用 (Hasan *et al.*, 2018)。鯉魚餵食添加 *B. subtilis* + β -glucan 飼料，有助於提升魚隻成長、腸道中消化酵素活性、魚隻肉片的品質及血液中多項免疫指標 (Cao *et al.*, 2019)。

現今市場應用較廣泛之寡糖與聚糖的來源除了大豆寡糖萃取自大豆，乳酮糖 (lactulose) 是利用化學合成外，其他寡糖多是使用酵素方式取得 (Nakakuki, 2005)。聚糖方面，聚葡萄糖主要從真菌及酵母菌等微生物或部分藻類之細胞壁萃取純化 (Robertson *et al.*, 1994)。上述方式大多須要經過繁瑣之萃取及純化等步驟，取得較為不易，因此價格高昂，雖然作為養殖生物的免疫激活物之功效良好，因價位仍然偏高，因此推廣不易。

黃等 (2011) 先前研究中述及，自海水吳郭魚養殖池中篩選出以果聚糖蔗糖酶作用於蔗糖而生產果聚糖量較高之益生菌 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55，果聚糖蔗糖酶作用於蔗糖及乳糖能產生乳果糖；Huang *et al.* (2015) 指出，飼料中添加 2.5% 果聚糖可以有效促進點帶石斑的成長及疾病抵抗能力。由於 *B. licheniformis* 為許多水產生物腸道中天然菌相之一 (Ramesh *et al.*, 2015)，且具有抑制多種病原菌之功能 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Andriani *et al.*, 2017)，因此，*B. licheniformis* 具有作為益生菌的特點，而其寡糖與果聚糖產物具有作為益菌質之特性，結合該菌及其寡糖與聚糖產物的合益素在水產養殖應該有良好的發展潛力。不過，目前文獻上很少有此類合益素組合於水產養殖的相關應用。黃等 (2020) 指出，點帶石斑飼料中添加益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其乳果糖與果聚糖產物有助於降低魚隻腸道中弧菌數，增加石斑魚消化酵素活性之特性。本研究探討點帶石斑飼料中添加益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其乳果糖與果聚糖產物，對於石斑魚隻糞便中短鏈脂肪酸、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、實驗用益生菌

本研究用以產生乳果糖及果聚糖之益生菌為黃等 (2011) 自海水吳郭魚養殖池中篩選出的 *B. licheniformis* FRI MY-55 菌株。

二、實驗用飼料之製作

實驗飼料共有 3 組，分別為：(1) 對照組 (未添加益生菌)、(2) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g)+乳果糖 (0.15%) 的培養液及 (3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g)+果聚糖 (0.15%) 的培養液。益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55、乳果糖及果聚糖之製備及定量與實驗用飼料之製作請參閱黃等 (2020)。

對照組的基礎培養液組成包括酵母萃取物 (yeast extract) 5 g、蛋白胨 (peptone) 5 g、磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 1 g、硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 g、氯化鈉 (NaCl) 30 g，溶於蒸餾水 1 L，於培養基滅菌前調整 pH 為 6.5。

將益生菌接種於含 10% 乳糖及 10% 蔗糖之基礎培養液 28°C 震盪培養 48 hr，可以得到含有益生菌+乳果糖的培養液，菌數達 10^9 CFU/mL 以上，培養液中產生約 50 mg/mL 乳果糖，此益生菌+乳果糖的培養液作為飼料中益生菌+乳果糖的添加來源。

將益生菌接種於含 20% 蔗糖之基礎培養液 28°C 震盪培養 48 hr，可以得到含有益生菌+果聚糖的培養液，菌數達 10^9 CFU/mL 以上，培養液中產生約 50 mg/mL 果聚糖，此此益生菌+果聚糖的培養液作為飼料中益生菌+果聚糖的添加來源。

各組飼料製作方式如下：(1) 對照組係以未接種細菌之培養液直接添加於商業飼料；(2) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55+乳果糖的培養液組則以製備含有 *B. licheniformis* FRI MY-55+乳果糖之培養液添加於飼料及 (3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55+果聚糖的培養液組則以所製備含有 *B. licheniformis* FRI MY-55+果聚糖之培養液添加於飼料。各組培養液添加比例為 1 kg 飼料添加 30 ml 培養 (菌) 液。先將培養

(菌) 液加入 50 g 飼料混和均勻，再加入 100 g 飼料混和均勻，再慢慢加入 1 kg 所剩下的飼料量並攪拌均勻，最終得到混和均勻培養 (菌) 液的飼料，以烘箱加熱乾燥 (45°C, 48 hr)。

將上述各培養 (菌) 液添加在成鰻配合飼料 (福壽牌，福壽實業股份有限公司，台中，臺灣) 並攪拌均勻，以烘箱加熱乾燥飼料後，再添加 5% 沙拉油於飼料表層，以避免投餵魚隻後，包覆在飼料外層之益生菌、寡糖或聚糖迅速溶於水中。所製成之飼料於 4°C 冷藏 1 個月，含益生菌組之飼料 (第 2 及 3 組) 每週取樣，檢測飼料內益生菌殘存量，在益生菌含量仍為 10^7 CFU/g 期限內投餵與石斑魚，進行動物試驗。

三、魚隻糞便中短鏈脂肪酸及乳酸之測定

(一) 實驗用魚 (動物試驗申請核准編號 10203)

實驗所用之 300 尾點帶石斑約 32 g，購自民間養殖場，蓄養於水產試驗所內 4 個循環 FRP (500 L) 桶中 2 週，水溫維持在 $28 \pm 1^\circ C$ 。

(二) 飼養方法

實驗共有 3 組，每組 3 重複。試驗用魚體型大小約 34 ± 8 g，隨機放入 9 個 82 L 大的玻璃缸，每缸 20 尾魚。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%，每 2 週量測魚隻體重一次並調整投餵量，每次投餵 30 分鐘後，將未被攝食的殘餌撈起，計數殘餌數量，自投餵量中扣除。實驗期間水溫控制在 $28 \pm 1^\circ C$ ，每日換水三分之一。試驗共進行 10 週。

(三) 魚隻糞便中短鏈脂肪酸及乳酸之測定

試驗滿 5 及 10 週時，將手抄網置於各個玻璃缸的排水口收集魚隻糞便 1 天，經離心 ($5,000 \times g$, 15 min)，收集上清液以 0.22 μm 膜過濾後，再以 HPLC (Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 進行分析各短鏈脂肪酸 (醋酸、丙酸、丁酸) 及乳酸組成 (Kihara and Sakata, 1997)，檢測器為折射計 (Waters, 2414)，分離管柱為 IC Sep 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 $65^\circ C$ ，並以各短鏈脂肪酸 (醋酸、丙酸、丁酸) 及

乳酸標準品 (Merck) 配製不同濃度, 同樣以 HPLC 進行分析, 依各標準品不同濃度層析之波峰, 分別製作醋酸、丙酸、丁酸及乳酸之標準曲線; 將樣品層析之波峰所得的面積帶入醋酸、丙酸、丁酸及乳酸製得之標準曲線所求得的公式計算, 即可算出樣品中醋酸、丙酸、丁酸及乳酸的濃度, 單位為 mM。

四、魚隻之非特異性免疫反應之測定

魚隻分別在餵食 10 週及病原菌攻擊後 9 天, 每組採集 9 尾魚隻之血清進行免疫指數分析。

(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, 用於血清總蛋白質、白蛋白、球蛋白、抗蛋白酶 (antiprotease) 及溶菌酶 (lysozyme) 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活性 (respiratory burst activity, RBA) 之測定。

(三) 免疫指數分析

1. 血清總蛋白質、白蛋白及球蛋白測定

總蛋白質及白蛋白之測定係利用 Randox (RANDOX Laboratories, Antrim, UK) 之血清總蛋白質及白蛋白測試套組進行, 球蛋白含量係以總蛋白質及白蛋白之差值估算。

2. 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 分鐘; 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:

抑制胰蛋白酶百分比 = (空白組胰蛋白酶的吸光值 - 樣品的吸光值) / 空白組胰蛋白酶的吸光值 × 100%

3. 溶菌酶活性測定

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 分鐘紀錄在波長 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, 紀錄第 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。

4. 呼吸爆之測定

呼吸爆測定方法是參照 Secombes (1990) 及 Stasiack and Baumann (1996), 並修改自 Cook *et al.* (2001) 及 Dügenci *et al.* (2003) 所述之 Nitroblue tetrazololum (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 μ L 之 zymosan (0.2%) 及 HBSS，於室溫誘發反應 30 min 後去除上清液，加入 100 μ L 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 μ L 2 M KOH 及 140 μ L dimethylsulfoxide (DMSO) 以溶解 cytoplasmic formazon，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活性 (respiratory burst activity, RBA) (Pick and Mizel, 1981)，來表示巨噬細胞產生超氧陰離子之增減。

五、魚隻抵抗病原菌之測定

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

將病原菌 - 哈維氏弧菌接種於胰蛋白酶大豆液體培養液 (tryptic soy broth, TSB)，於 28°C 下培養 24 hr，將培養液離心 (8000 \times 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 3 組不同飼料 10 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。

六、統計分析

各試驗結果以 SAS 套裝軟體 (Version 14.0) 進行單因子變異數 (one way analysis of variance, ANOVA) 統計分析，並以 Duncan's test 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、乳果糖及果聚糖對於魚隻糞便中短鏈脂肪酸及乳酸含量之影響

點帶石斑動物試驗第 5 週後魚隻糞便的短鏈脂肪酸及乳酸之含量分析結果顯示，餵食添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組點帶石斑糞便內短鏈脂肪酸 (醋酸、丙酸、丁酸) 及乳酸之總含量最高 (28.84 mM)，其次為餵食 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組 (22.81 mM)，而對照組之總短鏈脂肪酸及乳酸最低 (15.11 mM) (Fig. 1A)。10 週後，餵食含 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組總短鏈脂肪酸及乳酸最高 (62.46 mM)，其次為 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組 (50.33 mM)，對照組最低 (41.28 mM) (Fig. 1B)。

Kihara *et al.* (1995) 報導，嘉鱻魚腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸。Kihara and Sakata (2001) 指出，虹鱈腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸，其中以異丁酸含量最高。Kihara and Sakata (2002) 報導，鯉魚腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸，其中醋酸、丙酸及丁酸等之總含量較未添加乳果糖的對照組高。綜合上述文獻顯示，雜食及肉食性魚類的腸內菌均可以發酵乳果糖。Kihara (2008) 指出，嘉鱻魚餵飼添加乳果糖 (0.24%) 飼料後，試驗組魚隻腸道內容物的短鏈脂肪酸含量較對照組增加 ($p < 0.001$)，試驗組魚隻胃及腸的重量明顯大於對照組 ($p < 0.05$)。此外，Kihara *et al.* (1995) 報導，嘉鱻魚餵飼添加乳果糖飼料後，試驗組魚隻腸道肌層 (tecnica muscularis) 較對照組厚且強韌，Kihara *et al.* (1995) 認為乳果糖可以刺激腸道肌層的發展。黃等 (2020) 指出，點帶石斑飼料中添加益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 及乳果糖有助於降低魚隻腸道中之弧菌數。Vázquez *et al.* (2005) 報導，分離自凝乳 (pressed cured) 的 *Leuconostoc 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)。Tran *et al.* (2020) 指出，魚隻腸道中短鏈脂肪酸 (醋酸、丙酸及丁酸等) 主要來自腸道中厭氧菌發酵碳水化合物，短鏈脂肪酸有助

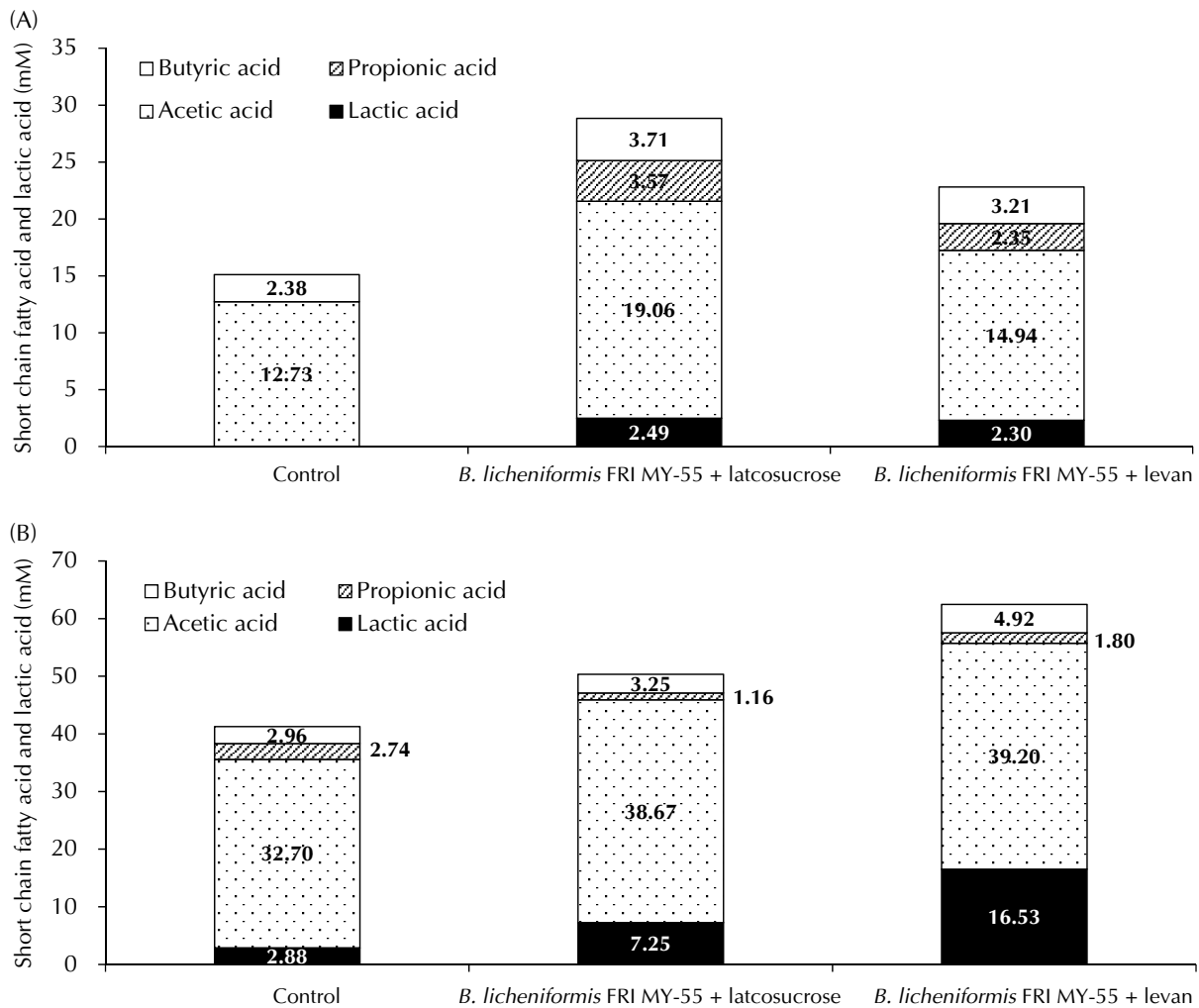


Fig. 1 The levels of short-chain fatty acid and lactic acid in feces of spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed experimental diets for (A) 5 weeks and (B) 10 weeks.

於提升魚隻成長、食物消化、活存率、免疫反應及疾病抵抗能力，也有助於強化腸道構造與功能。

Li and Kim (2013) 研究指出，添加 0.05 – 0.2% 果聚糖於飼料中餵食豬隻後，試驗組豬隻糞便中的乳酸桿菌量依果聚糖添加量提高而上升。Zhao *et al.* (2013a) 報導，豬攝食含 1.0% 及 2.0% 果聚糖飼料，試驗組豬隻糞便中乳酸桿菌量較對照組增加，大腸菌減少 ($p < 0.001$)，又，試驗組糞便中的氨及硫化氫含量亦較對照組下降 ($p < 0.05$)。Zhao *et al.* (2013b) 指出，雞分別攝食 0.25% 及 0.50% 果聚糖飼料後，試驗組雞隻腸道中乳酸菌量增加，大腸菌及產氣莢膜梭狀芽孢桿菌減少。Huang *et al.* (2015) 報導，點帶石斑經餵食添加 0.5 – 5.0% *B. licheniformis* FRI MY-55 所產果聚糖飼料，試驗組石斑魚腸道中的弧菌數均

明顯較對照組為低 ($p < 0.05$)。黃等 (2020) 指出，點帶石斑飼料中添加益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 及果聚糖有助於降低魚隻腸道中弧菌數。

本試驗飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 所產的乳果糖及果聚糖可以增加點帶石斑糞便中短鏈脂肪酸及乳酸含量，與嘉鱘飼料添加乳果糖飼料後，試驗組魚隻腸道內容物的短鏈脂肪酸含量較對照組增加之現象相近 (Kihara, 2008)。由於乳果糖及果聚糖均為非消化性的食物原料，因此是益菌質 (Huang *et al.*, 2013; Silverio *et al.*, 2015)，動物攝食乳果糖及果聚糖後，腸道中的消化酵素幾乎無法水解它們，乳果糖及果聚糖會到達直腸，由益生菌代謝利用，先水解成單糖後，糖類通過糖解作用 (glycolysis) 生成丙酮酸 (pyruvate)，再經乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase) 作用形成乳

Table 1 Levels of serum total protein, albumin, and globulin in experimental spotted grouper (*Epinephelus coioides*) pre- and post-*Vibrio harveyi* challenge

| Treatment | Total protein (mg/ml) | | Albumin (mg/ml) | | Globulin (mg/ml) | |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Pre- | Post- | Pre- | Post- | Pre- | Post- |
| Control | 53.55 ± 1.89 ^a | 51.79 ± 4.06 ^a | 7.65 ± 1.38 ^a | 9.15 ± 1.09 ^a | 45.91 ± 0.51 ^a | 42.13 ± 5.41 ^a |
| <i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + lactosucrose | 63.32 ± 0.77 ^b | 50.25 ± 0.81 ^a | 8.25 ± 2.34 ^a | 9.84 ± 1.62 ^a | 55.07 ± 3.12 ^b | 40.69 ± 1.02 ^a |
| <i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + levan | 62.82 ± 1.46 ^b | 61.59 ± 6.43 ^b | 7.60 ± 0.79 ^a | 8.95 ± 0.88 ^a | 52.22 ± 0.67 ^b | 53.26 ± 9.31 ^a |

Values in the same column with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

酸 (Garvie, 1980)，或是經過磷酸解酮酶 (phosphoketolase) 代謝生成乳酸及醋酸等 (Landon, 1976)。故，推測，點帶石斑飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖及果聚糖可以增加益生菌作用基質，益生菌增殖，產生較多的之短鏈脂肪酸，可以使腸道造成較酸的環境，抑制有害微生物之繁殖，有利於飼養生物之健康。又，在第 5 週後，點帶石斑飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖組糞便之短鏈脂肪酸較 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的果聚糖組為高，推測原因是乳果糖為寡糖，分子量較果聚糖為小，因此益生菌作用之效益較高，產生較高量之短鏈脂肪酸及乳酸。

二、飼料中添加益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚隻免疫指數之影響

點帶石斑分別餵食 3 種不同飼料 10 週後，在對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中總蛋白量及球蛋白量分別為 53.55、63.32、62.82 及 45.91、55.07、52.22 mg/mL，統計上，試驗組石斑魚血清中總蛋白量及球蛋白量均較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 1)，而以病原菌攻擊後，對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中總蛋白量及球蛋白量分別為 51.79、50.25、61.59 及 42.13、40.69、53.26 mg/mL，含 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中總蛋白量較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 1)。

在對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中抗蛋白酶活性分別為 42.8、47.8 及 46.3%，統計上，試驗組與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$) (Table 2)。以病原菌攻擊後，對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中抗蛋白酶活性分別為 62.1、69.9 及 61.1%，統計上亦無顯著差異 ($p > 0.05$) (Table 2)。

對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中溶菌酶活性分別為 2.63、15.03 及 14.87 U/mL，統計上，試驗組明顯較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 2)。以病原菌攻擊後，對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血清中溶菌酶活性分別為 3.61、12.50 及 11.33 U/mL，統計上，試驗組亦明顯較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 2)。

在對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血液中呼吸爆分別為 0.47、0.50 及 0.52，統計上，試驗組與對照組無明顯差異 ($p > 0.05$) (Table 2)。以病原菌攻擊後，對照組、添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚隻血液中呼吸爆分別為 0.47、1.07 及 1.03，統計上，試驗組明顯較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 2)。

尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 餵食含 *B. licheniformis* ($4.0 \times 10^6 - 2.0 \times 10^7$ CFU/g) 的飼料 10 週後，試驗組魚隻的補體 3 及溶菌酶均高於

Table 2 Levels of serum antiprotease activity, lysozyme activity, and respiratory burst of experimental groups of spotted grouper (*Epinephelus coioides*) pre- and post-*Vibrio harveyi* challenge

| Treatment | Antiprotease activity (%) | | Lysozyme activity (U/ml) | | Respiratory burst | |
|--|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Pre- | Post- | Pre- | Post- | Pre- | Post- |
| Control | 42.8 ± 6.60 ^a | 62.1 ± 3.82 ^a | 2.63 ± 1.03 ^a | 3.61 ± 2.56 ^a | 0.47 ± 0.11 ^a | 0.47 ± 0.11 ^a |
| <i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + lactosucrose | 47.8 ± 6.61 ^a | 69.9 ± 4.40 ^a | 15.03 ± 6.07 ^b | 12.50 ± 6.16 ^b | 0.50 ± 0.14 ^a | 1.07 ± 0.14 ^b |
| <i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + levan | 46.3 ± 4.84 ^a | 61.1 ± 5.31 ^a | 14.87 ± 5.46 ^b | 11.33 ± 4.01 ^b | 0.52 ± 0.13 ^a | 1.03 ± 0.13 ^b |

Values in the same column with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

對照組 ($p < 0.05$) (Han *et al.*, 2015)。非洲鯰魚 (*Pangasianodon hypophthalmus*) 飼食含有病原菌 - 腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、含 *B. licheniformis* (10^5 及 10^7 CFU/g) 及含有腸炎弧菌 + *B. licheniformis* (10^5 及 10^7 CFU/g) 的飼料 24 天後，*B. licheniformis* 10^5 CFU/g 試驗組魚隻的免疫指標高於對照組 ($p < 0.05$) (Gobi *et al.*, 2016)。吳郭魚 (*Oreochromis spp.*) 飼食含 *B. licheniformis* (10^5 與 10^7 CFU/g) 的飼料，試驗組魚隻的溶菌酶高於對照組 ($p < 0.05$) (Gobi *et al.*, 2018)。草魚 (*Ctenopharyngodon idella*) 飼食含 *B. licheniformis* (10^5 - 10^6 CFU/g) 的飼料 56 天後，試驗組魚隻的多項免疫指標均高於對照組 ($p < 0.05$) (Qin *et al.*, 2020)。

白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 飼養於添加 *B. licheniformis* (10^5 CFU/mL) 池水中 (試驗組)，結果顯示其血液中總血球數量較對照組增加 ($p < 0.05$)，顯示免疫調節狀況較對照組佳 (Li *et al.*, 2007)。淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 飼食含 *B. licheniformis* (1.0×10^6 - 1.0×10^9 CFU/g) 飼料 60 天後，試驗組蝦隻的多項免疫指標均高於對照組 ($p < 0.05$) (Kumar *et al.*, 2013)。

Raida *et al.* (2003) 以含 *B. licheniformis* (4.0×10^4 CFU/g) + *B. subtilis* (4.0×10^4 CFU/g) 飼料飼食虹鱔 42 天後，結果顯示試驗組魚隻的抗體、白血球及血漿蛋白質量均高於對照組 ($p < 0.05$)。Li *et al.* (2012) 在草魚養殖池水中添加 *B. licheniformis* (10^8 CFU/m³) + *B. subtilis* (10^8 CFU/m³)，結果發現試驗組魚隻的免疫球蛋白及多項免疫指標及抗氧化能力均高於對照組 ($p < 0.05$)。

魴魚 (*Megalobrama terminalis*) 飼食含 *B. licheniformis* (10^7 CFU/g) 及 *B. licheniformis* (10^7 CFU/g) + 果寡糖 (fructooligosaccharide) (0.3%) 等 3 組飼料 8 週後，試驗組魚隻血液中的白血球數量、免疫球蛋白、補體及總血清濃度均高於對照組 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2013)。

斑節蝦 (*Penaeus japonicas*) 飼食含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖 (isomaltooligosaccharide) 的飼料 8 週後，試驗組蝦隻的原酚氧化酶及溶菌酶均高於對照組 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2011)。白蝦飼食含 *B. licheniformis* (10^8 CFU/g) + *B. subtilis* (10^4 CFU/g) 的飼料 60 天後，試驗組蝦隻的血清中總蛋白、溶菌酶及紅血球數量均高於對照組 ($p < 0.05$) (Madani *et al.*, 2018)。

果聚糖對於鯉魚及露斯塔野鯪稚魚具有免疫調節的效果，Rairakhwada *et al.* (2007) 指出，鯉魚飼食含 0.2、0.5 及 1.0% 的果聚糖之飼料 75 天後，飼食含有 0.5% 果聚糖飼料的魚隻，血液中總紅血球數量、血紅素含量、血清蛋白質、球蛋白含量、呼吸爆裂活性及溶菌酶活性等免疫指標均明顯高於對照組 ($p < 0.05$)。Gupta *et al.* (2008) 報導，於露斯塔野鯪稚魚飼料中添加 0.25、0.5、0.75、1.0、及 1.25% 的果聚糖，投餵 60 天後發現，飼食含有 1% 以上果聚糖飼料的魚隻，血液中總紅血球數量、血紅素含量、總白血球數量、血清蛋白質、球蛋白含量、呼吸爆裂活性及溶菌酶活性等免疫指標均明顯高於對照組 ($p < 0.05$)。Gupta *et al.* (2018) 指出，露斯塔野鯪稚魚飼食飼料中添加 1.25% 的果聚糖試驗組 60 天，試驗組魚隻之腸道、鰓、腎及肝臟中多項細胞激素均明顯高於對照組 ($p < 0.05$)。

此外，Gupta *et al.* (2010) 將果聚糖添加 1.0 及 1.25% 於露斯塔野鯪稚魚飼料中餵食 60 天 (26°C) 後，魚隻體內熱休克蛋白質 70 含量明顯增加，而且魚隻對於較高溫 (35°C) 環境之耐受能力明顯提高；因為熱休克蛋白質 70 可以維持生物體內功能性蛋白質的穩定性 (Das *et al.*, 2006)，也可以刺激體內非特异性防禦機制 (Gupta *et al.*, 2008)，使受測試魚隻耐較高溫之能力增加。因此，Gupta *et al.* (2011) 認為，微生物所產果聚糖在水產養殖上是很理想的免疫激活物。

Gupta *et al.* (2014) 指出，鯉魚飼料中添加次死劑量 (sublethal dosage) 的殺蟲劑 (fipronil)，再分別添加 0.25、0.50 及 0.75% 果聚糖於飼料中餵食鯉魚 45 天後，試驗組魚隻血液中血紅素、總血清蛋白、呼吸爆及溶菌酶均顯著高於對照組 ($p < 0.05$)，Gupta *et al.* (2013, 2014) 認為，果聚糖有助於改善鯉魚受到殺蟲劑的壓力，同時調節免疫力。

Li and Kim (2013) 研究指出，添加 0.05 - 0.2% 果聚糖於飼料中餵食豬隻 42 天後，以大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 攻擊後，試驗組白血球及淋巴細胞數量顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。

本研究試驗組飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖及果聚糖明顯提高點帶石斑血清中總蛋白、球蛋白、溶菌酶及呼吸爆等免疫指標，與吳郭魚、非洲鯰魚、草魚、白蝦及淡水長臂大蝦攝食含有 *B. licheniformis* 之飼料 (Li *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015; Gobi *et al.*, 2016; Gobi *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020)、鯉魚及露斯塔野鯪攝食含有果聚糖之飼料 (Rairakhwada *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2018) 等，有效提升魚蝦多項免疫指標的現象相近。又，飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖組，點帶石斑血清中球蛋白、溶菌酶及呼吸爆等免疫指標，稍高於添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產果聚糖組，雖然統計上並沒有明顯差異。

三、飼料中添加益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚隻抵抗病原菌之影響

本研究石斑魚經 10 週飼育試驗後，以哈維氏弧菌攻擊，在對照組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組、*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組魚

隻存活率分別為 38.6、90.5 及 67.3% (Fig. 2)，其中以餵食含 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖組的存活率最高，其次為 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組，且統計上與對照組均有明顯差異 ($p < 0.05$)。

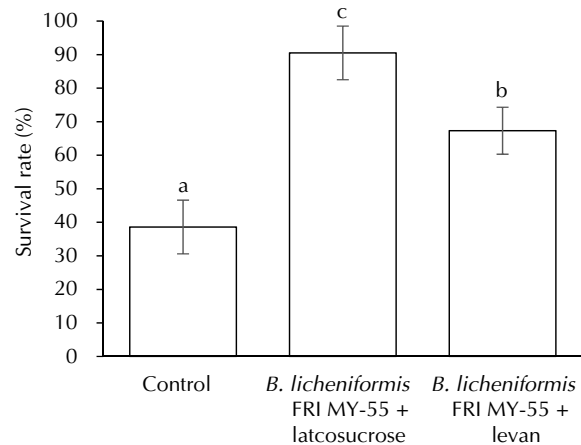


Fig. 2 The survival rate after *Vibrio harveyi* challenge of spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed experimental diets for 10 weeks. Columns with different letters above the error bars are significantly different ($p < 0.05$).

Nakayama *et al.* (2009) 指出，*B. licheniformis* 培養溶液的上清液具有抑制哈維氏弧菌生長之特性，降低哈維氏弧菌的溶血能力，也會減弱哈維氏弧菌的毒性。Cladera-Olivera *et al.* (2004) 報導，*B. licheniformis* 會產生類似 bacteriocin 的抗菌物質，該物質可以抑制食品中的李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 及鏈球菌 (*Streptococcus* spp.) 等致病菌。自發酵粥中分離的 *B. licheniformis* 可以抑制多種食品病原菌，包括金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、李斯特菌、痢疾志賀氏菌 (*Shigella flexneri*)、鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 及大腸菌 (Wang *et al.*, 2010)。Andriani *et al.* (2017) 指出，*B. licheniformis* 可以抑制金黃色葡萄球菌及大腸菌。

吳郭魚餵食含 *B. licheniformis* (4.0×10^6 - 2.0×10^7 CFU/g) 的飼料 10 週後，以瓶鼻海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 進行攻擊後，試驗組魚隻的活存率明顯較對照組提高 ($p < 0.05$)，此外，試驗組魚隻腸道的絨毛較對照組完整 (Han *et al.*, 2015)。非洲鯰魚餵食含有腸炎弧菌、含 *B.*

licheniformis (10^5 及 10^7 CFU/g) 及含有腸炎弧菌 + *B. licheniformis* (10^5 及 10^7 CFU/g) 的飼料 24 天後，餵食含有腸炎弧菌 + *B. licheniformis* (10^5 CFU/g) 的魚隻的活存率明顯較含有腸炎弧菌組為高 ($p < 0.05$) (Gobi *et al.*, 2016)。吳郭魚餵食含 *B. licheniformis* (10^5 與 10^7 CFU/g) 的飼料，以產氣單胞菌進行攻擊後，試驗組魚隻的活存率明顯較對照組提高 ($p < 0.05$) (Gobi *et al.*, 2018)。草魚餵食含 *B. licheniformis* ($10^5 - 10^6$ CFU/g) 的飼料後，以產氣單胞菌進行攻擊後，試驗組魚隻的活存率明顯較對照組高 ($p < 0.05$)，又，試驗組魚隻腸道的絨毛較對照組長，顯示腸道之屏障較強 (Qin *et al.*, 2020)。

淡水長臂大蝦餵食含 *B. licheniformis* ($1.0 \times 10^6 - 1.0 \times 10^9$ CFU/g) 的飼料，以溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 進行攻擊後，試驗組蝦隻的活存率明顯較對照組高 ($p < 0.05$)，其中又以 1.0×10^9 CFU/g 的最高 (Kumar *et al.*, 2013)。

虹鱒餵食添加 *B. licheniformis* (4.0×10^4 CFU/g) + *B. subtilis* (4.0×10^4 CFU/g) 的飼料 42 天後，以魯氏耶爾森氏菌 (*Yersinia ruckeri*) 進行攻擊後，試驗組魚隻的活存率明顯較對照組提高 ($p < 0.05$) (Raida *et al.*, 2003)。牙鯪餵食含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + *B. pumilus* 的飼料後，以瓶鼻海豚鏈球菌進行攻擊後，試驗組魚隻的活存率明顯較對照組高 ($p < 0.05$) (Cha *et al.*, 2013)。魴魚餵食含 *B. licheniformis* (10^7 CFU/g) 及 *B. licheniformis* (10^7 CFU/g) + 果寡糖 (0.3%) 等 3 組飼料 8 週後，以產氣單胞菌進行攻擊後，*B. licheniformis* + 果寡糖組魚隻的活存率明顯較對照組提高 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2013)。

斑節蝦餵食含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料 8 週後，以溶藻弧菌進行攻擊感染，試驗組的活存率顯著地高於對照組 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2011)。

Rairakhwada *et al.* (2007) 指出，鯉魚餵食含 0.2、0.5 及 1.0% 的果聚糖之飼料，投餵 75 天後，以產氣單胞菌攻擊感染，添加 0.50% 果聚糖試驗組的活存率顯著地高於對照組 ($p < 0.05$)。Gupta *et al.* (2008) 報導，於露斯塔野鯪稚魚飼料中添加 0.25、0.5、0.75、1.0、及 1.25% 的果聚糖，投餵 60 天，以產氣單胞菌攻擊感染，添加 1.0% 以上果聚糖試

驗組的活存率顯著地高於對照組 ($p < 0.05$)。

本研究試驗組飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖及果聚糖，明顯提高點帶石斑在遭受哈維氏弧菌攻擊後之活存率，與吳郭魚、非洲鯰魚、草魚及淡水長臂大蝦攝食含有 *B. licheniformis* 之飼料 (Kumar *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015; Gobi *et al.*, 2016; Gobi *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020)、鯉魚及露斯塔野鯪攝食含有果聚糖之飼料 (Rairakhwada *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2018) 等，有效提升魚蝦在遭受病原菌攻擊後之活存率的效果一致。又，飼料中添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖組，點帶石斑在遭受哈維氏弧菌攻擊後之活存率也明顯高於添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產果聚糖組，可能與 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產的乳果糖組，石斑血清中球蛋白、溶菌酶及呼吸爆等免疫指標，稍高於添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產果聚糖組有密切關係。

綜合上述文獻顯示，*B. licheniformis* 具有抑制哈維氏弧菌及多種人類病原菌之特性 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Andriani *et al.*, 2017)。魚隻腸內細菌可以發酵乳果糖，產生短鏈脂肪酸 (Kihara and Sakata, 2001, 2002; Kihara *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2020)。乳果糖及果聚糖均為益菌質，動物及人類攝食含有乳果糖飼料或果聚糖食物後，顯著增加腸道內益生菌、降低腸道之酸鹼度及減少壞菌 (Huang *et al.*, 2013; Li and Kim, 2013; Zhao *et al.*, 2013a, b; Silverio *et al.*, 2015)。又，魚蝦攝食含有 *B. licheniformis* (Li *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015; Gobi *et al.*, 2016; Gobi *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020) 或含有果聚糖之飼料 (Rairakhwada *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2018)，有效提升魚蝦多項的免疫指標，並提高魚蝦在遭受病原菌攻擊後之活存率。

本研究顯示，試驗組中 *B. licheniformis* FRI MY-55 具有增強石斑抵抗病原菌之效果，而其產物-乳果糖及果聚糖，則可以做為腸內細菌發酵的基質，產生較高量的短鏈脂肪酸及乳酸，降低腸道之酸鹼度及減少壞菌，增加石斑免疫效能，增強抵抗病原菌之能力，因此有利於維持飼養生物的健康。

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, 黃詩涵, 方佩琪, 林金榮 (2010) 以微生物生產果聚糖及其應用. 水試專訊, 31: 20-24.
- 黃美瑩, 陳柏璇, 黃詩涵, 林金榮, 潘崇良 (2011) 海水吳郭魚養殖池中果聚糖生產菌之篩選. 水產研究, 19 (2): 77-91.
- 黃美瑩, 朱惠真, 曾亮璋, 曾福生 (2020) 點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 飼料中添加益生菌 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 及其所產乳果糖與果聚糖產物對於魚隻成長之影響. 水產研究, 28 (2): 37-56.
- Andriani, Y., R. Safitri, E. Rochima and S. D. Fakhruhin (2017) Characterization of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* potentials as probiotic bacteria in Vanamei shrimp feed (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Nisant. Biosci., 9 (2): 188-193.
- 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.
- Calazans, G. M. T., C. E. Lopes, R. M. O. C. Lima and F. P. de França (1997) Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnol. Lett., 19 (1): 19-21.
- Calazans, G. M. T., R. C. Lima, F. P. de França and C. E. Lopes (2000) Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. Int. J. Biol. Macromol., 27: 245-247.
- Cao, H., R. Yu, Y. Zhang, B. Hu, S. Jian, C. Wen, K. Kajbaf, V. Kumar and G. Yang (2019) Effects of dietary supplementation with β -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). Aquaculture, 508: 106-112.
- Cha, J. H., S. Rahimnejad, S. Y. Yang, K. W. Kim and K. J. Lee (2013) Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. Aquaculture, 402: 50-57.
- Chua, F. H. C., M. L. Ng, K. L. Ng, L. L. Loo and J. Y. Wee (1994) Investigation of outbreaks of a novel disease, "sleepy grouper disease" affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. J. Fish. Dis., 17: 417-427.
- Cladera-Olivera, F., G. R. Caron and A. Brandelli (2004) Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. Lett. Appl. Microbiol., 38 (4): 251-256.
- 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.
- Dügenci, S. K., N. Arda and A. Candan (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J. Ethnopharmacol., 88: 99-106.
- Dal Bello, F. D., J. Walter, C. Hertel and W. P. Hammes (2001) In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. Syst. Appl. Microbiol., 24: 232-237.
- Das, T., A. K. Pal, S. K. Chakraborty, S. M. Manush, N. Chatterjee and S. K. Apte (2006) Metabolic elasticity and induction of heat shock protein 70 in *Labeo rohita* acclimated to three temperatures. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 19: 1033-1039.
- 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 Pub., Fair Haven, NJ, USA, 101-103.
- Fukuda, Y., H. D. Nguyem, M. Furuhashi and T. Nakai (1999) Mass mortality of cultured seven band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. Fish. Pathol., 31:165-170.
- Garvie, E. I. (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. Microbiol. Rev., 44:106-139.
- 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.
- Gibson, G.R. and M. B. Roberfroid (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr., 125: 1401-1412.
- Gobi, N., B. Malaikozhundan, V. Sekar, S. Shanthi, B. Vaseeharan, R. Jayakumar and A. K. Nazar (2016) GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2 infection and the protective effects of the probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 on the growth, immune and antioxidant responses in *Pangasius*

- hypophthalmus*. Fish Shellfish Immunol., 52: 230-238.
- Gobi, N., B. Vaseeharan, J. C. Chen, R. Rekha, S. Vijayakumar, M. Anjugam and A. Iswarya (2018) Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol., 74: 501-508.
- 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.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. S. Dalvi, M. S. Akhtar, A. K. Jha and K. Baruah (2010) Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. Aquaculture, 306: 398-402.
- Gupta, S. K., P. Das, S. K. Singh, M. S. Akhtar, D. K. Meena and S. C. Mandal (2011) Microbial levan, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture. World Aquacult., 42 (1): 61-63, 66.
- Gupta S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, A. K. Jha, M. S. Akhtar, S. C. Mandal, P. Das and A. K. Prusty (2013) Supplementation of microbial levan in the diet of *Cyprinus carpio* fry (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil: effect on growth and metabolic responses. Fish Physiol. Biochem., 39 (6):1513-24.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, N. Saharan, S. C. Mandal, C. Prakash, M. S. Akhtar and A. K. Prusty (2014) Dietary microbial levan ameliorates stress and augments immunity in *Cyprinus carpio* fry (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil. Aquacult. Res., 45 (5): 893-906.
- Gupta, S. K., B. Sarkar, S. Bhattacharjee, N. Kumar, S. Naskar and K. B. Uppuluri (2018) Modulation of cytokine expression by dietary levan in the pathogen aggravated rohu, *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, 495: 496-505.
- Han, Y. W. (1990) Microbial levan. Adv. Appl. Microbiol., 35: 171-194.
- Han, B., W. Q. Long, J. Y. He, Y. J. Liu, Y. Q. Si and L. X. Tian (2015) Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol., 46 (2): 225-231.
- Hasan, M. T., W. J. Jang, H. Kim, B. J. Lee, K. W. Kim, S. W. Hur, S. G. Lim, S. C. Bai and I. S. Kong (2018) Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus β -glucooligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol., 82: 544-553.
- 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.
- Heemstra, P. C. and J. E. Randall (1993) Groupers of the world. FAO Species Catalogue, Vol. 125, 382 pp.
- Huang, M. Y., C. F. Lee, S. T. Ho, K. J. Lin and C. L. Pan (2013) High-yield levan produced by *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 in high-sucrose medium and its prebiotic effect. J. Pure Appl. Microbiol., 7 (3): 1585-1599.
- Huang, M. Y., C. I. Chang, C. C. Chang, L. W. Tseng and C. L. Pan (2015) Effects of dietary levan on growth performance, nonspecific immunity, pathogen resistance, and body composition of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides* H.). Aquacult. Res., 46: 2752-2767.
- Kihara, M., K. Ohba and T. Sakata (1995) Trophic effect of dietary lactosucrose on intestinal tunica muscularis and utilization of this sugar by gut microbes in red seabream *Pagrus major*, a marine carnivorous teleost, under artificial rearing. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol., 112 (3-4): 629-634.
- 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. Part A: Physiol., 118 (4): 1201-1207.
- Kihara, M. and T. Sakata (2001) Influences of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in a micro-scale batch culture. J. Comp. Physiol. B, 171 (6): 441-447.
- 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. Part A: Mol. Integr. Physiol., 132 (2): 333-340.

- Kihara, M. (2008) Production of short-chain fatty acids from dietary lactosucrose in the hindgut and its effects on digestive organs of a marine teleost, red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult. Sci.*, 56 (3): 327-333.
- 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.
- Korakli, M., M. G. Gänzle and R. F. Vogel (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 958-965.
- Kumar, N. R., R. P. Raman, S. B. Jadhao, R. K. Brahmchari, K. Kumar and G. Dash (2013) Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquacult. Int.*, 21 (2): 387-403.
- Landon, J. (1976) The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Ann. Rev. Microbiol.*, 30: 279-301.
- Li, K., T. Zheng, Y. Tian, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang and H. Hong (2007) Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.*, 29 (4): 525-530.
- Li, W., X. Zhang, W. Song, B. Deng, Q. Liang, L. Fu, J. Zheng, Y. Wang and D. Yu (2012). Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 38 (6): 1585-1592.
- Li, J. and I. H. Kim (2013) Effects of levan-type fructan supplementation on growth performance, digestibility, blood profile, fecal microbiota, and immune responses after lipopolysaccharide challenge in growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 91:5336-5343.
- Liu, C., J. Lu, L. Lu, Y. Liu, F. Wang and M. Xiao (2010) Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour. Technol.*, 101: 5528-5533.
- Madani, N. S. H., T. J. Adorian, H. G. Farsani and S. H. Hoseinifar (2018) The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquacult. Res.*, 49 (5): 1926-1933.
- Nakakuki, T. (2005) Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan. *J. Appl. Glycosci.*, 52: 267-271.
- Nakayama, T., H. Lu and N. Nomura (2009) Inhibitory effects of *Bacillus* probiotics on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Let. Appl. Microbiol.*, 49 (6): 679-684.
- 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.
- Qin, L., J. Xiang, F. Xiong, G. Wang, H. Zou, W. Li, M. Li and S. Wu (2020) Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth, antioxidant capacity, intestinal barrier and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.*, 97: 344-350.
- Raida, M. K., J. L. Larsen, M. E. Nielsen and K. Buchmann (2003) Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Fish Shellfish Immunol.*, 26 (8): 495-498.
- Rairakhwada, D., A. K. Pal, Z. P. Bhatena, N. P. Sahu, A. Jha and S. C. Mukherjee (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 477-486.
- Ramesh, D., A. Vinothkanna, A. K. Rai and V. S. Vignesh (2015) Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*, 45 (2): 268-276.
- Robertsen, B., R. E. Ehgstad and J. B. Jorgensen (1994) β -glucan as immunostimulants in fish. *In* *Modulators of Fish Immune Response 1* (J. S. Stolen and T. C. Fletcher eds.), SOS Pub., Fair Haven, NJ, USA, 83-99.
- Secombes, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In* *Techniques in Fish Immunology* (J. S. Stolen, D. P. Fletcher, B. S. Anderson and W. B. Van Muiswinkel eds.), SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, 137-152.
- Semjonovs, P. and P. Zikmanis (2007) An influence of levan on the fermentation of milk by a probiotic

- ABT-type starter. *J. Food Technol.*, 5 (2): 123-130.
- Shoemaker, C. and P. Klesius (1997) Streptococcal disease problems and control: A review. *In* Tilapia Aquaculture (K. Fitzsimmon ed.), Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY, USA, Vol. 2, pp. 671-680.
- Silverio, S. C., E. A. Macedo, J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues (2015) Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: A review. *J. Funct. Foods*, 19: 74-90.
- Stasiack A. S. and C. P. Baumann (1996) Neutrophil activity as a potent indicator of concomitant analysis. *Fish shellfish Immunol.*, 37: 539-542.
- Tran, N. T., Z. Li, S. Wang, H. Zheng, J. J. Aweya, X. Wen and S. Li (2020) Progress and perspectives of short - chain fatty acids in aquaculture. *Rev. Aquacult.*, 12 (1): 283-298.
- 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.
- Wang, Y., H. Zhang, L. Zhang, W. Liu, Y. Zhang, X. Zhang and T. Sun (2010) In vitro assessment of probiotic properties of *Bacillus* isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26 (8): 1369-1377.
- Yoo, S. H., E. J. Yoon, J. Cha and H. G. Lee (2004) Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.*, 34: 37-41.
- Yoon, E. J., S. H. Yoo, J. Cha and H. G. Lee (2004) Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 34: 191-194.
- 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). *Aquacult. Res.*, 42: 943-952.
- Zhang, C. N., X. F. Li, W. N. Xu, G. Z. Jiang, K. L. Lu, L. N. Wang and W. B. Liu (2013) Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Fish Shellfish Immunol.*, 35 (5): 1380-1386.
- Zhao, P. Y., J. P. Wang and I. H. Kim (2013a) Evaluation of dietary fructan supplementation on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, fecal microbial flora, and fecal noxious gas emission in finishing pigs. *J. Anim. Sci.*, 91 (11): 5280-5286.
- Zhao, P. Y., J. P. Wang and I. H. Kim (2013b) Effect of dietary levan fructan supplementation on growth performance, meat quality, relative organ weight, cecal microflora, and excreta noxious gas emission in broilers. *J. Anim. Sci.*, 91: 5287-5293.

The Effects of Diets Supplemented with Probiotics *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 and Its Fermented Products, Lactosucrose and Levan on Pathogen Resistance of Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

Mei-Ying Huang, Huei-Jen Ju*, Che-Hung Liao and Fu-Sheng Tseng

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The effects of dietary supplementation with *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 and its fermented products, lactosucrose and levan, on short-chain fatty acid and lactic acid in feces, immune status, and pathogen resistance of the spotted grouper *Epinephelus coioides* were investigated. Spotted grouper were fed diets supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 + lactosucrose and *B. licheniformis* FRI MY-55 + levan for up to 10 weeks. The total short-chain fatty acid and lactic acid levels in feces of the fish fed experimental diets for 5 and 10 weeks were significantly higher compared to those of the control group. Before and after *Vibrio harveyi* challenge, lysozyme activity of the experimental groups was significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$). After *V. harveyi* challenge, the respiratory burst and survival rates of the fish fed experimental diets were significantly higher than those of the control group ($p < 0.05$). Overall, the results of this study indicate that dietary administration of *B. licheniformis* FRI MY-55 and its products, lactosucrose and levan, enhances the pathogen resistance of orange-spotted grouper.

Key words: *Epinephelus coioides*, *Bacillus licheniformis*, lactosucrose, levan, pathogen 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