

## Effect of *Bacillus pumilus* D5 and Its Mutant on the Growth, Disease Resistance and Culture Environment of Hard Clam (*Meretrix lusoria*)

Huei-Jen Ju<sup>1</sup>, Ching-Ying Deng<sup>2</sup>, Yu-Han Chou<sup>3</sup>, Hung-Ting Lin<sup>4</sup>, Che-Hung Liao<sup>1</sup>,  
Fu-Sheng Tseng<sup>1</sup> and Mei-Ying Huang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Hsin Chu County Animal Disease Control Center

<sup>3</sup>Taishi Branch, Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>4</sup>Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

### ABSTRACT

The hard clam (*Meretrix lusoria*) is an economically important species of marine bivalve; however, for the past few years, tremendous economic losses in clam culture have been caused by poor aquaculture management approaches, global warming, and pathogens. *Vibrio* is a serious problem that restricts the culture industry. Probiotics could be used to promote growth, improve water quality, reduce environmental pathogens, and enhance the immunity of cultured species. We explored the use of *Bacillus pumilus* D5 and its mutants to perform these functions. Over a six-month experimental period, hard clams treated with *B. pumilus* D5 exhibited improved growth compared with those treated with *B. pumilus* NG25 and controls. The concentration levels of ammonia and hydrogen sulfide in treated hard clams significantly decreased compared with those in controls. Six months after the start of the experiments, the hard clams were challenged with *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio vulnificus*, and significant differences in hard clam survival were observed between the probiotic treatment and control groups. The cumulative mortality of the control group was 60%, whereas the cumulative mortalities of probiotic-treated hard clams were 30% for *B. pumilus* D5 and 20% for *B. pumilus* NG25. Subsequently, real-time PCR was employed to determine the mRNA levels of C-type lectin (Mm-Lec1). In the bacteria exposure test, the expression of C-type lectin genes was upregulated in the *B. pumilus* NG25 and *B. pumilus* D5 groups compared with that in the control groups, and the mRNA expression level was highest at 72 h, C-type lectins play defensive roles against *Vibrio* invasion in hard clams. *B. pumilus* strains appear to represent ideal multifunctional probiotic bacteria, with the capacity to address mortality issues and increase aquaculture profitability.

**Key words:** mutagenesis, *Meretrix lusoria*, *Bacillus pumilus* D5

---

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

# 短小芽孢桿菌 *Bacillus pumilus* D5 及其突變株對文蛤 (*Meretrix lusoria*) 成長、抗病和養殖環境改善之影響研究

朱惠真<sup>1</sup> · 鄧晶瑩<sup>2</sup> · 周昱翰<sup>3</sup> · 林泓廷<sup>4</sup> · 廖哲宏<sup>1</sup> · 曾福生<sup>1</sup> · 黃美瑩<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

<sup>2</sup> 新竹縣家畜疾病防治所

<sup>3</sup> 行政院農委會水產試驗所海水繁養殖研究中心臺西試驗場

<sup>4</sup> 國立臺灣海洋大學食品科學系

## 摘要

文蛤 (*Meretrix lusoria*) 是非常重要的經濟性二枚貝類，然而在過去幾年間，特別是因為養殖管理、氣候異常及弧菌的感染而重創了文蛤產業。在過去文獻中指出，添加益生菌投餵養殖生物可以有效地促進有機體成長、改善水質環境、改善環境菌相以及提升有機體之免疫反應，因此本研究使用短小芽孢桿菌 D5 及其抗菌性強的突變株 NG25 來進行試驗。在六個月的田間試驗中，投餵飼料中添加短小芽孢桿菌 D5 (實驗組 1) 及其突變株 NG25 (實驗組 2) 文蛤池池水總氨氮和硫化氫的濃度顯著地低於僅投餵飼料者(控制組)。實驗組 1 文蛤的成長顯著地優於控制組和實驗組 2，同時也顯著地抑制了環境中弧菌的濃度。在 6 個月的田間試驗後，將文蛤同時以溶藻弧菌和創傷弧菌進行 144 hr 的細菌性攻毒試驗，結果顯示控制組文蛤的死亡率高達六成，然而實驗組 1 文蛤的死亡率降至 3 成，而實驗組 2 文蛤的死亡率則降至 2 成。最後，在即時聚合酶連鎖反應中觀察 C 型凝集素基因表現，發現 C 型凝集素在攻毒 72 hr 時達到最高量，其中又以實驗組 2 文蛤的 C 型凝集素基因的表現量為最高。因此本研究建議添加短小芽孢桿菌 D5 及突變株 NG25 餵養文蛤，可以有效地促進成長、改善環境並增加免疫力，適合推廣於養殖現場使用。

關鍵詞：突變作用、文蛤、短小芽孢桿菌 D5

## 前言

目前研究顯示益生菌被廣泛地應用於水產養殖領域 (Felix *et al.*, 2019)，尤其是芽孢桿菌屬，其中最為被研究的是枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)、克勞氏芽孢桿菌 (*B. clausii*)、短小芽孢桿菌 (*B. pumilus*)、凝結芽孢桿菌 (*B. coagulans*) 及地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*) (Sanders *et al.*, 2003)。芽孢桿菌屬於格蘭氏陰性菌，功能為分泌多種的胞外酵素以及抗菌物質、促進營養物質的吸收及成長 (Huynh *et al.*, 2017)、排除有害的致病菌原、加強有機體的免疫反應以及改善水質的功能

(Verschuere *et al.*, 2000; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014)，同時芽孢桿菌屬並非水產病原菌，不會接受和表現來自弧菌或其他相關革蘭氏陰性菌與抵抗抗生素或毒素相關基因，因此芽孢桿菌屬是除乳酸菌屬外，良好的抗魚類病原菌之菌株，故具備作為益生菌之優勢 (Pandiyan *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2018)。

大部分來自於 *Bacillus* spp. 的抗菌物質都屬於多肽類和脂多肽類，分類上有表面活性素 (surfactin)、豐原素 (fengycin) 和伊枯草菌素 (iturin)，表面活性素主要可抑制細菌和病毒的生長，而豐原素和伊枯草菌素則是抑制真菌菌絲的生長 (Abriouel *et al.*, 2011)，有關於非多肽類的抗菌物質則包含大型環脂類 (macrocyclic lipids)、多烯類 (polyene) 及苯酚類 (Sidorova *et al.*, 2018)。Chu *et al.* (2019) 發現 *B. pumilus* SAF214 可分泌出兩種抗菌物質，分別可抗 *Staphylococcus aureus*

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02)2463-3101; 轉 3508; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: myhuang@mail.tfrin.gov.tw

和 *Listeria monocytogenes*，其中抗 *S. aureus* 的抗菌物質為 pumilacidin，在 pH 1 至 pH 12 的環境下皆不失抗菌活性，不易受環境有機物質影響，同時也具備有耐熱的活性。Zhou (2018) 從 *B. subtilis* 中找到表面活性素脂多肽型的介面活性物，對於 *Escherichia coli*、*S. aureus* 和 *Salmonella enterica* 具有抗性，此類抗菌物質也具耐熱、耐酸及耐高溫的特性，並且不受酵素影響其抗菌特性。

2016 年本實驗室於白蝦腸道中分離出一株具抗弧菌能力的 *B. pumilus* D5 (朱等, 2016; 黃等, 2016), Gao *et al.* (2017) 及蘇等 (2010) 發現 *B. pumilus* 會分泌一種非多肽類的抑菌物質，此物質會將弧菌的細胞膜穿孔，隨之細胞膜產生皺褶，最後導致細胞膜溶解而使弧菌死亡。*B. pumilus* D5 也於 2019 年被分離出具有抗弧菌及鏈球菌之抗菌物質，將菌體培養上層液經由 0.45  $\mu\text{m}$  的濾紙過濾後，發現濾液對於鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、創傷弧菌 (*V. vulnificus*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 及海豚鏈球菌 (*S. iniae*) 具有較強的抑菌效果。最低抑菌濃度試驗發現，當 *B. pumilus* D5 上層液經稀釋 4 - 8 倍後，有相當於胺基青黴素 (Ampicillin) 濃度 0.05 - 12.5  $\mu\text{g/ml}$  的抗菌能力，且在 60 hr 後仍具有 99% 的抑制弧菌的效率。在不同溫度下，該稀釋液經 80°C 熱處理 15 min 後，仍對鏈球菌有 50% 的抗菌活性，在酸鹼環境下則對鏈球菌有 100% 的抗菌活性。利用 6 種水解酵素處理 *B. pumilus* D5 胞外物質後，測試其抗菌活性，發現抑菌物質對鏈黴蛋白酶 E (pronase E)、蛋白酶 K (proteinase K) 及脂解酶 (lipase) 具有高度敏感性，由於 *B. pumilus* D5 胞外抑菌物質具有抗熱耐酸鹼及長時間抗病的特性 (沈等, 2017)，可以確定 *B. pumilus* D5 之抑菌物質非常適合於養殖現場使用。

目前有關抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 的研究較為透徹的是紫殼菜蛤 (*Mytilus edulis*) 及地中海殼菜蛤 (*M. galloprovincialis*) (Allam *et al.*, 2016)，文蛤的部分則鮮有研究。在自然界抗菌肽的特性是富有很高的雙硫鍵，目前所知貝類的抗菌肽主要分為 4 種，分別為 defensins、mytikins、myticins 及 mytimycin，defensins 主要分布於牡蠣 (*Crassostrea virginica* 和 *Crassostrea gigas*) 與皺紋盤鮑 (*Halotis discus*)，後 3 種常見於其它雙枚貝，其中

mytimycin 可以抗革蘭氏陰性菌、革蘭氏陽性菌、真菌及病毒等，最被廣泛地研究。凝集素是一種對醣蛋白上醣官能基具有專一性結合的醣蛋白質，張等 (2016) 研究發現文蛤 C 型凝集素蛋白 (C-type lectin protein, CTL) 之基因表現與文蛤免疫呈正相關，CTL 是依賴鈣離子參與醣官能基結合的蛋白質，其配體結合位可以和外來病原菌表面的醣官能基結合，中和病原菌的毒性，藉由吞噬細胞消滅病原菌，*B. pumilus* D5 可能因具有 CTL，因此具有抗菌的特性。本研究將利用 *B. pumilus* D5 及其突變株 (抗弧菌能力強) 餵食文蛤，探討 *B. pumilus* D5 及其突變株對於文蛤養殖環境的改善能力、對文蛤成長及抗病的評估。

## 材料與方法

### 一、突變短小芽孢桿菌的過程、保存和活化

*B. pumilus* NG25 的來源是利用 *B. pumilus* D5 使用亞硝基弧 (Nitrosoguanidine, NTG) 突變及 UV 照射的共同誘變法中，以 UV 照射 25 min 後，再以 0.01 ppm NTG 浸泡後培養 18 hr 所篩選出具有抗弧菌能力優於 *B. pumilus* D5 的突變株 (朱等, 2018)，篩選後儲存於 -80°C 冰箱。進行實驗前從 -80°C 冰箱取出此突變株後，將之活化後，於 2% 氯化鈉之 TSA 胰化蛋白大豆培養基 (tryptic soy agar, TSA, 購自 Difco) 培養基上培養 16 - 18 hr，取出單一菌落純化反覆三次後備用。

### 二、對不同水產病原弧菌之抗菌試驗

抗病試驗所測試之菌株包括溶藻弧菌等五種病原菌，將 *B. pumilus* D5 及其突變株及五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 *B. pumilus* D5 及其突變株至 OD<sub>600nm</sub> 為 0.4 (菌數約為 10<sup>8</sup> CFU/ml)。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，加入最終菌數為 10<sup>8</sup> CFU/ml 水產病原弧菌菌液混合均勻後，倒入培養皿中，待 TSA 凝固後將鐵環移除。在凹槽中加入 50  $\mu\text{l}$  *B. pumilus* D5 或其突變株之菌液。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，每種測試進行三重複試驗。

### 三、研究材料的收集和成長試驗的設計

實驗所用之文蛤 (*Meretrix lusoria*) 購自臺西民間養殖場，於水產試驗所臺西試驗場循環系統中蓄養 2 週後開始進行實驗。本試驗的養殖池共計有 6 池循環式水槽，每池的體積約 4 mt，池水在養文蛤時將液面高度調整為 50 cm，底沙為 10 cm 高，每個試驗為 2 重複 (即有 2 池控制組、2 池投餵 *Bacillus pumilus* D5 和 2 池投餵 *B. pumilus* NG25)。本實驗投餵文蛤的方式是取 *B. pumilus* D5 及其突變株 NG25 的濃縮菌粉，其濃度為  $10^9$  CFU/g，將人工粉狀飼料 (魚粉飼料) 取 999 g 混 1 g 的粉狀 *B. pumilus* D5 或其突變株 NG25 的比例，每週投餵文蛤 2 次，每次投餵 10 g。

成長試驗的設計：控制組為文蛤僅投餵粉狀飼料；實驗組 1 為文蛤投餵粉狀飼料添加 *B. pumilus* D5；實驗組 2 為文蛤投餵粉狀飼料添加 *B. pumilus* NG25。

### 四、文蛤成長及池水水質的分析

在為期 6 個月的文蛤成長試驗期間，每 4 週量測文蛤體重及殼長一次，測量當天不予餵食。量測方式是每池逢機各取 10 顆文蛤進行測量，分析增重率 (percent weight gain, PWG) 及特定成長率 (specific growth rate, SGR)，計算公式 (陳等, 1994) 如下：

$$PWG = [(W_2) - (W_1) / (W_1)] \times 100$$

$$SGR (\%/d) = (\ln W_2 - \ln W_1) / T \times 100$$

其中  $W_1$  為初體重， $W_2$  為末體重，T 代表餵養天數。

水質的檢測是每 4 週在文蛤池的池邊進行水體採樣，採樣的水體會含底沙，檢測前先均勻地混合池水及底泥，靜置 10 min 後，取上層水體 5 ml，以默克公司之 NOVA 60A 套組進行氨氮、亞硝酸及硫化氫之檢測，每次檢測為 3 重複試驗。

### 五、水體中總生菌及弧菌數之定量

在為期 6 個月的試驗期間每 4 週採集水體檢測總生菌數及弧菌濃度。將檢體取出適量稀釋後，分別塗抹於含有 2.5% 氯化鈉之 TSA 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)，於  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  培養 12 - 16 hr 後，計算菌落數，分別記錄總生菌數量及弧菌數量，每次檢測為 3 重複試驗。

### 六、攻毒試驗

細菌懸浮液製備方法為將病原菌溶藻弧菌及創傷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 ( $8000 \times g$ , 10 min, 4°C) 移除上清液，將沉澱之細菌以生理食鹽水清洗 2 次，最後以波長 600 nm 測定之，配製菌液濃度為  $1 \times 10^9$  CFU/ml 懸浮液。進行攻擊試驗前，將為期 6 個月成長試驗的文蛤，移出蓄養於  $30 \times 20 \times 20$  (cm) 的玻璃缸中，每缸隨機置入 30 顆文蛤。控制組、實驗組 1 和實驗組 2 各 3 重複，養殖一週後進行試驗，製備菌體濃度為  $10^8$  CFU/ml 溶藻弧菌和創傷弧菌混合懸液後，先將文蛤取出後擦拭乾淨，注射的方式是用解剖刀撬開文蛤殼上方約 0.05 mm 的開口，用注射針頭注入菌懸液 200  $\mu\text{l}$  於文蛤體中，確認文蛤沒有吐出菌液後，再將文蛤放入待測缸中，控制組採用滅過菌之生理食鹽水，鹽度 20 psu，溫度 25°C。控制組與實驗組同步取樣，分別在 24、48、72、96、120 及 144 hr 隨機選取每組三隻文蛤萃取鰓組織之 RNA，反轉錄成 cDNA 備用。

### 七、免疫基因之相對定量分析

#### (一) 萃取文蛤之 total RNA

使用 AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep kit 進行文蛤鰓組織 RNA 的萃取，取萃取出 RNA 定量為 10 ng/ $\mu\text{l}$  後備用。

#### (二) 反轉錄 cDNA

**Table 1** The diameters (mean  $\pm$  SE, mm) of inhibition zones for  $10^8$  CFU/ml concentration of *B. pumilus* D5 and its mutants, NG25, NG24, UV35, and UV37, against  $10^8$  CFU/ml concentration of *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. Harveyi*, *V. anguillarum*, and *V. vulnificus*. Treatments with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ )

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. Harveyi</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. vulnificus</i>
<i>B. pumilus</i> D5	0	15.3 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	18.9 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	21.5 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	21.8 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>
<i>B. pumilus</i> NG25	0	17.3 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	20.3 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	23.5 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	22.7 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup>
<i>B. pumilus</i> NG24	0	17.4 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	20.5 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	22.5 $\pm$ 2.25 <sup>a</sup>	20.3 $\pm$ 2.22 <sup>c</sup>
<i>B. pumilus</i> UV35	0	17.5 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	20.4 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	23.5 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	20.1 $\pm$ 3.31 <sup>c</sup>
<i>B. pumilus</i> UV37	0	16.5 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	19.7 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	20.5 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	21.1 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>

使用 Super Script TM III Reverse Transcriptase 套組進行反轉錄作用，步驟一使用 oligo dt (18) 1  $\mu$ l，RNA 模板 5  $\mu$ l，dNTP (10mM) 1  $\mu$ l，ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l 混合為反應液(I)，於 65°C 作用 5 min 後，靜置於冰上 2 min，停止反應；步驟二使用 5 倍 Frist strand buffer 4  $\mu$ l、DTT (0.1M) 1  $\mu$ l、RNAase out (inhibitor) 1  $\mu$ l、RTase 1  $\mu$ l 及步驟一的反應液 (I) 13  $\mu$ l 混合為反應液 (II)，於 50°C 30 min, 70°C 15 min 反應後，置於冰上 10 min，製成 cDNA 產物。

### (三) 目標基因擴增

以上述所製備的 cDNA 為範本，以 $\beta$ -actin-F (5'GATCATTGCCCCACCAGAGAG3')、 $\beta$ -actin-R (5'CCAGACTCGTCGTATTCTTGTTC3')、Mm-lec1-F (5'ACTTGGATTGGGAACCTTCAC 3')、Mm-lec1-R (5'TCGTCGCTCCATATATAATCAAA G3') 為引物進行目標基因擴增 (張等, 2016)。目標基因擴增條件為 94°C 5 min, 94°C 30 sec、55°C 30 sec、72°C 30 sec 共 35 個重複週期，最後在 72°C 延伸 10 min，靜置 4°C 30 min。然後將 PCR 結果用 1.5% 瓊脂糖凝膠電泳檢測後，在凝膠成像儀下成像。

### (四) 相對定量

採用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法計算 Mm-Lec1 基因的相對表達量，以 $\beta$ -actin 為內參基因，使用 One Way ANOVA 分析實驗組與對照組的 Mm-Lec1 基因的相對表達量的顯著性差異。

## 七、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 分析比較，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其差異顯著性。

## 結 果

### 一、短小芽孢桿菌及其突變株突變效益的評估

使用抗水產病原弧菌之菌株 *B. pumilus* D5 和其 4 種突變菌株 *B. pumilus* NG25、*B. pumilus* NG24、*B. pumilus* UV35 及 *B. pumilus* UV37 以及和五種水產病原弧菌進行抗菌環試驗。在副溶血弧菌的抗菌環試驗中，Table 1 顯示五種短小芽孢桿菌及其突變株的抗菌環大小落於 15.3  $\pm$  0.19 - 17.5  $\pm$  0.11 mm 之間，其中以 *B. pumilus* UV35 的抗菌效力為最佳並具顯著性；在哈維氏弧菌的抗菌環試驗中，五種短小芽孢桿菌及其突變株的抗菌環大小落於 18.9  $\pm$  0.19 - 20.5  $\pm$  0.19 mm 之間，其中以 *B. pumilus* NG24 的抗菌效力為最佳並具顯著性；在鰻弧菌的抗菌環試驗中，五種菌株的抗菌環大小落於 20.5  $\pm$  0.28 - 23.5  $\pm$  1.5 mm 之間，其中以 *B. pumilus* NG25 的抗菌效力為最顯著；最後在創傷弧菌的抗菌環試驗，五種菌株的抗菌環大小落於 20.1  $\pm$  3.31 - 22.7  $\pm$  1.88 mm 之間，其中以 *B. pumilus* NG25 的抗菌效力為最顯著，五種菌株對於溶藻弧菌均無抗性。總結而論，*B. pumilus* D5 對於鰻弧菌及創傷弧菌有較強的抗性，而突變後的四種菌株對於弧菌的抗性皆優於 *B. pumilus* D5。整體而言，又以 *B. pumilus* NG25 對此五種弧菌的抗菌效力為最佳 ( $p < 0.05$ )。

**Table 2** The shell lengths of hard clams in the control group, treatment group 1, and treatment group 2. Treatments with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are presented as the mean and standard error of ten replicates (mean  $\pm$  SE;  $n = 10$ )

Treatments	1 <sup>st</sup> month	2 <sup>nd</sup> month	3 <sup>rd</sup> month	4 <sup>th</sup> month	5 <sup>th</sup> month	6 <sup>th</sup> month
Control	17.73 $\pm$ 2.91	16.32 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	19.48 $\pm$ 2.66 <sup>a</sup>	27.23 $\pm$ 2.69	28.19 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	29.39 $\pm$ 2.46 <sup>a</sup>
Treatment 1	17.73 $\pm$ 2.67	22.92 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	23.55 $\pm$ 4.89 <sup>b</sup>	28.55 $\pm$ 3.72	32.2 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>	32.27 $\pm$ 3.35 <sup>c</sup>
Treatment 2	17.73 $\pm$ 1.52	18.65 $\pm$ 2.48 <sup>b</sup>	20.43 $\pm$ 2.34 <sup>c</sup>	26.39 $\pm$ 3.44	26.19 $\pm$ 3.31 <sup>a</sup>	26.13 $\pm$ 3.86 <sup>a</sup>

**Table 3** The body weights of hard clams in the control group, treatment group 1, and treatment group 2. Treatments with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are presented as the mean and standard error of ten replicates (mean  $\pm$  SE;  $n = 10$ )

Treatments	1 <sup>st</sup> month	2 <sup>nd</sup> month	3 <sup>rd</sup> month	4 <sup>th</sup> month	5 <sup>th</sup> month	6 <sup>th</sup> month
Control	3.39 $\pm$ 0.09	3.53 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	5.08 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	10.34 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	11.33 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	12.09 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>
Treatment 1	3.39 $\pm$ 0.7	6.57 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	7.51 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	11.59 $\pm$ 1.02 <sup>c</sup>	16.31 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup>	18.91 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>
Treatment 2	3.62 $\pm$ 0.58	4.45 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	5.44 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	9.23 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	9.27 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	8.14 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>

## 二、添加短小芽孢桿菌及其突變株於文蛤飼料中之成長效益評估

本試驗添加 *B. pumilus* D5 或 *B. pumilus* NG25 於粉狀飼料中投餵文蛤，經過半年的養殖後，控制組文蛤的平均殼長為 17.7  $\pm$  2.9 - 29.4  $\pm$  2.47 mm (Table 2)；平均體重為 3.39  $\pm$  0.9 - 12.1  $\pm$  0.65 g (Table 3)；SGR 為 0.72  $\pm$  0.15%；實驗組 1 文蛤的平均殼長為 17.7  $\pm$  2.67 - 32.3  $\pm$  3.35 mm (Table 2)；平均體重為 3.39  $\pm$  0.7 - 18.9  $\pm$  1.47 g (Table 3)，SGR 為 0.80  $\pm$  0.11%；實驗組 2 文蛤的平均殼長為 17.7  $\pm$  1.52 - 26.1  $\pm$  3.86 mm (Table 2)；平均體重為 3.62  $\pm$  0.58 - 8.14  $\pm$  0.52 g，SGR 為 0.45  $\pm$  0.07% (Table 3)。經由統計分析後，實驗組 1 以 *B. pumilus* D5 添加於粉狀飼料餵食文蛤的成長效益優於控制組和實驗組 2 ( $p < 0.05$ )。

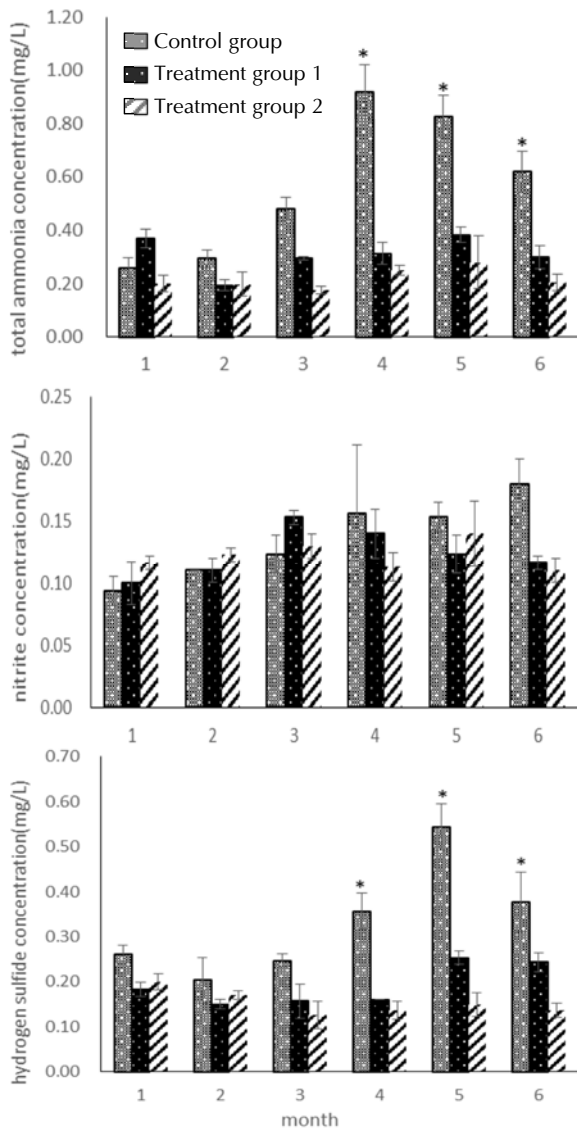
## 三、添加短小芽孢桿菌及其突變株於飼料中之水質效益評估

本試驗經過半年的養殖後，Fig. 1 顯示控制組池水氨氮濃度的變化範圍為 0.26  $\pm$  0.04 - 0.92  $\pm$  0.10 mg/L；而亞硝酸鹽濃度的變動範圍為 0.09  $\pm$  0.01 - 0.18  $\pm$  0.02 mg/L；硫化氫濃度則為 0.20  $\pm$  0.05 - 0.54  $\pm$  0.05 mg/L。實驗組 1 池水氨氮濃度的

變化範圍為 0.19  $\pm$  0.02 - 0.38  $\pm$  0.03 mg/L，而亞硝酸鹽濃度的變動範圍為 0.1  $\pm$  0.02 - 0.15  $\pm$  0.10 mg/L；硫化氫濃度則為 0.15  $\pm$  0.02 - 0.25  $\pm$  0.02 mg/L。實驗組 2 池水氨氮濃度的變化範圍為 0.18  $\pm$  0.02 - 0.25  $\pm$  0.02 mg/L，而亞硝酸鹽濃度的變動範圍為 0.1  $\pm$  0.02 - 0.14  $\pm$  0.03 mg/L，硫化氫濃度則為 0.13  $\pm$  0.03 - 0.2  $\pm$  0.02 mg/L。由結果得知飼料中添加 *B. pumilus* D5 (實驗組 1) 和 *B. pumilus* NG25 (實驗組 2) 可以有效地降低養殖池中總氨氮及硫化氫的濃度。

## 四、添加短小芽孢桿菌及其突變株於飼料中之抗病效益評估

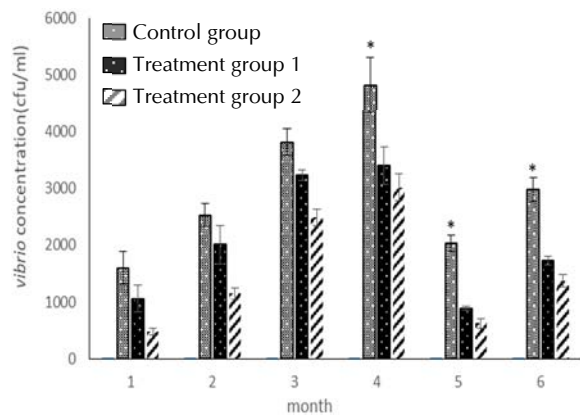
本試驗經過半年的養殖後，Fig. 2 顯示在控制組、實驗組 1 和實驗組 2 養殖池池水內弧菌濃度的變動範圍分別為  $1.6 \times 10^3$  -  $4.8 \times 10^3$  (CFU/ml)、 $8.9 \times 10^2$  -  $3.4 \times 10^3$  (CFU/ml) 和  $6.2 \times 10^2$  -  $3.01 \times 10^3$  (CFU/ml) 之間，而它們的平均弧菌濃度分別為  $3.8 \times 10^3$ 、 $2.6 \times 10^3$  和  $1.3 \times 10^3$  (CFU/ml)，另外，Fig. 3 顯示控制組、實驗組 1 和實驗組 2 養殖池池水內總生菌數的變化範圍分別為  $1.9 \times 10^4$  -  $6.4 \times 10^4$ 、 $9.2 \times 10^3$  -  $4.9 \times 10^4$  和  $4.9 \times 10^3$  -  $3.03 \times 10^4$  (CFU/ml) 之間。而它們的平均總生菌數則分別為  $3.6 \times 10^4$ 、 $2.8 \times 10^4$  和  $1.7 \times 10^4$



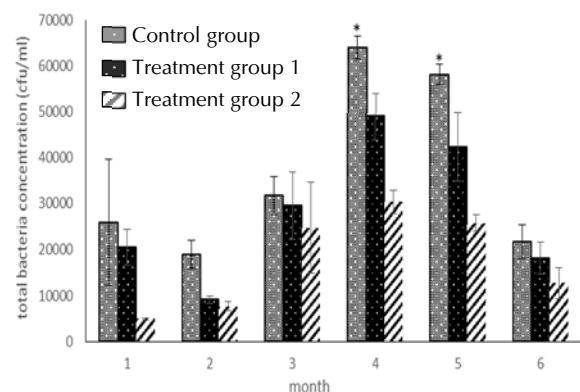
**Fig. 1**  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{H}_2\text{S}$  concentrations in the pond water of the control group, treatment group 1, and treatment group 2. Asterisks indicate values for the control group that were significantly different from those of the treatment groups at  $p < 0.01$  at the time indicated. Values are presented as the mean and standard error of three replicates (mean  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

(CFU/ml)。在養殖第 4 個月的池水弧菌濃度在控制組、實驗組 1 和實驗組 2 分別為  $4.8 \times 10^3$ 、 $3.4 \times 10^3$  及  $3.0 \times 10^3$  (CFU/ml)；第 5 個月的池水弧菌濃度分別為  $2.0 \times 10^3$ 、 $8.8 \times 10^2$  及  $6.2 \times 10^2$ ；第 6 個月的池水弧菌濃度分別為  $2.9 \times 10^3$ 、 $1.7 \times 10^3$  及  $1.4 \times 10^3$ ；而在養殖第 4 個月的池水總生菌數濃度在控制組、實驗組 1 和實驗組 2 分別為  $6.4 \times 10^4$ 、 $4.9 \times 10^4$  及  $3.0 \times 10^4$  (CFU/ml)；第 5 個月的池水總生菌數濃度分別為  $5.8 \times 10^4$ 、 $4.2 \times 10^4$  及  $2.6 \times 10^4$

(CFU/ml)；第 6 個月的池水總生菌數濃度分別為  $2.2 \times 10^4$ 、 $1.8 \times 10^4$  及  $1.4 \times 10^4$  (CFU/ml)，在 95% 的信賴水準下，實驗組 2 的平均總生菌數及弧菌濃度顯著地低於實驗組 1，而實驗組 1 也顯著地低於控制組 ( $p < 0.05$ )。 *B. pumilus* D5 和 *B. pumilus* NG25 可以有效地降低養殖池中總生菌及弧菌的濃度。



**Fig. 2** The *Vibrio* concentrations (CFU/ml) in pond water for the control group, treatment group 1, and treatment group 2. Asterisks indicate values for the control group that were significantly different from those of the treatment groups at  $p < 0.05$  at the time indicated. Values are presented as the mean and standard error of three replicates (means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).



**Fig. 3** The total bacterial concentrations (CFU/ml) of pond water for the control group, treatment group 1, and treatment group 2. Asterisks indicate values for the control group that were significantly different from those of the treatment groups at  $p < 0.05$  at the time indicated. Values are presented as the mean and standard error of three replicates (means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

在免疫效益評估部分，將為期 6 個月成長試驗的文蛤再進行 144 hr 的攻毒試驗，Fig. 4 顯示控制組、實驗組 1 和實驗組 2 文蛤 24 hr 的存活率分別為  $83.6 \pm 7.4\%$ 、 $92.1 \pm 3.4\%$ 、 $88.9 \pm 2.75\%$ ；48 hr 的存活率分別為  $79.29 \pm 4.0\%$ 、 $86.27 \pm 3.4\%$ 、 $88.89 \pm 2.75\%$ ；72 hr 的存活率分別為  $71.32 \pm 4.46\%$ 、 $80.39 \pm 3.4\%$ 、 $85.71 \pm 0\%$ ；96 hr 的存活率分別為  $65.32 \pm 3.17\%$ 、 $76.47 \pm 0\%$ 、 $80.95 \pm 4.76\%$ ；120 hr 的存活率分別為  $57.11 \pm 6.42\%$ 、 $74.51 \pm 3.4\%$ 、 $80.95 \pm 0\%$  以及 144 hr 的存活率分別為  $36.76 \pm 6.38\%$ 、 $70.59 \pm 4.15\%$ 、 $80.95 \pm 0\%$ 。實驗組 2 文蛤的存活率顯著地高於控制組 ( $p < 0.05$ )。

細菌性攻擊試驗中，經創傷弧菌及溶藻弧菌刺激 24、48、72、96、120 及 144 hr 後，分析文蛤鰓組織中 C 型凝集素 mRNA 的相對表現量，Fig. 5 顯示實驗組 1 和實驗組 2 在 24、48、96、120 和 144 hr 表現量與控制組的表現量沒有顯著的差異，然而實驗組 1 和實驗組 2 的 72 hr 表現量顯著地高於控制組，分別為控制組的 4.4 及 6.2 倍 ( $p < 0.05$ )。顯示益生菌 *B. pumilus* D5 和 *B. pumilus* NG25 可以促進文蛤的免疫反應抵禦外來的刺激，並且提高文蛤的存活率。

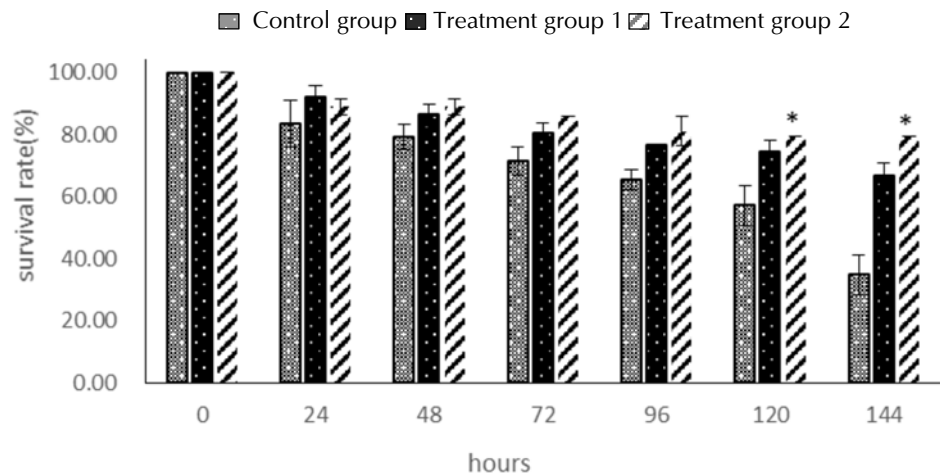
## 討 論

當水產養殖產業於世界各地蓬勃發展之際，造成養殖密度太高而導致更多的致病性弧菌被發現。*B. pumilus* 有相當多的亞種對於多種病原菌具有抗性，如 Chu *et al.* (2019) 指出，*B. pumilus* 具有抗金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黃微球菌 (*Micrococcus luteus*)、沙門氏桿菌 (*Variant Salmonella gallinarum*) 和大腸桿菌 (*Escherichia coli* K88)，依文獻可知大部分的 *B. pumilus* 都由泥土中所純化出來，僅少數是由動物腸道中所純化 (Nayak *et al.*, 2017)，本研究中的 *B. pumilus* 是由蝦腸道中分離，對於水產動物無害，適合於養殖現場使用。在鄭 (2014) 的研究中發現，飼料中同時添加 *B. pumilus* 及 *Rhodotorula mucilaginosa* 可以促進魁蚶苗 (*Anadara broughtonii*) 的生長，而又以飼料中單獨添加 *B. pumilus* 效果最好，Ziaei-Nejad (2006) 添加  $10^7$  CFU/ml 之 *Bacillus* spp. 在魚蝦池中，在

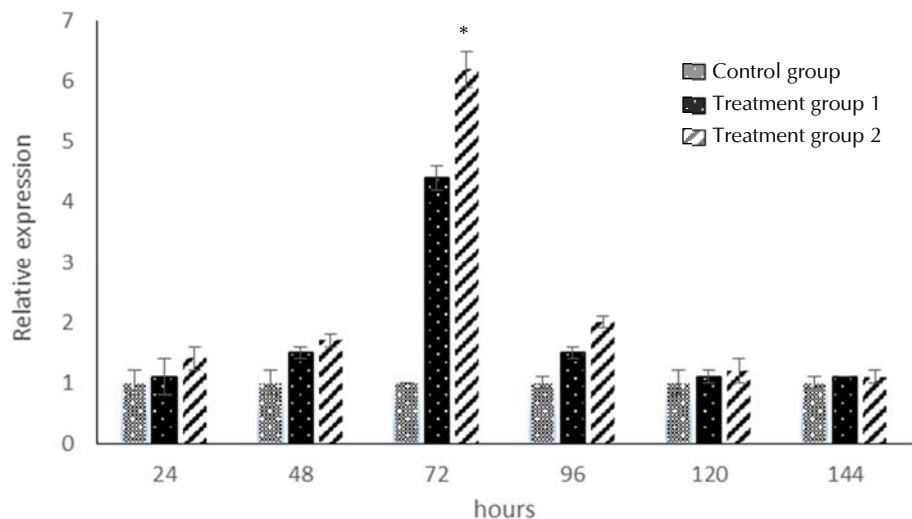
無節幼蝦期及眼幼蟲期間，幼蝦之存活率及 SGR 都有明顯的提升；Nimrart *et al.* (2013) 在草蝦 (*Penaeus monodon*) 的試驗中於飼料中添加 *B. subtilis* F6 及 *Enterococcus* sp. S2 可以促進胞外酵素如蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶的分泌，有促進成長之功效；Silva-Aciaries (2013) 以益生菌 (*Agarivorans albus* strain F1-UMA (GenBank accession number GQ861540) and *Vibrio* sp. Strain F15-UMA (GenBank accession number GQ861541) 餵食紅鮑 (*Haliotis rufescens*)，可以促進鮑之殼長成長達 10% 及體重增重 20 - 30%，Grandiosa (2018) 以複合性益生菌投餵英格蘭黑腳鮑魚 (*Haliotis iris*) 可以促進其殼長和殼寬的成長提高 10%，在 Avella (2010) 的研究中餵食含有枯草桿菌屬的飼料於金頭鯛 (*Sparus aurata* L.)，有抑制 Myostatin 及同時大量提高 Insulin-like growth factor I 的表現，顯示 *Bacillus* spp. 屬的菌株有提高肌肉細胞生長以及個體成長的現象。同樣的趨勢也於本研究中發現，添加短小芽孢桿菌及其突變株於飼料中餵養半年，經由統計分析結果發現控制組、實驗組 1 和實驗組 2 在試驗第 2 個月、第 5 個月及第 6 個月時，其殼長、體重分布及 SGR 皆和控制組有顯著性差異 ( $p < 0.01$ )，控制組、實驗組 1 及實驗組 2 增重率分別為 2.56%、4.58% 及 1.25%，實驗組 2 優於其他 2 組，另在殼長部分控制組、實驗組 1 及實驗組 2 各增長 0.65%、0.82% 及 0.47%，實驗組 1 亦優其他 2 組，證實飼料中加入 *B. pumilus* D5 有促進文蛤成長的功效。

文蛤養殖的首要任務莫過於是注意水體中氨氮及硫化物的濃度，養殖水體中氨氮過高會影響魚類代謝，非離子狀態的氨會和鉀離子進行競爭，影響肌肉的收縮，且非離子狀態的氨具有神經毒性，會造成神經元的去極化及 ATP 能量的耗竭而使細胞猝死 (劉等, 2020)；其次高濃度的亞硝酸會促使骨骼肌細胞及紅血球細胞的鉀離子釋出，造成細胞內的鉀離子不平衡，並造成紅血球細胞的二價鐵離子氧化成三價鐵離子，降低血球細胞攜氧的能力。根據楊等 (2018) 文獻中指出，可以脫氮除磷的益生菌有芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.)、光合菌屬 (photosynthetic bacteria, PSB) 及硝化細菌 (nitrifying bacteria)，其中芽孢桿菌是兼氣性





**Fig. 4** The survival rates of hard clams in the control group, treatment group 1, and treatment group 2 following challenge with two bacterial strains (*V. alginolyticus* and *V. vulnificus*) for 144 hours. Asterisks indicate values for treatment group 2 that were significantly different from those in the control group at  $p < 0.05$  at the time indicated. Values are presented as the mean and standard error of three replicates (mean  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).



**Fig. 5** Analysis of C-type lectin gene expression in the gills of hard clams from the control group, treatment group 1, and treatment group 2 following challenge with two bacterial strains (*V. alginolyticus* and *V. vulnificus*) for 144 hours. Asterisks indicate values for treatment group 2 that were significantly different from those in the control group at  $p < 0.05$  at the time indicated. Values are presented as the mean and standard error of three replicates (mean  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

細菌，可以產生較多的胞外酶，如產乳酸芽孢桿菌被證實可以減緩蝦池中總氮、亞硝酸鹽、硝酸鹽及弧菌的濃度。在鄭 (2014) 的研究中發現，飼料中同時添加 *B. pumilus* 及 *Rhodotorula mucilaginosa* 可以穩定養殖期間水體之總氮及亞硝酸鹽濃度在 0.2 mg/L 以下，本試驗中控制組的總氮的平均濃度為  $0.57 \pm 0.06$  mg/L，已屬於

文蛤較為不適合養殖的環境，在養殖後期的平均氮濃度更高於 0.71 mg/L。反觀在添加益生菌的實驗組，餵食 *B. pumilus* D5 平均的氮濃度為  $0.31 \pm 0.03$  mg/L，在養殖後期之氮濃度達 0.32 mg/L。餵食 *B. pumilus* NG25 實驗組平均的氮濃度為  $0.22 \pm 0.04$  mg/L，在養殖後期之氮濃度僅達 0.23 mg/L，本研究之益生菌實有類似於脫氮

的特性，另觀察硫化氫的濃度，在養殖後期控制組、實驗組 1 和實驗組 2 硫化氫的濃度分別為 0.33、0.19 及 0.15 mg/L，因此短小芽孢桿菌及其突變株亦有降解硫化氫的功能。在鄧 (2018) 的文蛤病害調查發現，總氨氮濃度大於 3 ppm，而硫化氫濃度在 0.3 - 0.5 ppm 會影響文蛤的成長，硫化氫濃度在 0.5 - 0.8 ppm 下易造成文蛤死亡。本試驗所用之短小芽孢桿菌及其突變株可以有效的降低水體中總氨氮及硫化氫的濃度，對於文蛤養殖更是必要環境控制的利器。

益生菌的添加有一重要的目的在於提高有機體的抗病力，眾多研究 (Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014; 何等, 2015; 葉等, 2018) 顯示飼料中添加益生菌可以提高虹鱔、白蝦、海鱸及吳郭魚等養殖物種之抗病力。而楊 (2020) 針對於白蝦進行副溶血弧菌之感染影響力研究也發現，利用地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*)、枯草芽孢桿菌 (*B. subtilis*) 及金麗假單孢菌 (*Pseudoalteromonas flavipulchra*) 所組成之複合益生菌投餵白蝦，最終可以提高白蝦的存活率達 77.3%，優於對照組之 25.3%。在貝類的研究上，由 Offret *et al.* (2018) 的研究可知，利用 *Pseudoalteromonas* spp. 作為益生菌，並將此益生菌的培養液對九孔 (*Haliotis tuberculata*) 進行浸潤 4 hr 後，可以有效的阻斷哈維氏弧菌對九孔的急毒性攻擊。Jiang *et al.* (2013) 的研究中使用 *Shewanella olleyana* Wa65 及 *S. colwelliana* 進行四周混合飼料餵食皺紋盤鮑 (*Haliotis discus hannai*)，可以提高皺紋盤鮑的體液免疫及細胞免疫反應，並且經由哈維氏弧菌之攻毒試驗，也可將存活率由 30 - 50% 提高為 77 - 80%。Gao *et al.* (2019, 2020) 分別在飼料中混合 *B. licheniformis* 及 *B. amyloliquefaciens* 皆可以提高皺紋盤鮑的成長及免疫。本研究之益生菌在抑菌圈的測試中即可以抗大部分的致病弧菌，尤其對於創傷弧菌有很高的抗性。根據先前的 104 - 107 年的文蛤疾病調查研究結果可知 (鄧等, 2018)，目前文蛤大量死亡的可能因素為水質不佳及弧菌感染所致，而弧菌屬中只有創傷弧菌及巴西弧菌會造成文蛤的死亡，其餘的弧菌只會造成文蛤的成長不佳。經過田間試驗及細菌攻擊試驗的結果可知，*B. pumilus* D5 及 *B. pumilus* NG25 對於創傷弧菌有較佳的抗菌能力，而在免疫試驗中可以發現，餵食 *B. pumilus* D5 和 *B. pumilus* NG25 後的文蛤在創傷弧菌及溶

藻弧菌的攻毒下，72 hr 內其免疫反應為控制組的 4.4 及 6.2 倍。同時觀察文蛤的存活率，在 120 hr 後實驗組 2 顯著地高於控制組。足證經由飼料中添加 *B. pumilus* NG25，確實可以增強文蛤對於弧菌的攻擊的抵抗及提升其自身的免疫力。

添加 *B. pumilus* D5 於飼料中，在文蛤的殼長和體重顯著地高於控制組，但添加 *B. pumilus* NG25 於飼料中投餵文蛤，於實驗結束時，文蛤的殼長和體重顯著地低於控制組。Gao *et al.* (2019) 以 *B. licheniformis* 餵食盤鮑螺 (*Haliotis discus hannai*) 的研究中發現，投餵益生菌的比例及濃度會影響盤鮑螺的成長及免疫，在每天餵食高濃度益生菌的實驗組，其貝體的免疫反應最好但成長不佳，出現免疫疲勞 (immune fatigue) 現象，大部分的能量都耗用在產生免疫機活物質。本研究中 *B. pumilus* NG25 在先前的研究中證實抗菌能力優於 *B. pumilus* D5，但在成長方面卻不理想，因此本研究的結果和 Gao 的發現類似。因此，添加益生菌 *B. pumilus* D5 並配合 *B. pumilus* NG25 餵養文蛤，可能可以有效地促進文蛤的成長、改善環境並增加免疫力。

## 參考文獻

- 朱惠真, 黃美瑩, 許晉榮, 張錦宜, 吳豐成, 鄧晶瑩 (2018) 應用 NTG-UV 複合誘變法開發弧菌拮抗菌 *Bacillus pumilus* D5 之突變菌株. 水產研究, 26(2): 21-31.
- 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.
- 何偉聰, 董曉慧, 譚北平 (2015) 益生菌對軍曹魚幼魚生長性能, 消化酶和免疫酶活性的影響. 動物營養學報, 27(12): 3821-3830.
- 李文芬, 楊思毅, 齊延林, 林慶聰, 何思齊, 王波 (2016) 益生菌對南美白對蝦生長和免疫力的影響. 湖北農業科學, 55(2): 437-440.
- 沈佳穎 (2018) 探討 *Bacillus pumilus* D5 抑制水產養殖病原菌之能力及其抗菌物質特性分析. 國立臺灣海洋大學食品科學研究所 碩士論文, 72pp.
- 張晶晶, 李宏俊, 秦豔杰 (2016) 文蛤 C 型凝集素基因 (Mm-Lec1) 的克隆與基因表達分析. 海洋學報, 38(6): 110-118.
- 陳春暉, 鍾國南 (1994) 玳瑁石斑之成長速率與飼料效率之初步探討. 水產研究, 2(2): 51-62.

- 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.
- 楊世平, 周家豪, 孫成波 (2018) 產乳酸芽孢桿菌對對蝦養殖水體水質之影響. 水產科學, 37(4): 489-493.
- 楊運楷, 宋曉鈴, 王海亮, 謝國駟, 黃捷 (2020) 一種複合益生菌對凡納賓對蝦抗副溶血弧菌感染能力之影響. 漁業科學進展, 41(3): 133-141.
- 葉海濱, 樊英, 嚴芳, 王曉璐, 李樂, 刁菁, 于曉清, 李天保 (2018) 益生菌製劑對虹鱒血清生化指標和免疫功能的影響. 華南師範大學學報, 50(3): 65-71.
- 劉慶輝, 余祥勇, 張鶴千, 李禎, 葉孝飛, 唐匯捐 (2020) 脫氮除磷益生菌對養殖尾水處理的研究進度. 海洋漁業, 42(4): 502-510.
- 鄧晶瑩, 朱惠真, 黃琬, 廖哲宏, 盧彥伶, 周昱翰, 吳豐成 (2018) 養殖文蛤病害防治研究. 水產試驗所 2018 年報, 67.
- 鄭紀盟, 孫國祥, 劉志培, 梁峻, 趙學偉, 劉鷹 (2014) 膠紅酵母和短小芽孢桿菌對魁蚶苗早期培育的影響研究. 安徽農業科學, 42(23): 7773-7777.
- 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.
- Abriouel, H., C. M. A. P. Franz, N. B. Omar and A. Gálvez (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol. Rev., 35 (1): 201-232.
- Allam, B. and E. P. Espinosa (2016) Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? Fish Shellfish Immunol., 53: 4-12.
- Avella, M. A., G. Gioacchini, O. Decamp, P. Makridis, C. Bracciatelli and O. Carnevali (2010) Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. Aqua., 305(1-4):12-19.
- Chu, J., Y. Wang, B. Zhao, X. M. Zhang, K. Liu, L. Mao and E. Kalamiyets (2019) Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 103(20): 8375-8381.
- Felix, K. A. K., E. D. Abarike and Y. Lu (2019) A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish Shellfish Immunol., 87: 820-828.
- Gao, X., C. Ke, F. Wu, X. Li and Y. Liu (2020) Effects of *Bacillus licheniformis* feeding frequency on the growth, digestion and immunity of *Haliotis discus hannai*. Fish Shellfish Immunol., 96: 1-12.
- Gao, X., C. Ke, M. Zhang, X. Li, F. Wu and Y. Liu (2019) Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth, immunity, and disease resistance of *Haliotis discus hannai*. Fish Shellfish Immunol., 94: 617-627.
- Gao, X., M. Zhang, X. Li, Y. Han, F. Wu and Y. Liu (2018) The effects of feeding *Lactobacillus pentosus* on growth, immunity, and disease resistance in *Haliotis discus hannai* Ino. Fish Shellfish Immunol., 78: 42-51.
- 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.
- Grandiosa, R., F. Mérien, T. Young, T. V. Nguyen, N. Gutierrez, E. Kitundu and A. C. Alfaro (2018) Multi-strain probiotics enhance immune responsiveness and alters metabolic profiles in the New Zealand black-footed abalone (*Haliotis iris*). Fish Shellfish Immunol., 82: 330-338.
- Huynh, T. G., Y. L. Shiu, T. P. Nguyen, Q. P. Truong, J. C. Chen and C. H. Liu (2017) Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. Fish Shellfish Immunol., 64: 367-382.
- Jiang, H. F., X. L. Liu, Y. Q. Chang, M.T. Liu and G. X. Wang (2013) Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Fish Shellfish Immunol., 35(1): 86-91.
- Kang, C. H., T. Gu and J. S. So (2018) Possible Probiotic *Lactic Acid Bacteria* Isolated from Oysters (*Crassostrea gigas*). Probiotics Antimicrob. Proteins, 10(4): 728-739.
- Nayak, S., C. Limsuwan, N. Chichurd, K. J. Kühlmann and S. Pungpang (2017) Antimicrobial activity of partially characterized analytes from *Bacillus pumilus* (B2). Aquac. Res., 48(11): 5606-5613.
- Newaj-Fyzul, A., A. H. Al-Harbi and B. Austin (2014) Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aqua., 413(20): 1-11.
- Nimrat, S., P.T. Tanutpongpalin, K. Sritunyalucksana, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai (2013) Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. Aquacult. Int., 21: 655-666.
- Offret, C., V. Rochard, H. Laguerre, J. Mounier, S. Huchette, B. Brillet, P. L. Chevalier and Y. Fleury (2019) Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*,

- Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. Probiotics Antimicrob. Proteins, 11(1): 239-247.
- Pandiyan, P., D. Balaraman, R. Thirunavukkarasu, E. G. J. George, K. Subaramaniyan, S. Manikkam and B. Sadayappan (2013) Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today, 5(1): 55-59.
- Sanders, M. E., L. Morelli and T. Tompkins (2003) Sporeformers as human probiotics : *Bacillus* , *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus* . Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 2(3): 101-110.
- Sidorova, T. M., A. M. Asaturova and A. I. Homyak (2018) Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. Agr. Biol., 53(1): 29–37.
- Silva-Aciaras, F., D. Moraga, M. Auffret, A. Tanguy and C. Riquelme (2013) Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet. J. Invertebr. Pathol., 113 (2): 163-176.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. R., 64(4): 655-671.
- 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. Aqua., 277(3/4): 203-207.
- 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 by indigenous probiotic *Bacillus* strains in mud crab ( *Scylla paramamosain* ). Fish Shellfish Immunol., 41(2): 156-162.
- Zhou, Z., F. Liu, X. Zhang , X. Zhou, Z. Zhong, H. Su, J. Li, H. Li, F. Feng , J. Lan, Z. Zhang, H. Fu, Y. Hu, S. Cao, W. Chen, J. Deng, J. Yu, W. Zhang and G. Peng (2018) Cellulose-dependent expression and antibacterial characteristics of surfactin from *Bacillus subtilis* HH2 isolated from the giant panda. PLoS One., 13(1): e0191991.
- Ziaei-Nejad, S., M. H. Rezaei, G. A. Takami, D. L. Lovett, A. Mirvaghefi and M. Shakouri (2006) The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aqua., 252(2-4): 516-524.