

七、水產病害研究

以益生菌的胞外萃取之抗菌物質改善文蛤養殖環境之研究

朱惠真¹、黃美瑩¹、林泓廷²、廖哲宏¹

¹水產養殖組、²國立臺灣海洋大學

本所 2015—2018 年進行雲嘉南地區的文蛤環境現場調查結果顯示：在 255 場的文蛤養殖池調查中，水質不良是佔文蛤死亡的最大因素（約佔 50%），創傷弧菌（*Vibrio vulnificus*）及巴西弧菌（*V. brasiliensis*）會造成文蛤的死亡，因此希望利用具有抗弧菌及改善水質特性之益生菌來改善文蛤可能大量死亡之因子。本計畫延用自白蝦腸道所純化出具有抗弧菌能力之枯草芽孢桿菌（*Bacillus pumilus* D5）來進行初探。在菌體的抑菌試驗結果發現：菌體培養上層液對於 *V. anguillarum*（鰻弧菌）、*V. vulnificus*（創傷弧菌）、*Streptococcus agalactiae*（無乳鏈球菌）及 *S. iniae*（海豚鏈球菌）有較強的抑菌效果。最低抑菌濃度為 *B. pumilus* D5 上層液稀釋 4—8 倍，相當於抗生素濃度 0.05—12.5 µg/ml（表 1）；而在抑菌 60 小時之試驗，以抑制弧菌的效果最佳，在抑菌物質稀釋 10 倍後作用 60 小時仍可以維持 99% 的抑菌率（表 2）。在特性分析部分，益菌物質對於溫度及酸鹼度具有高穩定性，對 pronase E（鏈黴蛋白酶 E）、proteinase K（蛋白酶 K）及 lipase（脂肪酶）具有高度敏感性（表 3）。最後將抗鏈球菌的物質析出，透過螢光顯微鏡所偵測的螢光

訊號強度，也證實此抗菌物質是藉由破壞病原菌的細胞膜來達到抑菌的效果。根據本研究所得到的抗菌物質的特性後續將進行田間試驗，進行文蛤池之水質、文蛤成長及抗菌力進行初探，也評估此益生菌的實用性。

表 2 *B. pumilus* D5 上層液對鰻弧菌 60 小時之抑菌試驗

時間 (小時)	胞外抗菌物質之抗菌率分析 <i>V. anguillarum</i>			
	2x	5x	10x	20x
12	97.8±0.0	98.6±0.0	96.3±0.0	100±0.0
24	99.9±0.0	99.9±0.0	99.8±0.03	98.5±0.02
36	99.9±0.0	99.9±0.0	99.9±0.0	99.9±0.01
48	99.9±0.0	99.9±0.0	99.8±0.0	82.9±0.0
60	99.9±0.0	99.9±0.02	99.9±0.0	80.5±0.0

表 3 *B. pumilus* D5 上層液經過不同酵素作用下對鏈球菌以及弧菌之抑菌能力影響

酵素類別	相對活性比(%)	
	鏈球菌	弧菌
對照組	100	100
α-胰凝乳蛋白酶	72.15±0.41	72.54±0.52
胰蛋白酶	86.16±0.27	70.81±0.18
鏈黴蛋白酶 E	10.28±0.63	62.54±0.31
蛋白酶 K	25.23±0.24	57.29±0.18
胃蛋白酶	74.83±0.48	97.15±0.31
脂肪酶	49.50±0.22	30.50±0.15

表 1 *B. pumilus* D5 上層液對 5 種病原菌之最小抑菌濃度測試

不同抗生素濃度產生之抑菌環大小(cm)	50(µg/ml)	25(µg/ml)	12.5(µg/ml)	6.25(µg/ml)	3.125(µg/ml)
<i>V. vulnificus</i>	2.2±0.1	2.0±0.2	1.9±0.1	1.5±0.1	1.1±0.2
<i>V. parahaemolyticus</i>	1.5±0.1	1.3±0.2	1.0±0.2	-	-
不同抗生素濃度產生之抑菌環大小(cm)	0.78(µg/ml)	0.39(µg/ml)	0.2(µg/ml)	0.1(µg/ml)	0.05(µg/ml)
<i>V. anguillarum</i>	2.2±0.1	1.6±0.2	1.3±0.2	-	-
<i>S. iniae</i>	2.2±0.2	2.0±0.3	1.8±0.1	1.6±0.1	1.2±0.1
<i>S. agalactiae</i>	2.1±0.3	2.0±0.1	1.8±0.3	1.5±0.2	1.0±0.1
不同益生菌胞外抑菌物質稀釋倍率濃度產生之抑菌環大小(cm)	1X	2X	4X	8X	16X
<i>V. vulnificus</i>	2.2±0.2	1.9±0.1	1.5±0.1	1.0±0.1	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	2.0±0.3	1.4±0.2	1.0±0.1	-	-
<i>V. anguillarum</i>	2.1±0.3	1.9±0.2	1.5±0.3	1.2±0.1	-
<i>S. iniae</i>	2.4±0.2	1.9±0.1	1.5±0.1	1.2±0.2	-
<i>S. agalactiae</i>	1.8±0.4	1.6±0.2	1.0±0.1	-	-