

公 開
 密件、不公開

執行機構（計畫）識別碼：140202F106

行政院農業委員會 95 年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：952825

計畫名稱： 有益微生物產品之研發與應用（第 1 年 / 全
程 1 年）

英文名稱： Research and mass production of probiotic
product

計畫編號： 95 農科—14.2.2—漁—F1(6)

全程計畫期間：95 年 4 月 21 日至 95 年 12 月 31 日

本年計畫期間：95 年 4 月 21 日至 95 年 12 月 31 日

計畫主持人：冉繁華

執行機關：國立台灣海洋大學水產養殖學系（所）

合作機關：農委會水產試驗所水產加工組

目 錄

目 錄	i
中文摘要	ii
英文摘要	iii
一、前言	1
二、材料方法	2
三、結果	6
四、結論	9
五、討論	10
參考文獻	13
附錄(表).....	20
附錄(圖).....	23

中文摘要

本實驗主要目的為探討水體中益生菌與病原菌之間的關係，進而了解益生菌抑制病原菌生長的效果。實驗中選擇使用*Rhodobacter sphaeroides*與三株廣泛存在於植物體與乳製品中對人類無毒性的益生菌分別為*Lactobacillus casei* (BCRC 10697)與*Lactobacillus brevis* (BCRC 10361、BCRC 12187)，檢測其對水質之變化與抑制病原性弧菌之效果。

水質測試方面：*Rhodobacter sphaeroides*在模擬表水層的實驗中需要使用 10^6 CFU/ml在第五天有去除亞硝酸明顯的差異，但是在模擬底層的實驗中可以發現其效果優於其在表層水體的表現。

抑菌方面：四株益生菌皆有抑制*Vibrio alginolyticus*生長之效果。比較四種益生菌對於病原菌*V. alginolyticus*的抑菌效果中發現，*Rhodobacter sphaeroides*其抑制效果最好；*L. casei* (BCRC 10697)、*L. brevis* (BCRC 10361)次之；而*L. brevis* (BCRC 12187)抑制效果最差。

在田間試驗部分探討光合細菌對養殖鰻魚和吳郭魚池水的菌叢和其腸內細菌叢的影響。以每週定量潑灑光合細菌，光合細菌可在鰻魚和吳郭魚的養殖池中形成優勢，但不影響水體總菌數，具有穩定水體菌叢的功能。定時定量潑灑光合細菌對於魚體腸內的總菌數和菌叢則沒有顯著影響。研究結果顯示光合細菌之作用除了改良水質外，也可透過菌種優勢，穩定水體菌叢，而抑制病原生物增生，達到預防疾病的效果。

關鍵詞：微生物控制、益生菌、鰻魚、吳郭魚

Abstract

The purpose of this study is determine the influence of one *Rhodobacter sphae-roides* and three lactic acid bacteria (LAB) strains on the bacterial load of water, three experiments were carried out. In first experiments, *Rhodobacter sphae-roides* was culture in TSB medium. LAB was culture in MRS broth and TSB medium. In MRS broth, growth rate was found highest in *Lactobacillus brevis* (BCRC 10361), follow by *L. brevis* (BCRC 12187), *L. casei* (BCRC 10697). In TSB, growth rate was found highest *L. brevis* (BCRC 12187), follow by *L. casei* (BCRC 10697), *L. brevis* (BCRC 10361).

In second experiments, to simulate the environment as bottom layer in the tank, *Rhodobacter sphaeroides* has ability to reduce ammonia-N and nitrite-N.

The third experiments, a completely inhibit of *V. alginolyticus* strain isolated from diseased *Haliotis diversicolor* was found in *L. brevis* (BCRC 10361) and *Rhodobacter sphae-roides*.

Keywords : Microbial Control , Probiotic , Eel , Tilapia

一、前言

為了解決大量病原性細菌出現的問題，一般蝦苗業者大多以藥物控制細菌的數量，或以高溫刺激蝦苗脫殼，縮短培育時間，來避免病原菌的感染。正因為育苗業者不斷的使用藥物控制，使細菌產生了抗藥性，讓藥效逐漸降低。而高溫反而使蝦苗在非自然的狀態下助長，常使蝦苗產生體弱、畸形，與無法適應外界的飼養環境。(養殖水產生物與病害防治，2003)

雖然使用抗生素對水產養殖生物有相當良好的抗菌效果，但是卻帶來了許多有害的負面衝擊，例如：藥物殘留導致食品安全上的疑慮，也容易導致微生物產生抗藥性的問題 (Austin and Austin, 1993)。因此利用微生物產品也就是『益生菌』將逐漸取代使用在養殖生物的抗生素。

益生菌除了具有改善水質外，也具有穩定魚體腸內菌相和生物性控制病原菌的功效。Nikoskelainen et al. (2003)的報告中指出乳酸菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 具有強化魚體免疫的功能。所以益生菌可能藉由和病原競爭，在腸道內形成優勢，或增加寄主對病原體抵抗力的方式達到降低疾病危害的程度。

本實驗中選擇使用三株廣泛存在於植物體與乳製品中對人類無毒性的益生菌分別為 *Lactobacillus casei* (BCRC 10697) 與 *Lactobacillus brevis* (BCRC 10361、BCRC 12187)，希望利用其抑菌的能力來謀求解決近年來造成養殖生物大量死亡的病原菌，例如：九孔的 *Vibrio alginolyticus*、海鱺的 *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* 等的疾病問題。

二、材料方法

微生物培養與保存：

材料：

1、本實驗使用的微生物為 *Rhodobacter sphaeroides* 、
Lactobacillus casei (BCRC No 10697) 與 *Lactobacillus brevis*
(BCRC No 10361、BCRC No 12187)。

2、培養基：

(1) 小量培養：由Difco公司的產品中選擇適合各種益生菌或病原菌生長之固態與液態培養基。平板培養基為：TSA (Tryptic Soy Agar)、MRS broth (Man Rogosa and Sharp broth)+1.5% NaCl與0% NaCl，液態培養基為：TSB (Tryptic Soy Broth)、MRS broth (Man Rogosa and Sharp broth)+1.5%NaCl與0% NaCl。分別製作成液態與平板固態培養基備用。

(2) 中量與大量培養：

培養基主配方 (1000ml×stock)：

1.0g/l KH_2PO_4 、0.1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g/l NaCl、
0.05 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g/l NH_4Cl 、1.0 g/l
 NaHCO_3 、0.2 g/l Yeast Extract、5 g/l 琥珀酸

Mineral elements：

2 g FeSO_4 、20.1g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、
0.02g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1000 ml Distilled water

Growth factors：

500 mg Vitamin B complex、1000 ml Distilled water

3、三角錐形瓶：1000 毫升

4、塑膠桶：5 公升、20 公升可滅菌之PVC 塑膠桶 (中、大培養使用)

5、儀器：恆溫培養箱(Growth Chamber)、無菌操作台(Laminar flow)、分光光度計 (Spectrophotometer)

方法：

(一) 微量培養：

- i、 將500ml TSB加入1000ml錐形瓶中，塞上透氣塞滅菌後備用。
- ii、 將 *Rhodobacter sphaeroides*、*Lactobacillus casei* (BCRC No 10697) 與 *Lactobacillus brevis* (BCRC No 10361、BCRC No 12187) 之益生菌均勻塗布在TSA上，於28°C培養48小時後以10ml TSB洗下。
- iii、 將洗下之菌液接種於500ml的TSB中。置於恆溫培養箱中，以28°C 150rpm培養72小時。
- iv、 使用分光光度計於可見光600nm測試吸光值。將吸光值換算成理想活菌數。

中量培養：

- i. 在5 公升可滅菌之PVC 塑膠桶內添加培養液及過濾海水（或二次水）4 公升後進行高溫高壓滅菌121 °C、20 分鐘。
- ii. 待冷卻後則即接種2-3 公升為量培養之菌液入5 公升塑膠桶。設置溫度為28 °C、光度介於4000-5000 Lux。

微量-大量培養過程：1 公升錐形瓶培養2-3 天，移至 5公升塑膠桶培養2-3 天，20 公升可滅菌塑膠桶 4-5天。

(二) 批次培養下益生菌活菌數之測定

- 1、取單一菌落之菌株，均勻塗抹於TSA平板固定培養基上，於28°C下培養24小時。
- 2、用10ml TSB將培養基之益生菌洗下，使用分光光度計於可見光OD=600nm調整濃度使其吸光值為1。
- 3、取1ml混合均勻之菌液加入9ml 2 %滅菌食鹽水中稀釋，混和均勻後吸取50µl的懸浮菌液接種於TSA上，以塗抹棒均勻的塗布。每一種濃度作三重複。
- 4、重複稀釋步驟9次，直到塗布的菌液為10¹⁰ 倍為止。

- 5、將接種後的TSA置於28 °C下培養48小時。
- 6、計算在TSA培養基上的菌落數，即可算原始菌液中所含的活菌數。

(三) 菌種保存

採用繼代培養的方式進行菌種的保存，以TSA為繼代用之培養基。將三株益生菌之純種單一菌落以劃線法接種於培養基上，於28 °C下培養48小時後，置於4°C冰箱。每隔兩週重複繼代一次。

(四) 品質管制 (Q. C.)

- 1、每次生產之有益微生物產品以塗佈法測量活菌數，活菌數須達到 10^9 CFU/ml。
- 2、以分光光度計 (600 nm) 檢測吸光值OD=1以上。當吸光值為1時，*Rhodobacter sphaeroides*的平均活菌數為 5.2×10^8 CFU/ml。
- 3、以分光光度計 (540 nm) 檢測吸光值OD=1以上。當吸光值為1時，*L. brevis* (BCRC 10361) 的平均活菌數為 3.9×10^8 CFU/ml。*L. casei* (BCRC No 10697) 的平均活菌數為 2.27×10^8 CFU/ml。*L. brevis* (BCRC No 、12187) 的平均活菌數為 1.08×10^8 CFU/ml。

(五) 田間試驗

本計畫所選擇的養殖池均為土池，土堤並沒有植被。分別為鰻池 5 戶和台灣鯛 3 戶。每戶選 3 池，其中一池當作對照組。

1. 益生菌

本計畫所使用的細菌為紅色光合成細菌。施用方式為每週潑灑一次，使用菌液約為 20ppm。

2. 細菌採樣和分析

每個池子每個月採樣一次，檢測池水之溫度、pH、銨和亞硝酸含量，秤取魚體重，分析池水和腸內細菌相。

a. 腸內菌相分離和定量

每個池子取三條魚，以 70%酒精棉消毒體表後以無菌

操作方式取下腸子並秤重，取約 1 克的腸磨碎，吸取約 0.2 克研磨液加入 10 ml 的無菌食鹽水 (0.85%)，進行系列稀釋至 10^{-5} 。取 0.1 ml 的稀釋液塗抹在 TSA 培養皿上，每組 2 重複。

b. 水體菌相分離和定量

將水體無菌食鹽水 (0.85%)，進行系列稀釋至 10^{-5} 後塗抹在 TSA 培養皿上，每組 2 重複。

c. 總菌數統計

將上述接種細菌的培養盤放入 30°C 培養箱培養 24~48 小時，計算所有細菌菌落數，每盤的菌落數應在 30~300 間。

d. 細菌分離和鑑定

觀察紀錄菌落的形態、大小和顏色，必要利用倒立顯微鏡觀察細菌群落的表面和邊緣。每個類似的菌落挑 2~3 個，劃菌純化後，利用相位差顯微鏡，觀察並紀錄菌體大小、形態、運動性和鞭毛，而後進行革蘭氏染色，並紀錄其染色性質。分離的細菌用 API 微生物鑑定試劑組培養後，以 ATB 全自動微生物鑑定系統鑑定細菌的屬或種。

e. PCR-RFLP 分析

取一菌落懸浮於 100 μl 的 TE buffer，在 100°C 加熱 10 分鐘，取 5 μl 當作 DNA 模板。以 16sDNA 引子對 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA G-3'; 1522R 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' 進行 PCR。所得的產物以 1% 瓊脂電泳分析後，將產物從膠體切下，純化和以限制酶 HaeIII、HindIII 或 EcoRI 切割，經膠體電泳分析後，分析計算 DNA 片段的大小及相對的含量。

f. 數據分析：將所得的數據以統計軟體分析其標準偏差，益生菌處理組和對照組，處理前後菌相變化的差異性。

三、結果

(一) 不同培養基培養下之生長曲線

(1) *Rhodobacter sphaeroides* 以 TSB 為培養基之生長情形：

在以 TSB 為培養基的條件下，可以很明顯發現在接種後約 24 小時 *Rhodobacter sphaeroides* 可達到生長曲線對數期的頂端。

(2) *L. casei* (BCRC 10697) 、*L. brevis* (BCRC 12187 、10361) 以 MRS broth 為培養基之生長情形 (Fig. 2)：

- 1、在相同的培養條件下，可以很明顯發現在接種後 72 小時 *L. casei* (BCRC 10697) 、*L. brevis* (BCRC 12187) 才達到對數期的頂端，而 *L. brevis* (BCRC 10361) 則在約 36 小時即達到生長曲線頂端，隨後即快速步入死亡期。
- 2、三株乳酸菌生長至 72 小時之最終菌生產量以 *L. brevis* (BCRC 10361) 、*L. casei* (BCRC 10697) 生長菌量最多可達到 10^{11} CFU/ml，而 *L. brevis* (BCRC 12187) 生長菌量最多可達到 10^{10} CFU/ml。
- 3、由對數期生長曲線斜率可以發現，三株益生菌之生長速率 BCRC 10361 > BCRC 12187 > BCRC 10697。

(3) *L. casei* (BCRC 10697) 、*L. brevis* (BCRC 12187 、10361) 以 TSB 為培養基之生長情形 (Fig. 3)：

- 1、在相同的培養條件下，可以很明顯發現在接種後約 36 小時 *L. brevis* (BCRC 10361) 、*L. casei* (BCRC 10697) 可達到對數期的頂端，而 *L. brevis* (BCRC 12187) 則在約 18 小時即達到生長曲線頂端。
- 2、三株乳酸菌生長至 72 小時之最終菌生產量皆為 109 CFU/ml。
- 3、由對數期生長曲線斜率可以發現，三株益生菌之生長速率為 BCRC 12187 > BCRC 10697 > BCRC 10361。

(二) 水質測試

- (1) 實驗分別模擬表水層與水體底層的環境，結果發現對氨都有分解能力。模擬表層水體 Fig. 4 與模擬水體底層 Fig. 5 的環境中皆有良好去除氨-氮的能力。
- (2) *Rhodobacter sphaeroides* 的添加至總菌量為 10^5 CFU/ml 時，其去除氨-氮的能力並不如 10^4 CFU/ml。這樣的結果應該是過高添加量，引起營養鹽競爭，而使得菌種數量或活性降低所致。
- (3) 模擬表水層與水體底層的環境，結果發現對亞硝酸有分解的能力 (Fig. 6、Fig. 7)。

(三) 抑菌實驗

- (1) 益生菌對抑制病原性弧菌的實驗中可以很明顯的看出 *Rhodobacter sphaeroides* 對 *V.alginolyticus* 有顯著的抑菌效果。可以推論 *Rhodobacter sphaeroides* 具有非常好的抑制病原性弧菌效果。在具有 10^3 CFU/ml 病原性弧菌的水體如果添加 10^2 CFU/ml 的 *Rhodobacter sphaeroides*，在 72 小時可 100% 抑制病原性弧菌的生長。
- (2) 添加 *L. casei* (BCRC 10697) 與 *L. brevis* (BCRC 10361) 懸浮液濃度至 10^2 CFU/ml 即有顯著抑菌效果，無論添加任何濃度 *L. brevis* (BCRC 12187) 早期有顯著抑菌功效，但於添加益生菌 48 小時後，益生菌無任何抑菌效果與對照組比較無顯著差異 ($p > 0.05$)；而於添加 72、96 小時，無論添加任何濃度與對照組比較皆有顯著抑菌效果 ($p < 0.05$) (Fig. 8、9、10、11)。

(四) 實驗池

池水水質檢測，無論是吳郭魚或鰻魚，實驗組和對照組間並沒有太大的差異，養殖戶之間和採樣時間之間的差異較大。pH 在 7.6 ± 0.2 ，銨在 0~2 ppm 之間，亞硝酸大都在 0.5 ppm 以下，有的養殖戶的池子高於 1 ppm。

鰻魚池和吳郭魚池池水每單位毫升水體總菌數的調查結果如表 1 和表 2。在歷次的採樣實驗中，各池池水總菌數的變化並不明顯，但各養殖池間的總菌數，實驗組間或實驗組和對造組，有的

會有較明顯的差異。此差異的造成可能和池子本身的性質，如池子優氧化程度或藻水的形成有關。鰻魚和吳郭魚腸內每公克組織含有的總菌數見表 3 和表 4，細菌總數並沒有明顯變化。

菌相的組成以革為主，約佔分離出菌株的 66%，其次為革蘭氏陽性球菌約 16%，革蘭氏陽性長桿菌也有一些。蘭氏陰性桿菌以 *Aeromonas hydrophila* 最常見、其次為 *Pseudomonas stutzeri* 和 *P. aeruginosa*，不管是養鰻池或吳郭魚池都一樣。而 *Vibrio cholera* 和 *V. alginolyticus* 則在鰻魚池較多，*Serratia marcescens*、*Moell. Wisconsinensis* 和 *Enterobacter cloacae* 也可分離出來。革蘭氏陽性球菌大都是 *Streptococcus*，包括 *S. anginosus*、*S. dysgalactiae* ssp *equisimilis* 和 *S. mitis*。蘭氏陽性長桿菌主要為枯草桿菌 *Bacillus subtilis*。池水的菌相在尚未以光合菌處理前，或未使用光合菌的對照組，其菌相較複雜，並且容易培養出黴菌。光合菌處理的實驗組，其池水的菌相比較一致，培養出的細菌以光合菌較多，顯示持續給予光合菌可以形成較優勢的菌種，抑制其他細菌的增生。然而腸內的菌叢，實驗組和對照組並沒有明顯差異。

以 PCR-RFLP 的方式我們可以區分出不同種的細菌，利用生化鑑定出的細菌當作正對照組，可以快速從分離的菌落鑑別出可能歸屬的屬或種，可以用來快速鑑定菌種，節省生化鑑定的時間。

四、結論

- 1、在模擬底水層條件下 *Rhodobacter sphaeroides* 仍有顯著去除氨-氮與亞硝酸-氮的效果。
- 2、*Rhodobacter sphaeroides* 對病原性弧菌有抑制其生長的能力。只要添加到 10^2 CFU/ml 時即會對病原性弧菌的生長有 100% 的抑制效果。
- 3、*L. casei* (BCRC 10697) 抑制 *Vibrio alginolyticus* 實驗中，顯現添加濃度達 10^2 CFU/ml 即有顯著抑菌效果；抑制 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 方面，添加需達 10^6 CFU/ml 才有顯著且穩定的抑菌效果。
- 4、*L. brevis* (BCRC 10361) 抑制 *V. alginolyticus* 實驗中，顯現添加濃度達 10^2 CFU/ml 即有顯著抑菌效果；抑制 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 方面，添加濃度至 10^2 CFU/ml 即有抑菌效果，而添加濃度至 10^6 CFU/ml 在 72 小時可達到完全抑制 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 的功效。
- 5、*L. brevis* (BCRC 12187) 抑制 *V. alginolyticus* 實驗中，僅在 24 小時有顯著抑菌功效；抑制 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* 方面，僅在 24 小時有顯著抑菌效果，但於添加益生菌 24 小時後，則完全無任何抑菌功效。
- 6、持續添加光合菌於吳郭魚與鰻魚池中，確實會造成菌種優勢，並影響水體菌叢，有穩定水體菌叢的效用。
- 7、持續添加光合菌於吳郭魚與鰻魚池中，在魚體腸內菌叢，則沒有顯著的影響。

五、討論

(一) 生長曲線

(1) *Rhodobacter sphaeroides*

光照充足的條件下，光合菌可以很輕易的在 24 小時之內到達生長曲線中的穩定期。光合細菌生長跟光照有密切的關係，在提供 1100Lux 光照下，光合細菌的生長曲線有明顯的提高 (Aiking and Sojka, 1979)，而且不易出現菌塊凝聚的現象，同時菌液也呈現鮮豔的酒紅色。而在 400Lux 的照度下，不僅生長較為緩慢而且菌液成紅褐色。由此可知，當提供足夠光照時，不但會影響光合菌的生長曲線，也會影響其色素的合成 (Hiraishi and Kitamura, 1984) (Fig. 1)。

(2) *Lactobacillus casei* (BCRC No 10697) 與 *Lactobacillus brevis* (BCRC No 10361、BCRC No 12187)

本實驗採用 DIFCO 所生產之兩種液態培養基為 TSB 與 MRS broth 做為大量培養用發酵培養基。結果發現兩組培養基在相同的培養條件下成長效果都相當不錯。由培養菌數中發現，以 MRS broth 為培養基時，三株益生菌所生長的最高菌數可達到 10^{10} CFU/ml，*Lactobacillus brevis* (BCRC 10361)、*Lactobacillus casei* (BCRC 10697) 甚至可達到 10^{11} CFU/ml 的菌量。以 TSB 為培養基時，*Lactobacillus brevis* (BCRC 12187) 所生長的最高菌數僅達到 10^9 CFU/ml，其餘兩株益生菌產生的最高菌量為 10^{10} CFU/ml。益生菌生長的最高菌量與在 MRS broth 的菌量差異有 10 倍之多。比較兩種培養基成分後發現，增強乳酸菌生長的成分物質可能為 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 NH_4^+ 與 Sorbitan Monooleate complex (Tween 80) 等微量金屬離子。Garvie (1986) 提出 Tween 80 為乳酸菌菌體生長時所需要的類似維生素物質，有利於乳酸菌的生長所利用，其實驗結果與本實驗生長曲線結果相似。

本實驗結果發現，無論是使用 MRS broth 或 TSB 為發酵培養基進行培養時，當培養至 18 小時皆可達到細菌生長的對數期，而王(2001) 利用 MRS broth 發酵培養基培養乳酸菌，在培養至 18 小時就到達穩定期，而江 (2000) 指出添加 NaCl

大於或等於 2% 反而會阻礙延緩菌體之生長，但與本實驗結果並不相同，且其達到穩定期益生菌菌量低於本實驗平穩期 (stationary phase) 之菌量。推測可能原因為不同乳酸菌其耐鹽的程度亦不相同，Jiménez *et al.* (1993) 指出添加 4% NaCl 至 MRS broth 可促進 *L. plantarum* LPCO10 的成長亦可促使細菌素的產生。Ogunbanwo *et al.* (2003) 指出，乳酸菌產生細菌素分別在對數期 (log phase) 與平穩期 (stationary phase)，且其間產生的細菌素抑菌活性最佳。因此，本實驗的抑菌部分採用培養 18 小時，處於對數期 (log phase) 活性最佳之乳酸菌進行抑菌實驗。

(二) 水質測試

Rhodobacter sphaeroides 在模擬表水層的實驗中需要使用 10^6 CFU/ml 在第五天有去除亞硝酸明顯的差異，但是在模擬底層的實驗中可以發現其效果優於其在表層水體的表現。這樣的結果應該是由於 *Rhodobacter sphaeroides* 在擬底層水體的條件下可以利用亞硝酸氮還原酵素 (Sawada *et al.*, 1977) 其直接利用亞硝酸或硝酸當作氮源而加以利用 (Dobao *et al.*, 1993)。

(三) 抑菌實驗

本實驗並無法瞭解益生菌與弧菌屬間競爭的機制，僅能就弧菌間生長狀況的差異進行討論。根據 Fuller (1992) 的研究，其認為益生菌所產生的抗微生物產物可以抑制病原菌生長，而 Appella *et al.* (1992) 的研究中也有相同的發現。這樣的代謝物質統稱為 Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS)。在本實驗中可以發現在低濃度添加益生菌的實驗組中就有很好的抑菌效果，例如 *Rhodobacter sphaeroides*。根據 Imhoff *et al.* (1976; 1982; 1988) 利用營養成份較低的 AT 培養基來看，光合菌需要 72 小時才可到達生長曲線之頂點。而由本實驗控制組中可以發現，弧菌屬於海水中皆有非常快的生長速率，而其在 72 小時內均可生長至生長曲線頂點，同時病原菌的濃度亦高於 *Rhodobacter sphaeroides*，故可以判斷營養鹽競爭並不是病原性弧菌生長受到抑制的主要原因。

(四) 田間實驗

許多文獻已經證實益生菌可以幫助養殖生物成長，並可以透過競爭抑制、改善水質和刺激活化免疫系統的方式預防養殖生物罹病 (Balcazar et al., 2006)。許多研究也已經證實光合細菌可以改善水質，幫助養殖生物成長，但對於實際上的養殖過程中，光合細菌對於水體和魚體內細菌叢的影響仍不清楚。本計畫以養殖鰻魚和吳郭魚為對象，進行田野實驗，藉此了解光合細菌是否會影響養殖水體和魚體腸內菌叢變化。結果顯示持續潑灑光合細菌確實會造成菌種優勢，並影響水體菌叢，有穩定水體菌叢的效用。但在魚體腸內菌叢，則沒有顯著的影響。這可能是因光合細菌須在有日光照射的環境才可以活存，而且由魚體經由水體吞入的光合細菌，無法抵抗魚的消化作用，所以無法在魚腸內形成優勢。所以，若要改善和穩定魚體腸內的細菌叢，必須餵食其他種的益生菌，如乳酸菌。

參考文獻

- 王姿惠，2001。益生菌於含果寡糖之培養環境中生長情形之探討。國立中興大學食品科學系，碩士學位論文，P. 48。
- 行政院農委會水產試驗所，2003。養殖水產生物病害防治。P.170-184。
- 江冕榮譯，1985。微生物菌種保存法。P. 214
- 潘崇良、張啟華、郭鴻均、郭俊德，1995。乳酸菌細菌素之抑菌力及對泥鰱若干菌群之影響。中國農業化學會誌。33(4), 444-458。
- Abee, T., Klaenhammer T.R., Letellier, L., 1994. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl. Environ. Microbiol. 60(3), 1006-1013.
- Aiking, H. and Sojka, G., 1979. Response of *Rhodospseudomonas capsulata* to illumination and growth rate in a light-limited continuous culture. J. Bacteriol., 139(1):530-536.
- Austin, B., Austin, D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 2nd edn. Simon & Schuster, Chichester.
- Balcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. (2006) The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol. 114:173-86.
- Böhnel, H., Lohavanijaya, P., Rungin, S., Schnug, C., Seifert, H.S.H., 1999. Active immunisation of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) against vibriosis in Thailand. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 289–295.
- Brinkley, A.W., Rommel, F. A., Huber, T.W., 1976. The isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and related vibrios from moribund aquarium lobsters. Can. J. Microbiol. 22, 315–317.

- Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y., Oh, T.K., 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 305-308.
- Cachon, R., Divies, C., 1994. Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis biovar. diacetylactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 694-699.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R., 1987. Survival of lactic acid in the human stomach and adhesion to intestinal cell. J. Adiry Sci. 70, 1-12.
- Dahyia, R.S., Speck, L., 1968. Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. dairy. sci. 73, 199-307.
- Davey, G.P., Richardson, B.C., 1981. Purification and properties of diplococin from *Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 41, 84-89.
- Figueras, A., Novoa, B., Planas, M., Villamil, L., 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture 219, 43-56.
- Fouz, B., Toranzo, A.E., Mila'n M., Amaro, C., 2000. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. J. Appl. Microbiol. 88, 531-535.
- Fuller, R., 1992. Probiotics: The Scientific Basis. Chapman and Hall, Landon.
- Garriques, D., Arevalo, G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial I. galbanalate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. En: Browdy, C.L., Hopkins, J.S (eds.) Swimming through troubled water. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lousiana, USA. pp. 53-59.

- Garvie, E.I., 1986. Genus *Leuconostoc*, P. 1071-1075. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (ed.) , *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wikins, Baltimore.
- Gatesoupe F.J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers *B. plicatilis*, and their dietary value for larval turbot. *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96, 335-342.
- Gatesoupe F.J., 1993. *Bacillus* sp. spores as food additive for their rotifer *Brachionus plicatilis* : improvement of thei bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. In : *Fish Nutrition in Practice* (ed. By S. J. Kaushik & P. Luquet) , pp. 561-568. ICES, 1991, Institute National de la Recherche Agronmique, Paris, Les Colloques 61.
- Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, (*Scophthalmus maximus*) against pathogenic vibrio. *Aquat. Living Resour.* 7, 182-277.
- Gatesoupe F.J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147-165.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., Christen, R., 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Sniezko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 139–144.
- Graciela, M., Vignolo, M., de Kairuz, M., Aida, A.P., de Ruiz, H., Oilver, G., 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *L. casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 5-10.
- Hiraishi, A. and Kitamura, H., 1984. *J. Ferment. Technol.* 62, 293-296.
- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C., 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1416-1424.

- Klaenhammer, T.R., 1982. Microbiological considerations in selection and preparation of lactobacillus strains for use as dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.* 65, 1339-1349.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-85.
- Kusuda, R., Yokoyama, J., Kawai, K., 1986. Bacteriological study on cause of mass mortalities in cultures buack sea bream fry. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish* 52, 1745-1775.
- Lee, K.K., Ellis. A.E., 1990. Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolyisin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172, 5382-5393.
- Lee, K.K., Liu, P.C., Chen, Y.C., Huang, C.Y., 2000. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *J. Thermal Biology* 26, 585-587.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, T.J., 1991. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1683-1688.
- Lilly, D.M., Stilwell R.H., 1965. Probiotics: Growth promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science.* 147, 747-748.
- Lin, J.H., Chen, T.Y., Chen, M.S., Chen, H.E., Chou, R.L., Chen, T.I., Su, M.S., Yang, H.L. (in press) , 2005. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture*
- Magariños, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1996b. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 29-34.

- Mileet, R.D., Arafa, A.S., Harms, Carlson ,C.W., Reid, D.L., Crawford, J.S., 1981. Effect of a living nofreeze dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg quality and gut microflora in commercial layers. Poultry Sci. 60, 993-1004.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351– 358.
- Morris, S.L., Walsh, R.C., Hansen, J.N., 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. J. Biol. Chem. **259**(21), 13590–13594.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. Crit. Rev. Food Sci. 39, 13-126.
- Nettles, C.G., Barefoot, S.G., 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 56, 338-356.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Liliusa, E., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish & Shellfish Immunol. 15, 443–452.
- Noguchi, Y., Hwang, D.F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., Hashimoto, K., 1987. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis*. Mar. Biol. 94, 625-630.
- Nottage, A.S., Birkbeck, T.H., 1987. Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. J. Fish Dis. 10, 211-220.
- Noh. S.H., Han, K., Won, T.H., Choi, Y.J., 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. Korean J. Anim. sci. 36, 480-486.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., Onilude, A.A., 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. J. of Biotechnol. 2 (7), 179-184.

- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Barja, J.L., 2000. Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. Dis. Aqua. Organ. 40, 177-183.
- Parker, R.B., 1974. Probiotics: The Other Half of The Antubiotic Story in Anim. Nutr. Health 29, 4-8.
- Peele, E.R., Singleton, F.L., Deming, J.W., Cavari, B., Colwell, R.R., 1981. Effects of pharmaceutical wastes on microbial populations in surface waters at the Puerto Rico Dump site in Atlantic ocean. Appl. Environ. Microbiol. 41, 873-879.
- Plumb, J.A., Schachte, J.H., Gaines, J.L., Peltier, W., Carroll, B., 1974. *Streptococcus* sp. From marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. Trans. Am. Fish. Soc. 103, 61-358.
- Rammelsberg, M., Radler, F., 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bacteriol. 69, 177-184.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 1998. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167, 301-313.
- Romald, J.L., Magarinos, B., 1997. Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. Dev. Bio. Stand. 90, 167-177.
- Sakazaki, R. 1968. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 21: 359-362.
- Saulnier, D.P., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191, 133-144.
- Sudirman, I., Mathieu, F., Benoit, V., Lefbvre, G., 1994. Properties of two bacteriocins synthesized by *Leuconstoc* strains. Curr. Microbiol. 28, 155-159.

- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 21, 933-943.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40, 722-756.
- Tangredi, B.P., Medway, W., 1980. Post-mortem isolation of *Vibrio alginolyticus* from an atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) . J. Wildlife Dis. 16, 329-331.
- Tung, M.C., Tsai, S.S., Ho, L.F., Huang, S.T., Chen, S.C., 1985b. An acute septicemic infection of *Pasteurella* organism in pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculate* Lacepeda) in Taiwan. Fish Pathol. 20, 143-148.
- Vera, P., Navas, J.I., Quintero, M.C., 1992. Experimental study of the virulence of three species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus* (Bate 1881) juveniles. Aquaculture 107, 119-123.

附錄（表）

表 1. 鰻魚池每次採樣的池水細菌總數。單位 cfu/ml。

養殖 戶	養殖池	使用前	1 個月後	2 個月後	3 個月後
A	Test1	$6.8 \pm 1.3 \times 10^7$	$6.2 \pm 3.5 \times 10^7$	$1.9 \pm 2.4 \times 10^8$	$9.6 \pm 5.2 \times 10^7$
	Test2	$7.6 \pm 1.4 \times 10^7$	$4.3 \pm 2.3 \times 10^7$	$3.0 \pm 1.8 \times 10^7$	$5.3 \pm 3.6 \times 10^7$
	Control	$4.2 \pm 1.6 \times 10^7$	$5.4 \pm 3.2 \times 10^7$	$7.2 \pm 2.8 \times 10^7$	$8.3 \pm 6.5 \times 10^7$
B	Test1	$4.8 \pm 1.8 \times 10^5$	$6.3 \pm 2.5 \times 10^5$	$2.8 \pm 1.0 \times 10^5$	$2.5 \pm 3.1 \times 10^5$
	Test2	$3.4 \pm 1.8 \times 10^5$	$6.5 \pm 3.5 \times 10^5$	$7.0 \pm 2.9 \times 10^5$	$5.6 \pm 2.1 \times 10^5$
	Control	$5.6 \pm 2.4 \times 10^4$	$6.8 \pm 4.2 \times 10^4$	$7.8 \pm 5.2 \times 10^4$	$9.2 \pm 3.3 \times 10^4$
C	Test1	$3.1 \pm 1.6 \times 10^5$	$5.2 \pm 2.2 \times 10^4$	$3.1 \pm 1.2 \times 10^4$	$4.2 \pm 2.5 \times 10^4$
	Test2	$6.6 \pm 2.6 \times 10^5$	$3.5 \pm 2.1 \times 10^4$	$1.4 \pm 2.5 \times 10^4$	$3.3 \pm 5.6 \times 10^4$
	Control	$5.2 \pm 2.3 \times 10^5$	$8.7 \pm 6.3 \times 10^4$	$2.0 \pm 1.6 \times 10^4$	$4.6 \pm 3.5 \times 10^4$
D	Test1	$6.8 \pm 1.3 \times 10^6$	$2.0 \pm 2.1 \times 10^7$	$1.7 \pm 4.8 \times 10^7$	$2.3 \pm 2.5 \times 10^7$
	Test2	$7.6 \pm 1.4 \times 10^7$	$9.2 \pm 7.2 \times 10^6$	$1.5 \pm 2.3 \times 10^6$	$3.5 \pm 1.1 \times 10^6$
	Control	$4.2 \pm 1.6 \times 10^7$	$3.3 \pm 1.2 \times 10^6$	$4.6 \pm 3.6 \times 10^6$	$2.3 \pm 2.2 \times 10^6$
E	Test1	$3.8 \pm 2.4 \times 10^5$	$5.6 \pm 3.3 \times 10^5$	$1.2 \pm 1.9 \times 10^5$	$6.3 \pm 2.1 \times 10^5$
	Test2	$2.5 \pm 1.8 \times 10^5$	$3.7 \pm 1.6 \times 10^5$	$2.9 \pm 2.6 \times 10^5$	$4.2 \pm 2.8 \times 10^5$
	Control	$4.3 \pm 1.5 \times 10^5$	$4.5 \pm 3.9 \times 10^5$	$5.3 \pm 2.1 \times 10^5$	$2.3 \pm 1.0 \times 10^5$

表 2. 吳郭魚池每次採樣的池水細菌總數。單位 cfu/ml。

養殖戶	養殖池	使用前	1 個月後	2 個月後	3 個月後
F	Test1	$4.3 \pm 1.4 \times 10^6$	$8.9 \pm 6.4 \times 10^6$	$6.3 \pm 4.3 \times 10^6$	$3.6 \pm 4.6 \times 10^6$
	Test2	$1.1 \pm 1.0 \times 10^7$	$5.4 \pm 2.1 \times 10^7$	$6.6 \pm 5.3 \times 10^7$	$2.3 \pm 0.5 \times 10^7$
	Control	$2.3 \pm 1.2 \times 10^6$	$3.2 \pm 3.1 \times 10^6$	$3.6 \pm 5.2 \times 10^6$	$5.4 \pm 1.5 \times 10^6$
G	Test1	$1.6 \pm 0.8 \times 10^6$	$6.2 \pm 2.3 \times 10^6$	$6.3 \pm 1.2 \times 10^6$	$8.2 \pm 6.3 \times 10^6$
	Test2	$8.5 \pm 3.1 \times 10^5$	$5.6 \pm 1.4 \times 10^5$	$2.1 \pm 0.5 \times 10^5$	$3.3 \pm 1.31 \times 10^5$
	Control	$7.8 \pm 1.4 \times 10^5$	$8.4 \pm 1.8 \times 10^5$	$5.6 \pm 3.6 \times 10^5$	$7.7 \pm 1.5 \times 10^5$
H	Test1	$5.6 \pm 2.4 \times 10^6$	$6.4 \pm 4.3 \times 10^6$	$8.7 \pm 4.5 \times 10^6$	$3.6 \pm 2.3 \times 10^6$
	Test2	$2.1 \pm 0.9 \times 10^6$	$1.6 \pm 1.8 \times 10^6$	$3.3 \pm 1.5 \times 10^6$	$1.4 \pm 5.2 \times 10^6$
	Control	$3.9 \pm 1.6 \times 10^6$	$9.8 \pm 6.5 \times 10^6$	$4.3 \pm 2.2 \times 10^6$	$2.59 \pm 2.1 \times 10^6$

表 3. 鰻魚池每次採樣的腸內細菌總數。單位 cfu/g。

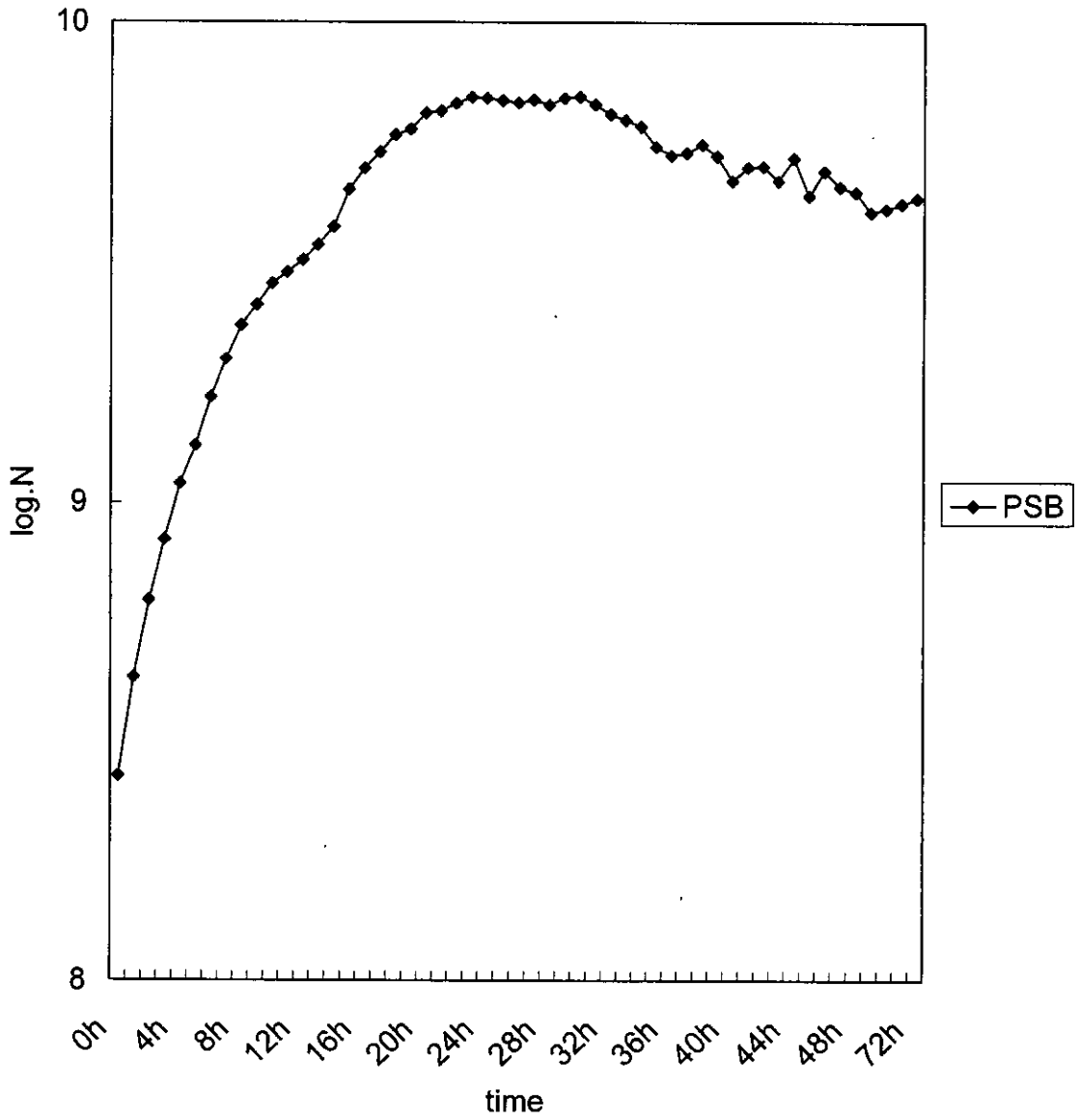
養殖 戶	養殖池	使用前	1 個月後	2 個月後	3 個月後
A	Test1	$2.3 \pm 2.5 \times 10^7$	$5.5 \pm 2.1 \times 10^6$	$4.3 \pm 2.1 \times 10^7$	$6.4 \pm 4.1 \times 10^7$
	Test2	$9.3 \pm 5.8 \times 10^5$	$6.4 \pm 3.2 \times 10^5$	$5.4 \pm 2.3 \times 10^5$	$7.4 \pm 1.8 \times 10^5$
	Control	$1.1 \pm 2.3 \times 10^7$	$2.9 \pm 1.9 \times 10^7$	$2.3 \pm 2.8 \times 10^7$	$5.1 \pm 3.3 \times 10^7$
B	Test1	$1.0 \pm 2.0 \times 10^5$	$7.2 \pm 3.1 \times 10^5$	$6.5 \pm 1.1 \times 10^5$	$3.6 \pm 1.1 \times 10^5$
	Test2	$2.5 \pm 2.4 \times 10^6$	$4.2 \pm 2.2 \times 10^6$	$5.2 \pm 3.2 \times 10^6$	$4.5 \pm 1.4 \times 10^6$
	Control	$8.0 \pm 7.8 \times 10^6$	$4.4 \pm 3.8 \times 10^6$	$5.6 \pm 3.3 \times 10^6$	$4.1 \pm 1.8 \times 10^6$
C	Test1	$2.6 \pm 3.4 \times 10^6$	$5.5 \pm 2.8 \times 10^6$	$6.2 \pm 4.1 \times 10^6$	$3.5 \pm 2.1 \times 10^6$
	Test2	$2.8 \pm 5.4 \times 10^6$	$4.3 \pm 2.3 \times 10^6$	$3.8 \pm 2.1 \times 10^6$	$7.4 \pm 2.1 \times 10^6$
	Control	$2.3 \pm 1.6 \times 10^5$	$5.1 \pm 2.3 \times 10^5$	$3.7 \pm 2.1 \times 10^5$	$3.2 \pm 2.6 \times 10^5$
D	Test1	$1.1 \pm 0.5 \times 10^8$	$7.4 \pm 6.8 \times 10^7$	$5.4 \pm 2.6 \times 10^8$	$8.1 \pm 4.5 \times 10^8$
	Test2	$7.8 \pm 1.3 \times 10^7$	$5.7 \pm 3.6 \times 10^7$	$6.3 \pm 6.8 \times 10^8$	$6.5 \pm 1.4 \times 10^8$
	Control	$8.2 \pm 5.6 \times 10^6$	$4.5 \pm 3.2 \times 10^7$	$6.5 \pm 3.5 \times 10^8$	$3.9 \pm 2.1 \times 10^8$
E	Test1	$2.7 \pm 1.3 \times 10^5$	$5.6 \pm 4.5 \times 10^5$	$7.4 \pm 1.2 \times 10^5$	$5.4 \pm 4.1 \times 10^5$
	Test2	$3.8 \pm 3.4 \times 10^6$	$7.2 \pm 4.2 \times 10^6$	$8.4 \pm 2.5 \times 10^6$	$5.1 \pm 1.4 \times 10^6$
	Control	$1.0 \pm 1.0 \times 10^5$	$6.1 \pm 3.4 \times 10^5$	$2.4 \pm 2.1 \times 10^5$	$2.2 \pm 1.9 \times 10^5$

表 4. 吳郭魚池每次採樣的腸內細菌總數。單位 cfu/g。

養殖 戶	養殖池	使用前	1 個月後	2 個月後	3 個月後
F	Test1	$6.8 \pm 1.3 \times 10^7$	$4.5 \pm 3.6 \times 10^7$	$2.1 \pm 3.3 \times 10^7$	$4.3 \pm 2.1 \times 10^7$
	Test2	$7.6 \pm 1.4 \times 10^7$	$9.3 \pm 5.1 \times 10^7$	$3.1 \pm 5.5 \times 10^7$	$7.1 \pm 4.4 \times 10^7$
	Control	$4.2 \pm 1.6 \times 10^7$	$3.6 \pm 5.4 \times 10^7$	$4.3 \pm 4.8 \times 10^7$	$6.9 \pm 5.6 \times 10^7$
G	Test1	$4.8 \pm 1.8 \times 10^7$	$3.5 \pm 3.2 \times 10^7$	$6.1 \pm 3.1 \times 10^7$	$4.4 \pm 2.2 \times 10^7$
	Test2	$3.4 \pm 1.8 \times 10^7$	$3.3 \pm 2.1 \times 10^7$	$5.2 \pm 1.2 \times 10^7$	$4.1 \pm 3.1 \times 10^7$
	Control	$5.6 \pm 2.4 \times 10^7$	$5.5 \pm 1.6 \times 10^7$	$4.8 \pm 2.2 \times 10^7$	$7.2 \pm 1.9 \times 10^7$
H	Test1	$3.1 \pm 1.6 \times 10^7$	$5.6 \pm 3.4 \times 10^7$	$4.6 \pm 6.4 \times 10^7$	$6.7 \pm 2.5 \times 10^7$
	Test2	$6.6 \pm 2.6 \times 10^7$	$8.7 \pm 4.1 \times 10^7$	$6.7 \pm 3.3 \times 10^7$	$7.6 \pm 5.3 \times 10^7$
	Control	$5.2 \pm 2.3 \times 10^7$	$6.2 \pm 3.5 \times 10^7$	$5.9 \pm 2.5 \times 10^7$	$7.4 \pm 4.4 \times 10^7$

附錄 (圖)

Fig. 1 *Rhodobacter sphaeroides* 以 TSB 為培養基之生長情形



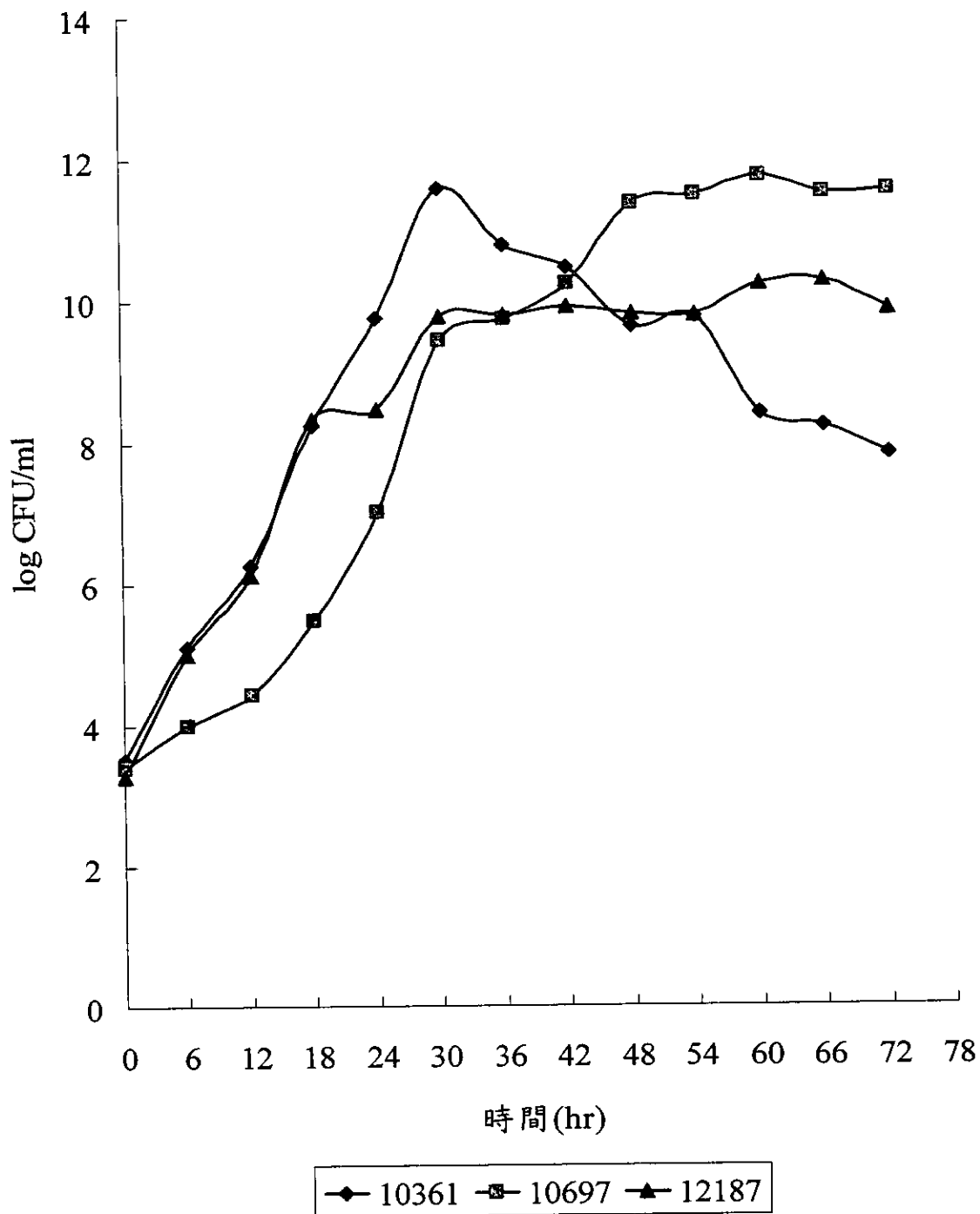


Fig. 2 相同接種濃度下三株益生菌於 MRS broth 的生長曲線。10361、10697、12187 為乳酸菌 BCRC 菌株號碼。

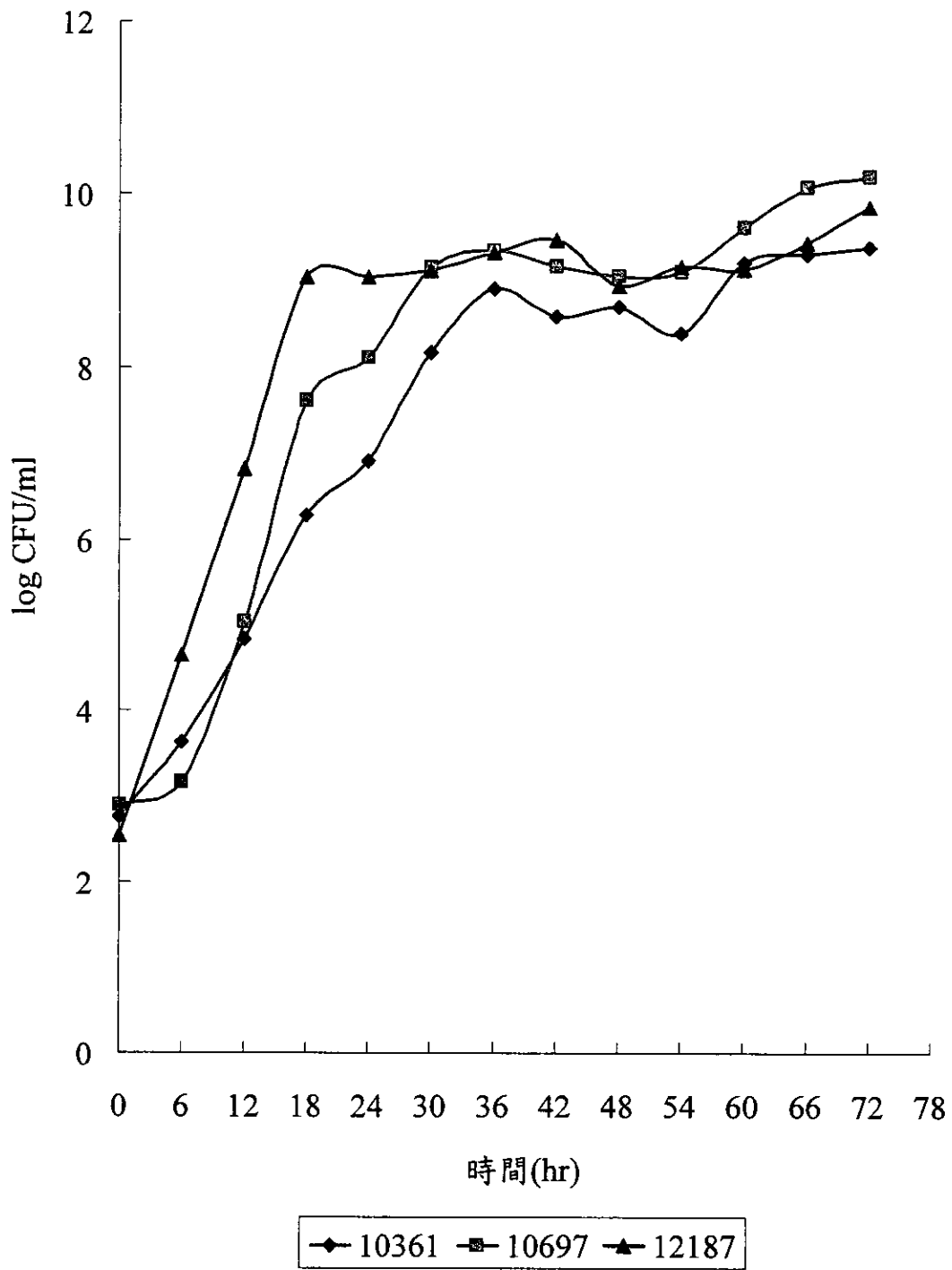


Fig. 3. 相同接種濃度下三株益生菌於 TSB 的生長曲線。10361、10697、12187 為乳酸菌 BCRC 菌株號碼。

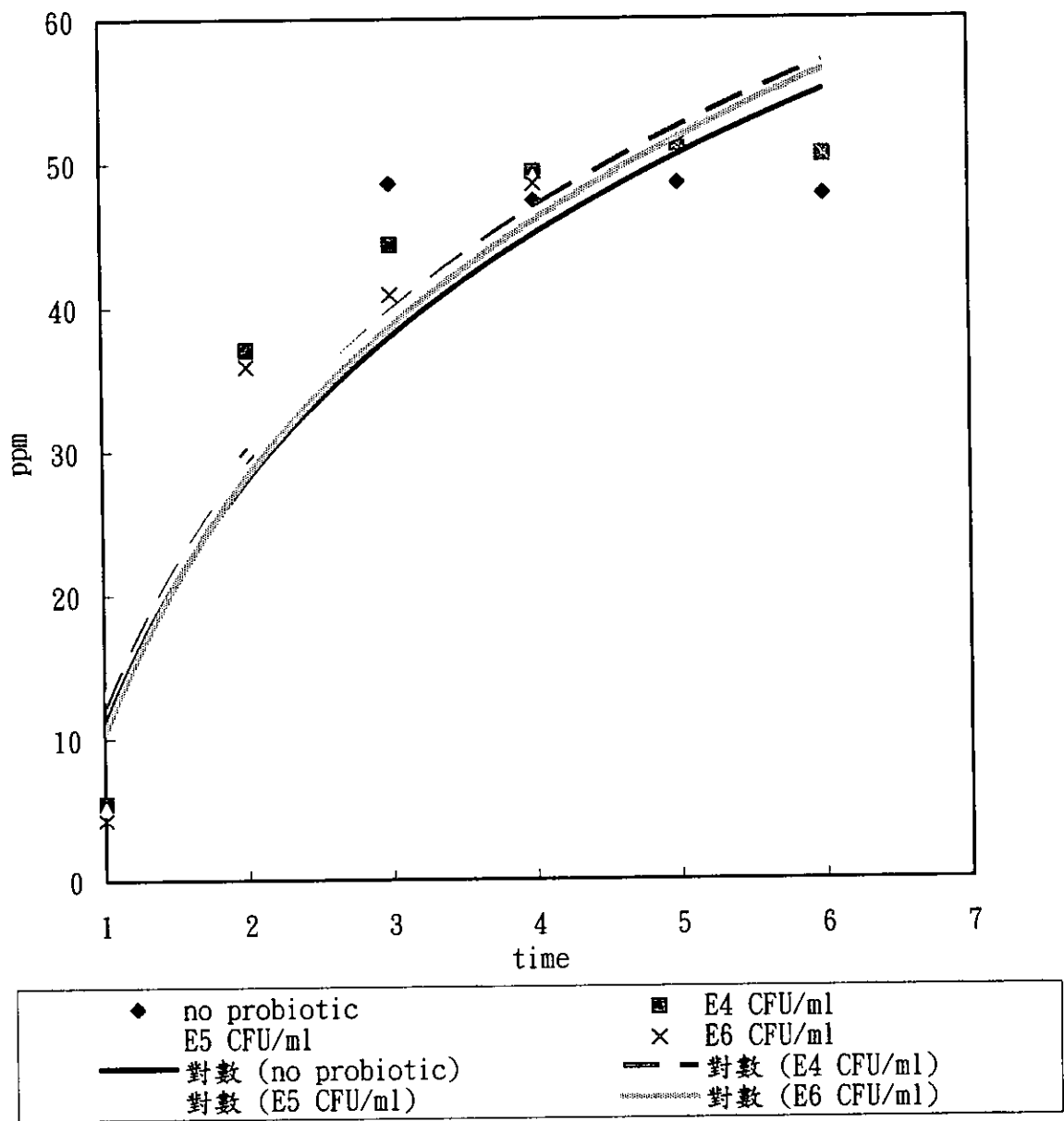


Fig. 4 模擬表層水體中添加 *Rhodobacter sphaeroides* 後，氨-氮的變化趨勢圖。

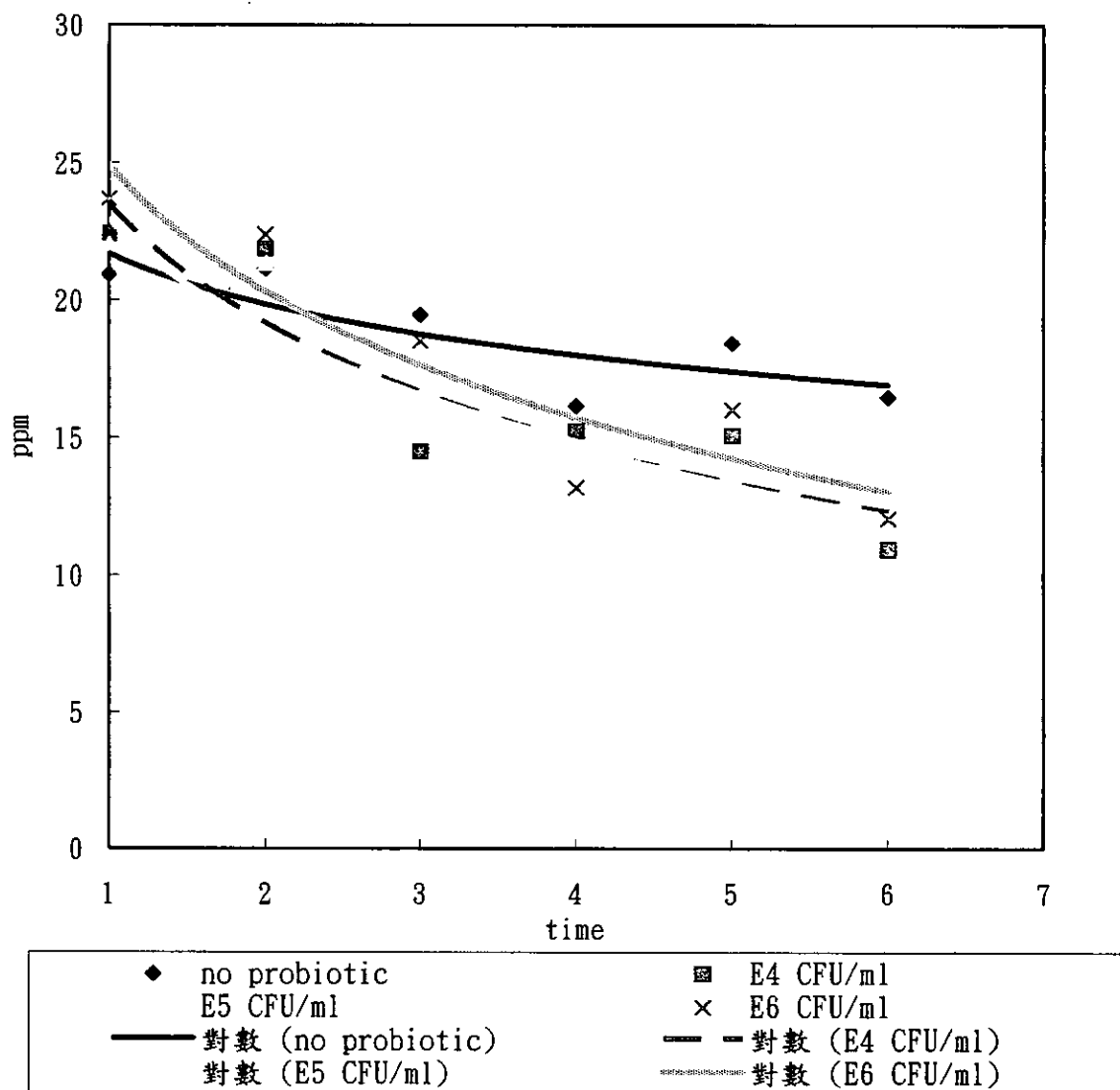


Fig. 5 模擬底層水體中添加 *Rhodobacter sphaeroides* 後，氨-氮的變化量。

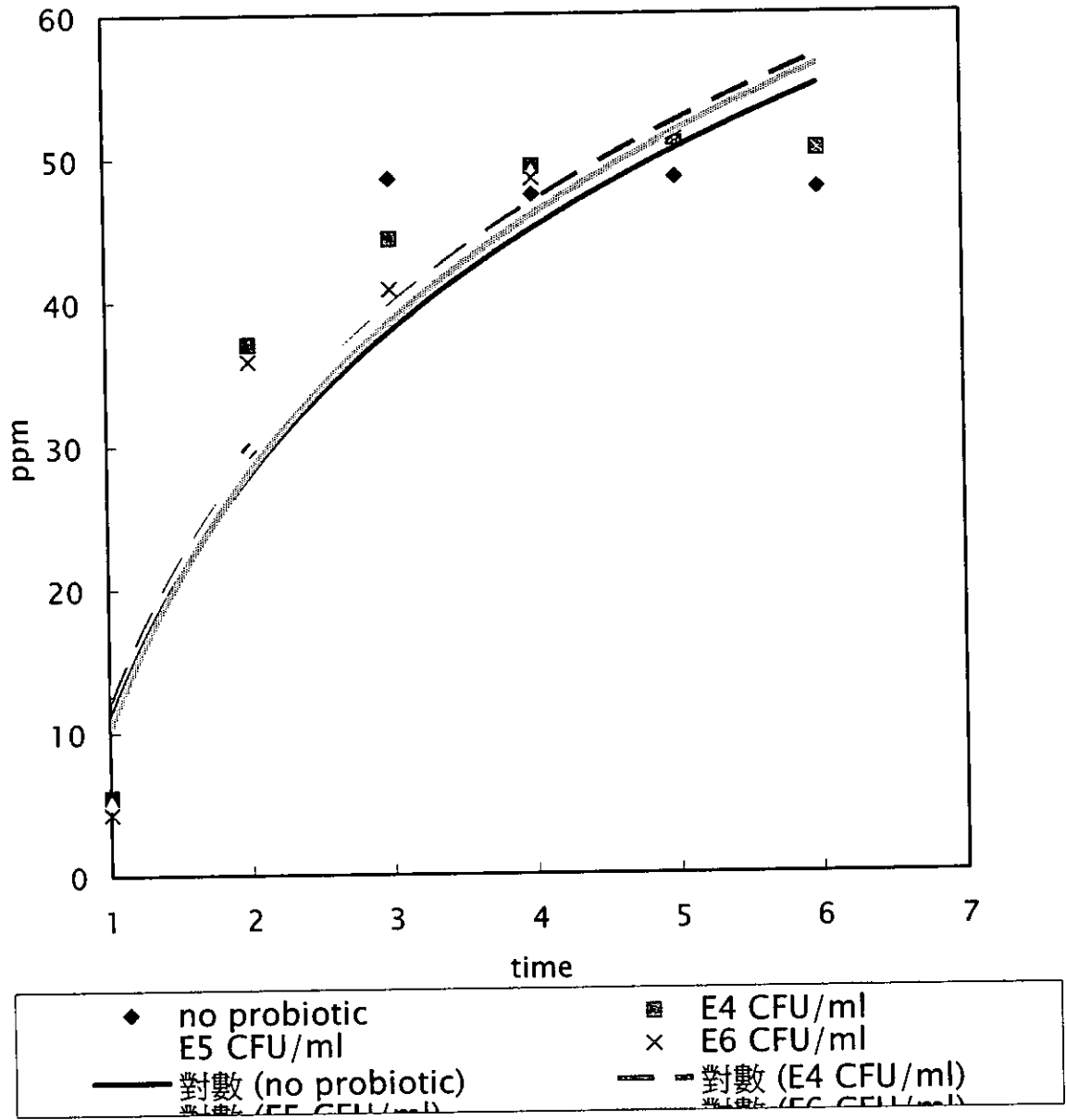


Fig. 6 模擬表層水體中添加 *Rhodobacter sphaeroides* 後，亞硝酸-氮的變化量。

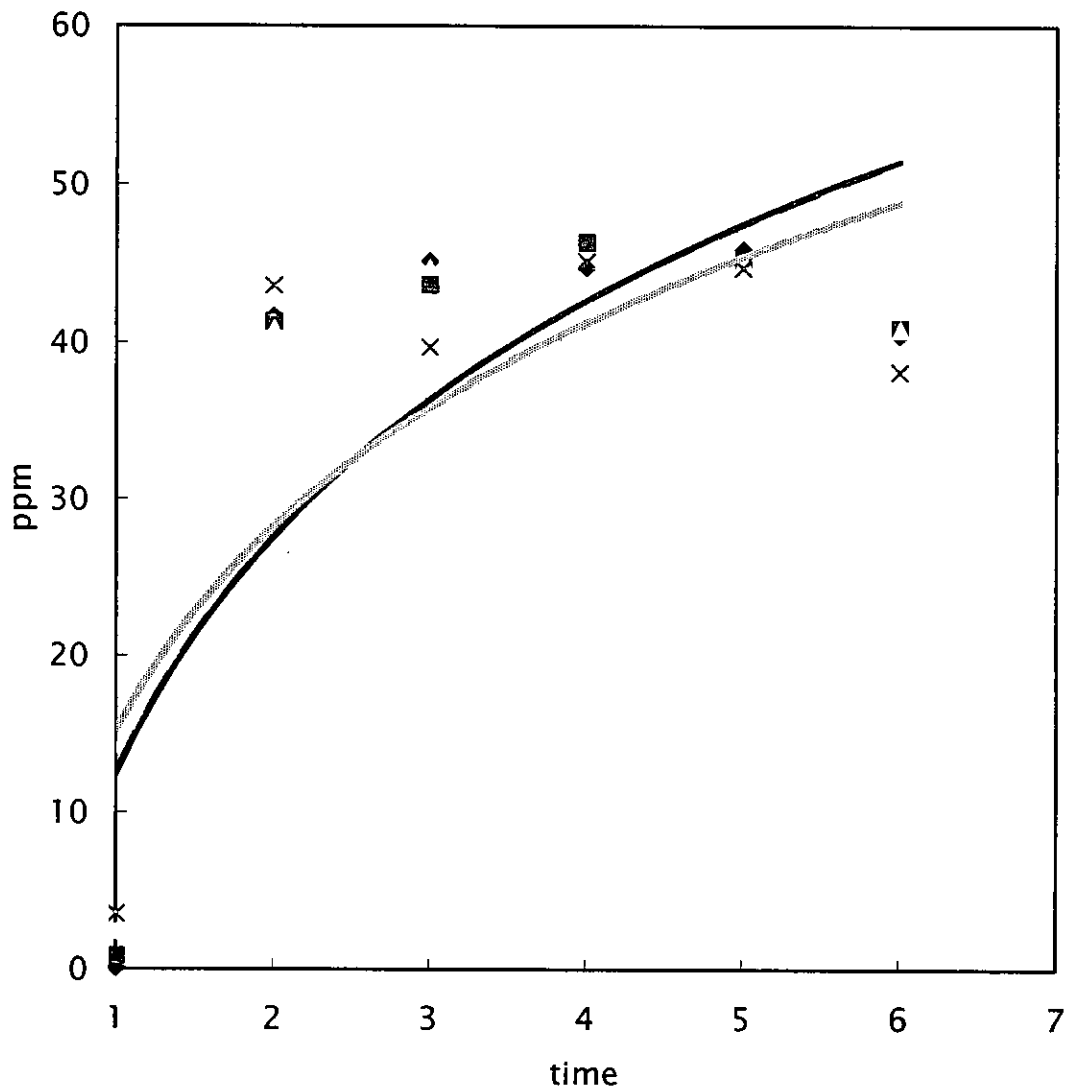


Fig. 7 模擬底層水體中添加 *Rhodobacter sphaeroides* 後，亞硝酸-氮的變化量。

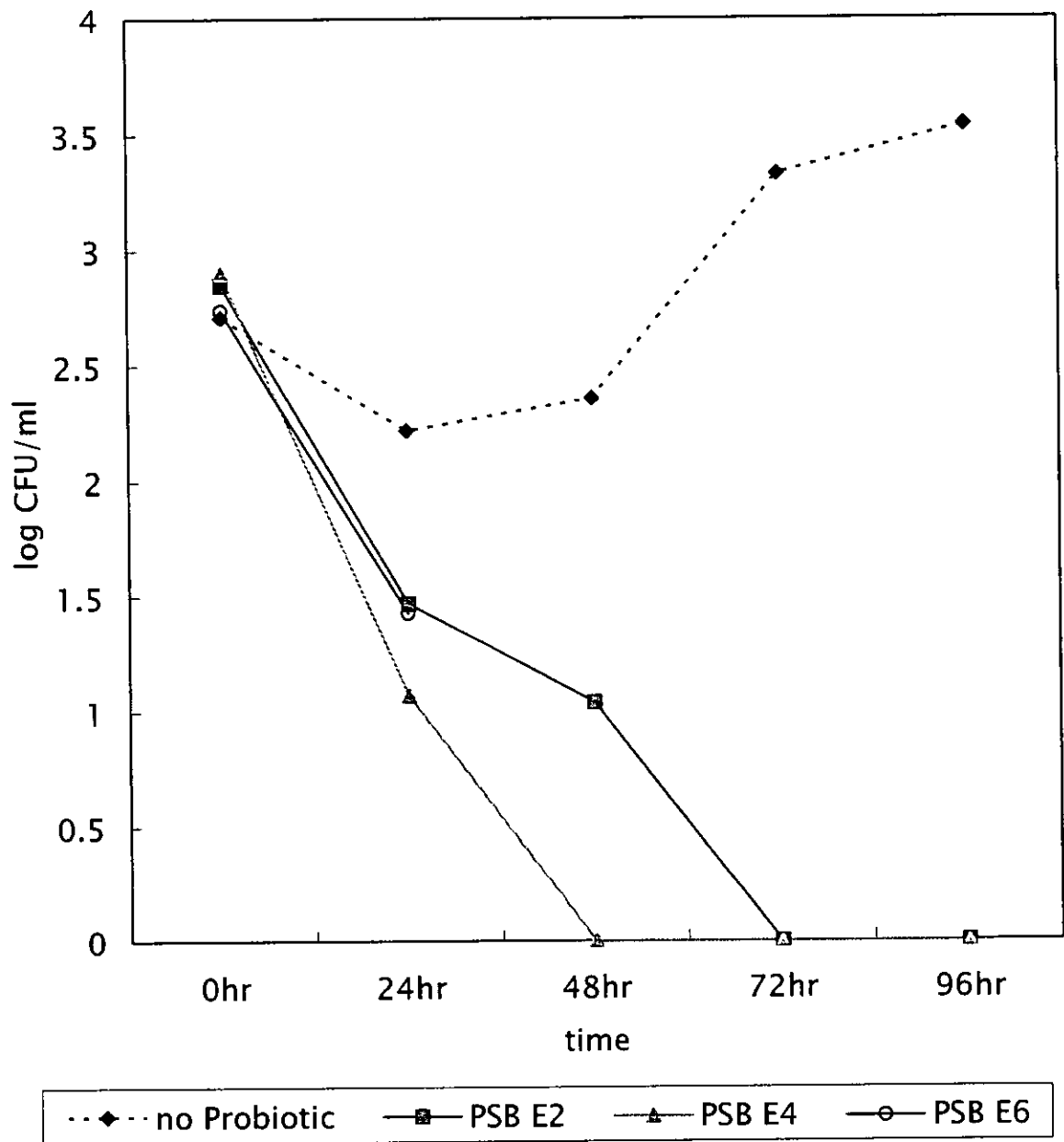


Fig. 8 添加不同濃度 PSB 菌液對抑制 *Vibrio alginolyticus* 生長之影響

* E2 總益生菌數為 10^2 CFU/ml
 E4 總益生菌數為 10^4 CFU/ml
 E6 總益生菌數為 10^6 CFU/ml

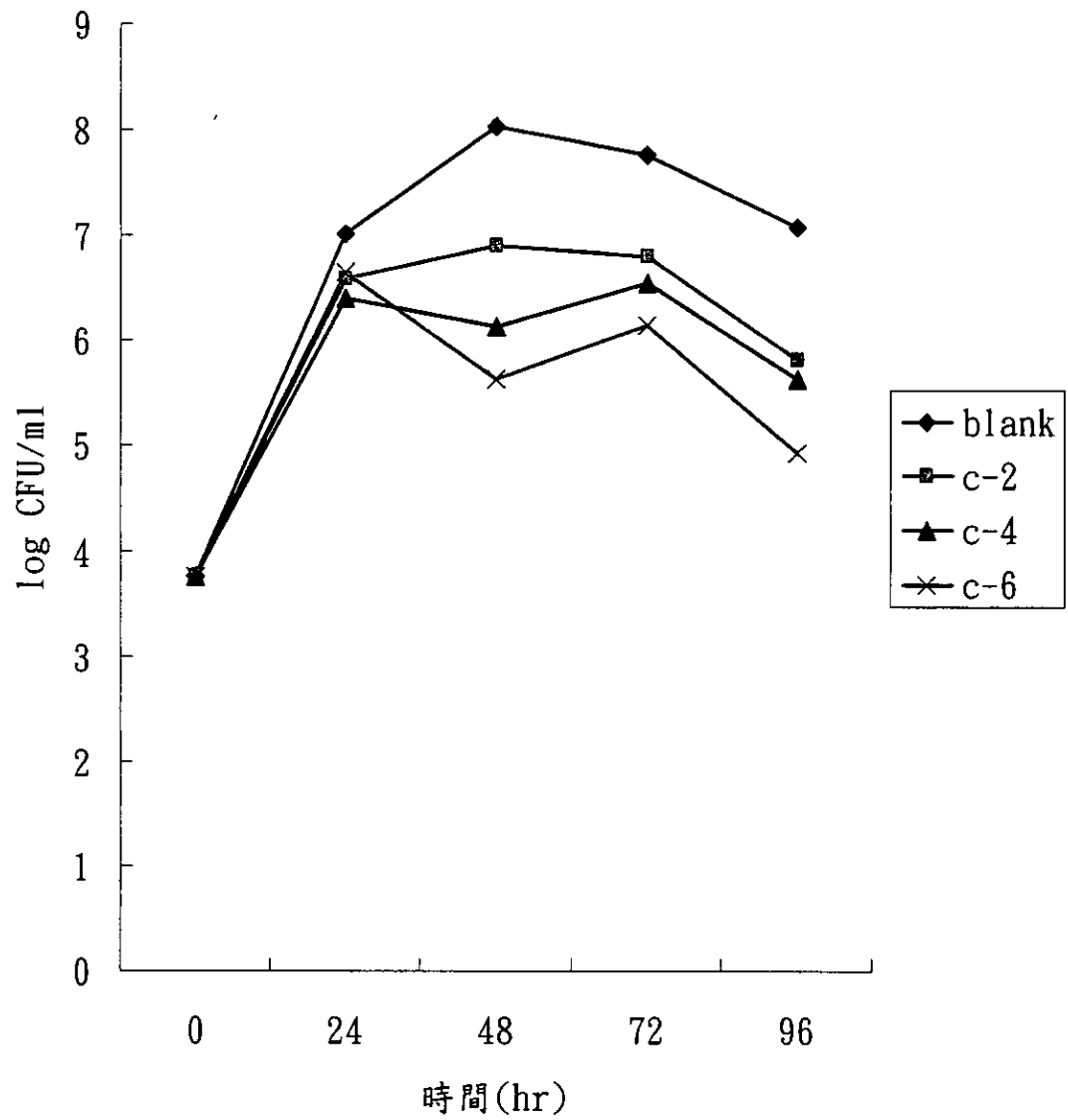


Fig. 9. 添加不同濃度的 *Lactobacillus casei* (BCRC 10697) 對 *Vibrio alginolyticus* 生長之影響。blank 代表 control；c-2 代表 102 CFU/ml；c-4 代表 104 CFU/ml；c-6 代表 106 CFU/ml。

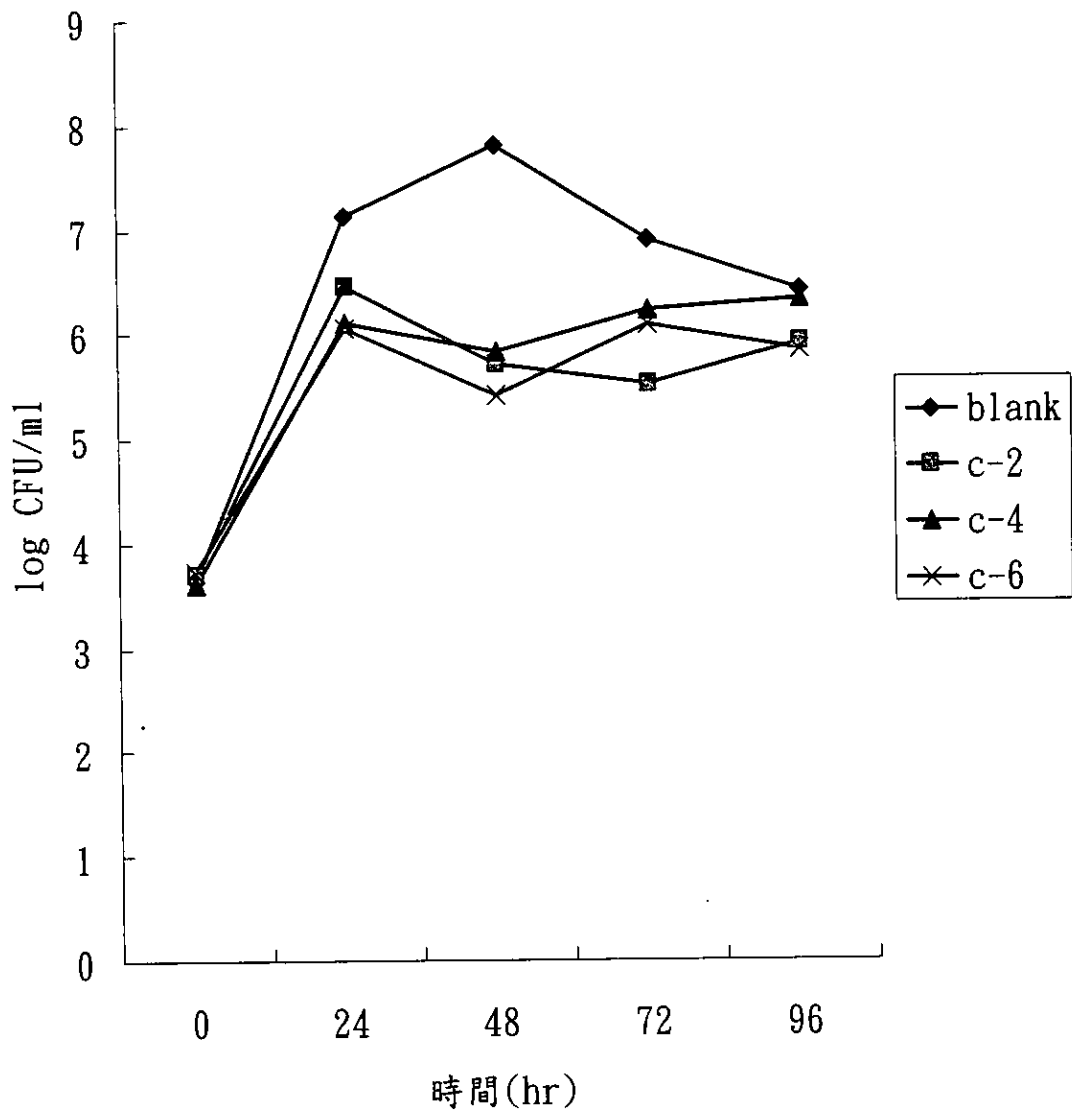


Fig.10. 添加不同濃度的 *Lactobacillus brevis* (BCRC 10361) 對 *Vibrio alginolyticus* 生長之影響。blank 代表 control；c-2 代表 102 CFU/ml；c-4 代表 104 CFU/ml；c-6 代表 106 CFU/ml。

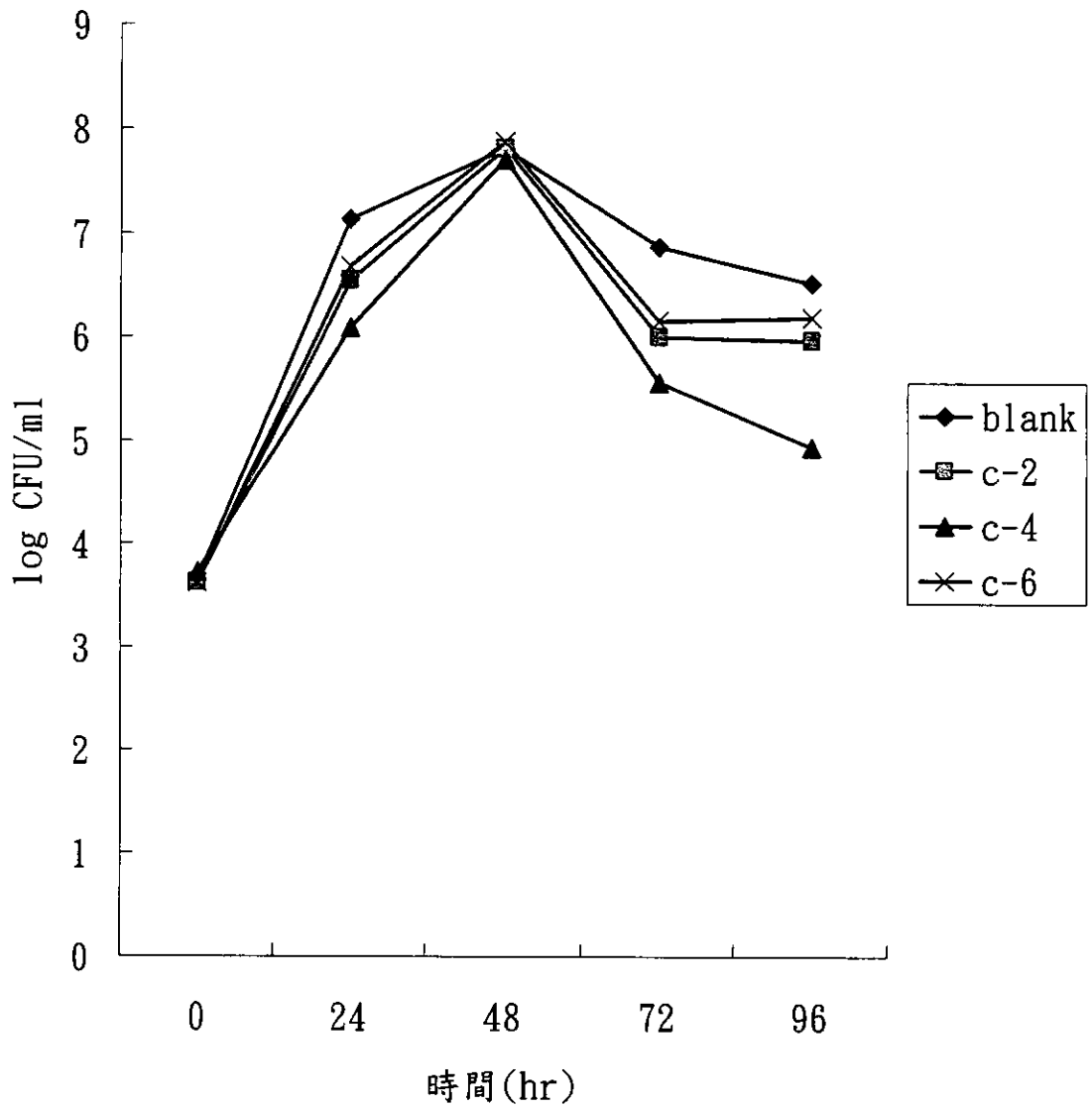


Fig. 11. 添加不同濃度的 *Lactobacillus brevis* (BCRC 12187) 對 *Vibrio alginolyticus* 生長之影響。blank 代表 control；c-2 代表 102 CFU/ml；c-4 代表 104 CFU/ml；c-6 代表 106 CFU/ml。