次世代益菌微生物體在農業之應用

黃姿碧[1,5]、陳郁璇[1]、黃文的[2]、林傳順[3]、高千雅[4]、呂仲倫[4]、楊尚書[5]、鍾文鑫[1]、黃振文[1]

1. 國立中興大學植物病理學系。台中市南區。臺灣。
2. 財團法人農業科技研究院植物科技研究所。新竹市香山區。臺灣。
3. 財團法人農業科技研究院動物科技研究所。新竹市香山區。臺灣。
4. 財團法人農業科技研究院水產科技研究所。新竹市香山區。臺灣。
5. 國立中興大學農業暨自然資源學院農藥殘留檢測中心。台中市南區。臺灣。

摘　　要

益生菌泛指具有維持及促進腸道微生物相平衡之活體微生物，在人體、畜禽及水產動物之研究中，已知其具有促進宿主腸道健康、抑制病原菌生長、強化免疫系統、提升營養利用效率等多重功能。而益生菌也因其具有促進植物營養吸收及利用、提升作物生長與產量及保護植物對抗病蟲害侵染之作用，因此常被開發作為生物肥、生物刺激素或生物農藥等植醫保健應用。另益生菌因較化學藥劑及抗生素等對人畜動物及環境安全，又兼具多重功能，亦為降低抗藥性發生、無抗畜禽水產養殖之重要替代策略。本團隊以跨領域合作方式共同研發可同時應用於安全農業、循環農業、畜禽產、水產養殖的多功能益菌微生物體農業生技產品，本講題中將以 *Bacillus subtilis* 151B 製劑產品為例進行說明。本團隊研究中證實 *B. subtilis* 151B1 菌株具促進多種植物生長、提升產量與品質效果，並具多種分解酵素能力、溶磷活性與產生植物生長促進賀爾蒙吲哚乙酸之功能，可作溶磷微生物肥料應用；亦具防治植物細菌及真菌性病害功效，可作為微生物農藥應用；另具可降解殺蟲劑馬拉松及第滅寧與殺菌劑三賽唑之效用。151B1 菌株亦具提升仔豬及肉豬飼養效率、減少糞便氣味中硫化氫及琉醇含量，降低糞便臭味，改善飼養場域整體環境、降低豬隻腸道內下痢潛在病原因子大腸桿菌菌數等多重畜產飼養動物應用功效。亦能增進魚隻的飽滿度，提高取肉率，提升飼料效率，並能有效抑制腸道病原菌，降低魚病發生，及改善養殖水質，降低養殖水體中有機物量，調整養殖水體中藻類餌料的生物相及改變魚隻腸道菌相等多重水產養殖應用功效。且藉由次世代序列分析結果亦證實，*B. subtilis* 151B1 液劑於作物施用後，並不會影響根圈土壤中物種之豐富度及多樣性，而會改變所存在物種之組成，降低根圈

Fusarium spp.及 *Penicillium* spp.等病原菌叢，增加芽孢桿菌科及乳酸菌科細菌及 *Trichoderma* spp.族群量；而作為水產飼料添加物，可有效抑制魚腸道潰瘍性結腸炎及弧菌目等病原，增加乳酸菌目益生菌菌叢，並豐富養殖水體中藻類餌料的生物相。綜合上述結果顯示，本團隊所開發益菌微生物產品具多功能及具優異農業、畜產及水產等多場域應用潛力，可加值產品價值與競爭力、提升農業產值，降低化學農藥與抗生素之使用，確保民眾食品安全及環境永續的目標。

關鍵詞：水產添加物、生物農藥、生物肥料、飼料添加劑、次世代定序、益生菌、微生物體

緒　　言

次世代定序 (Next Generation sequencing, NGS) 為近年來用於瞭解無法以人工培養之微生物及探索在人體、動物體及植物體及其相關環境的微生物群相、組成及分布全貌及其相關聯性之新興研究技術，藉由各國相繼投入大型人體微生物體研究 (Human Microbiome Project)，也更證實人體中腸道微生物菌叢是影響人體健康之關鍵因子。而應用此技術瞭解植物與植物的環境相關的微生物體之研究，相較其他動物領域則剛於萌芽階段。本主題將以本團隊所開發之益生性微生物 *Bacillus subtilis* 151B1 製劑產品為例，探討說明益生性微生物在植物病害醫治及保健、農藥降解、畜牧飼養及水產養殖之應用潛力及效能。並藉由次世代定序技術之應用，瞭解於作物栽培管理系統與水產養殖系統中導入 *B. subtilis* 151B1 製劑對作物根圈、養殖魚類腸道及水產養殖水域中微生物及藻類菌叢與組成分布之影響。由本跨領團隊研發成果顯示單一微生物菌種開發之產品，可於農產、畜產、漁產、安全農業等多場域應用，而達到加值產品價值與競爭力、提升農業產值，降低化學農藥與抗生素之使用，與確保民眾食安及環境永續的目標。

次世代定序與微生物體

近年來由於次世代定序技術之開發，讓研究人員們得以探索一環境中存在微生物族群之全貌。而存在於一特定環境下，涵蓋人體、動物體及植物體及其相關

環境的微生物及微生物基因體又稱為微生物體 (microbiome)[22,33]。應用次世代定序技術之研究已證實90%人體疾病與人體腸道的微生物體密切相關，目前已知腸道之微生物體可影響消化、吸收、代謝和免疫等生理功能、代謝疾病，如: 肥胖、第二型糖尿病、脂肪肝等、消化系統疾病、過敏與自體免疫疾病、癌症、神經退化性疾病、巴金森氏症、憂鬱症與心血管疾病等，而導入正確核心-微生物體菌種，將有助腸道重建健康並緩解疾病症狀[16]。近年來糞微菌叢植入 (Fecal Microbiota Transplant, FMT) 於臨床疾病治療應用備受矚目，此醫療方式主要著眼於將來自健康人體糞微菌叢植入患者，使患者腸道菌相恢復平衡，而達到治療發炎性大腸疾病、大腸激躁症、代謝性疾病等之效果，因此微生物體相關研究亦被認為是「精準醫學」中重要的一環[10,31]。有鑑於植物與植物的環境相關的微生物菌叢，又可稱之為植物微生物體 (plant microbiome, phytobiome)，對土壤、植物和農業生態環境健康之重要性，2012年起美國植物病理學會便積極推動植物微生物體之概念及相關研究，並於2016年完成「植物微生物體研究及轉譯短之短中長程規劃 (Phytobiomes: a roadmap for research and translation)」。於2019年更於Phytobiomes期刊發表「Phytobiomes研究之挑戰與機會、現在與未來白皮書」，探討如何將Phytobiomes研究轉化實際應用於田間強化作物生態系的健康和提升生產力[4]。在植物微生物體研究上，學者們藉由探究分析種植植物土壤 (bulk soil)、植物根圈 (rhizosphere)、葉表 (phyllosphere) 及植物體內部 (endosphere) 之微生物群相及其功能，並試圖從中尋找有益植物體生長及提升其適存性之核心菌叢 (core microbiome) 並開發應用[5]。目前亦已有成功利用人工導入篩選之特定微生物菌叢，並證實可促使動植物健康、提升產量及具對抗生物與非生物逆境之效益[13,23,25]。

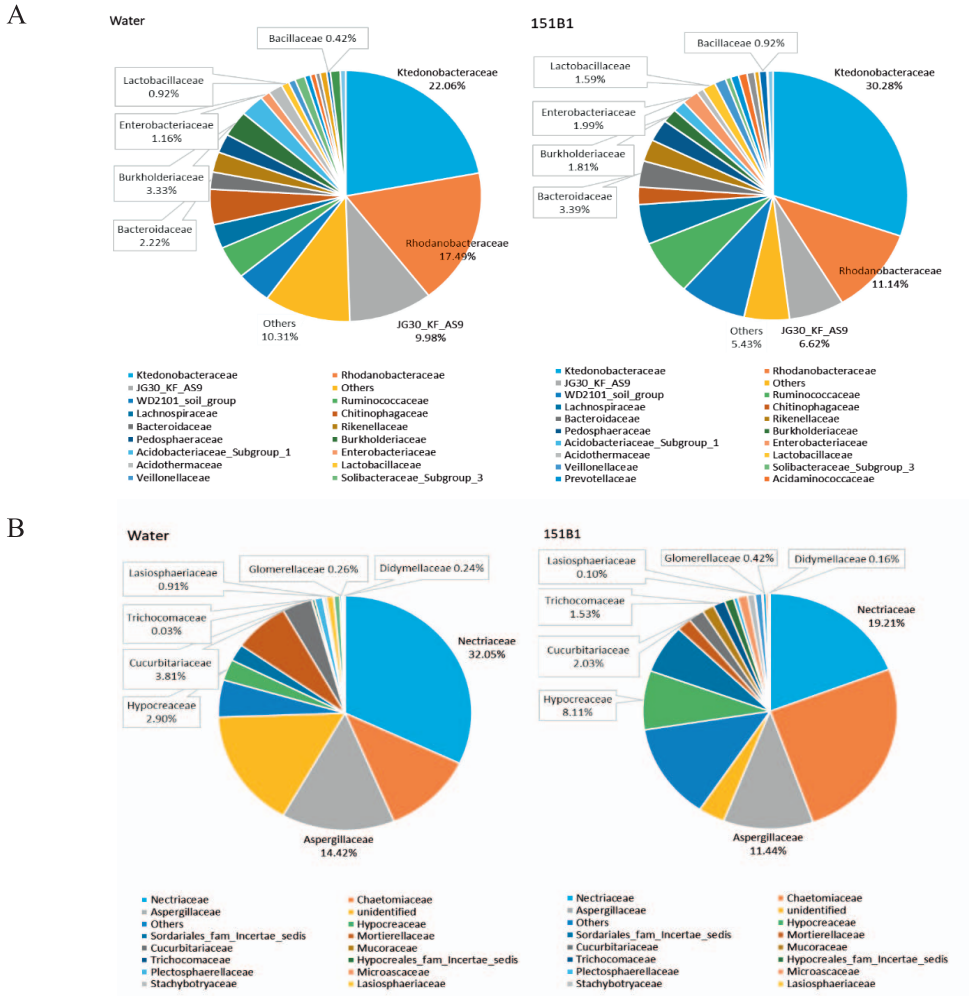
益生菌於植醫保健之應用

益生菌 (probiotics) 這名詞最早由Fuller (1989) 提出，泛指具有維持及促進腸道微生物相平衡之活體微生物[7]，而後即成為被熱門研究、探討及開發為促進健康之功能性食品與藥品，其中最為被大眾熟知之益生菌為乳酸桿菌、雙岐桿菌、比菲德氏菌、納豆菌、酵母菌等，已知其具有促進人體腸道健康、抑制病原菌生長、強化免疫系統、提升營養利用率、減緩乳糖不耐症狀、降低過敏發生與罹癌風險等功能[1,28]。而*Bacillus*菌屬因產生可對抗環境逆境之內生孢子，又具產生環脂胜肽 (cyclic lipopeptides) 類二次代謝產物、抗生物質、酵素、及維生素等能力，亦

具有促進動、植物生長、免疫及防禦反應之功能，因此常被作為植物病蟲害生物防治菌種、種子保護劑或動物用益生菌，亦可應用於酵素、蛋白之工業生產[24,27]。本主講者研究室由臺灣南投民間茶樹根圈分離一*Bacillus subtilis* 151B1菌株，經研究證實具促進多種植物，如:草莓、番茄、白菜、小黃瓜、茶樹及百香果等作物生長及提升產量與品質效果，並具多種分解酵素能力、溶磷活性與產生植物生長促進賀爾蒙-吲哚乙酸等植物生長促進特徵指標[12,19,20]，因此可作為生物肥料應用。另*B. subtilis* 151B1菌株具拮抗多種細菌、真菌及卵菌病原之能力，且可抑制植物細菌性病害，如:番茄青枯病及真菌性病害，如百香果炭疽病、萎凋病等[12,19,20]，可作為植物病害防治之生物農藥應用。且將*B. subtilis* 151B1菌株搭配由黃振文教授利用蔗渣、稻殼、牡蠣殼等農業副產物所研發可有效防治西瓜蔓割病、蘿蔔黃葉病 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*)、豌豆萎凋病 (*F. oxysporum* f.sp. *pisi*)、十字花科根瘤病及胡瓜猝倒病的發生之S-H土壤添加物[30]，試驗結果顯示151B1菌株搭配S-H土壤添加物，可加成S-H土壤添加物促進胡瓜生長及降低萎凋病害之作用。

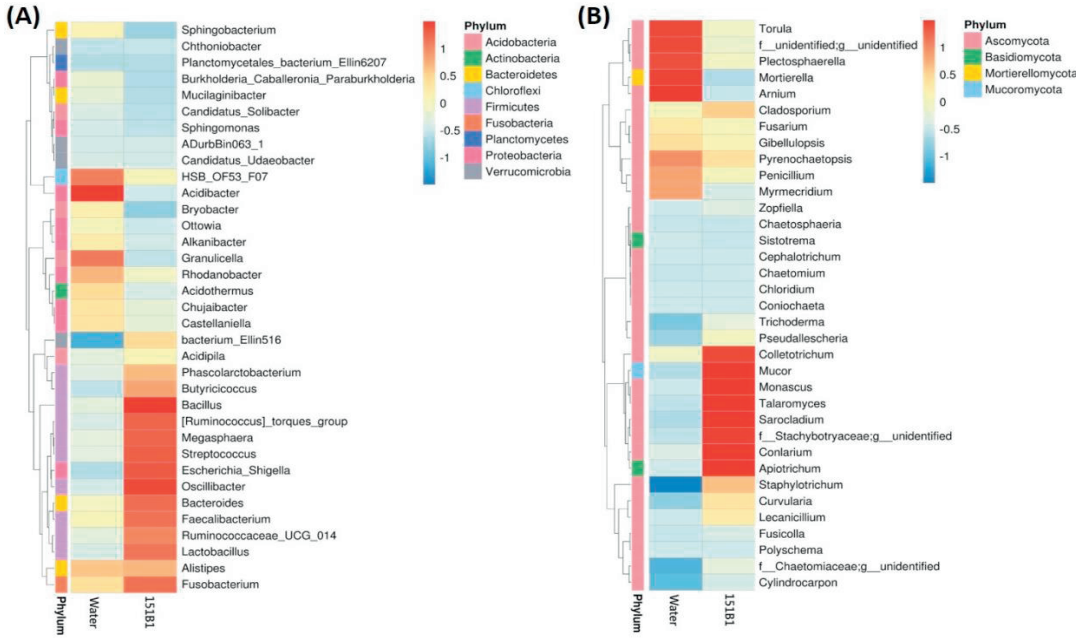
探究*B. subtilis* 151B1具病害防治功效之潛在作用機制顯示，*B. subtilis* 151B1可抑制病原菌之發芽，造成發芽管畸形膨大，並影響病原菌呼吸作用及能量代謝，與誘發病原菌細胞凋亡作用[19]。且由研究中亦證實*B. subtilis* 151B1具有誘導胡瓜幼苗之*PAL*、*POX*及*PR1a*等植物防禦反應相關基因表現之作用 (黃等人，未發表資料)。將*B. subtilis* 151B1液劑每週施用於慣行農法栽培之百香果植株，經施用7個月後，利用次世代定序技術分析百香果根圈土壤微生物體，由Operational Taxonomic Units (OUTs) 之物種分類分析結果顯示*B. subtilis* 151B1之施用，並不會影響根圈土壤中物種之豐富度及多樣性，而主要會改變所存在物種之組成 (圖一、圖二)。由根圈土壤中所存在物種分布相對豐度為前20名之細菌科別分析結果可見，施用*B. subtilis* 151B1相較於水之對照處理可增加根圈土壤中芽孢桿菌科 (Bacillaceae) 及乳酸菌科 (Lactobacillaceae) 細菌豐度，而降低常見致病菌種之黃單孢菌目 (Xanthomonadales) 包括在根圈土壤中所佔比例較高之Rhodanobacteraceae及伯克氏菌目 (Burkholderiales) 之伯克氏菌科 (Burkholderiaceae) 等細菌族群量 (圖一、A)。由占比前35名之物種豐度聚類熱圖中亦可見，於百香果栽培管理系統中導入*B. subtilis* 151B1，較水之對照處理在細菌物種組成豐度上有顯著差異，其中導入*B. subtilis* 151B1可見顯著增加根圈土壤中*Bacillus* spp.及*Lactobacillus* spp.等厚壁菌門 (Fimicutes) 細菌之豐度 (圖二、A)。而在物種分布相對豐度為前20名之真菌科別分析結果可見，施用*B. subtilis* 151B1相較於水之對照處理可顯著降低根圈土

壤中叢赤殼科 (Nectriaceae) 如 *Fusarium* spp.，與麴黴科 (Aspergillaceae) 如 *Penicillium* spp. 等真菌族群量，而可提升*Trichoderma* spp. 族群量 (圖一、B；黃等人，未發表資料)。另由占比前35名之物種豐度聚類熱圖中亦可驗證，於百香果栽培管理系統中導入*B. subtilis* 151B1，較水之對照處理真菌物種組成豐度上有顯著差異，且亦見導入*B. subtilis* 151B1後，可降低根圈土壤中*Fusarium* spp.及*Penicillium* spp. 等真菌族群量，而增加*Trichoderma* spp.族群量 (圖二、B)。



圖一、百香果植株根圈微生物體相對豐度為前 20 名微生物科之相對比例分析 (黃等人，未發表資料)。

Fig. 1. The relative abundance of top 20 microbial families in the rhizosphere microbiome of passion fruit plants. (A) Bacterial communities; (B) fungal communities. The rhizosphere microbiome samples were from the rhizosphere soil of passion fruit plants with the treatment of *Bacillus subtilis* 151B1 liquid formulation at 100-fold dilution once per week for 28 weeks. The treatment with water was used as a control.



圖二、百香果植株是否施用 *Bacillus subtilis* 151B1 微生物製劑對根圈微生物體之相對豐度為前 35 名之微生物科別熱圖分析 (黃等人，未發表資料)。

Fig. 2. Relative abundance of the top 35 taxa in the rhizophere microbiome of passion fruit plants between the treatment with water and with *Bacillus subtilis* 151B1 liquid formulation by heatmap analysis. (A) Heatmap of top 35 bacterial families; (B) Heatmap of top 35 fungal families. The rhizosphere microbiome samples were from the rhizophere soil of passion fruit plants with the treatment of *Bacillus subtilis* 151B1 liquid formulation at 100-fold dilution once per week for 28 weeks. The treatment with water was used as a control.

益生菌於農藥降解之應用

國內農業廢棄物種類繁多，除稻桿、玉米桿、花生殼、大豆藤等，亦有蔬果廢棄物、菇類栽培介質、禽畜養殖廢棄物等，相關廢棄物大多以堆肥方式進行再循環利用，以蔬果廢棄物為例，每年生產超過 20 萬公噸，因水分含量高掩埋佔空間且有滲漏汙染水源問題，而以焚化處理因水分導致熱值不高徒增處理費用，因此此類廢棄物多直接翻犁入田、作為家禽飼料，亦或再開發利作為堆肥，然此些廢棄物之來源以慣行農法栽種者居多，廢棄果葉包含多種農藥，且廢棄物多為植株外層，如:甘藍之外葉，農藥種類及濃度相對較多且高，以本研究檢測資料顯示，由廚餘蔬果堆肥中仍可檢出普拔克、貝芬替等農藥，而市售有機質堆肥中亦可檢

出微量菲克利、三賽唑、亞賜圃及益達胺等藥劑殘留，此類堆肥若繼續使用可能對土壤及環境造成二次污染，甚而衍生食品安全問題。而微生物除可用於病害防治外，另特定微生物菌種亦有文獻顯示可分解環境中殘留農藥，如 Maloney *et al.* 發現 *Bacillus cereus* 可分解百滅寧等第二代及第三代除蟲菊[21]，假單孢菌可分解賽滅寧等合成除蟲菊[9]，Bacillus 等 6 種細菌及 4 種真菌可分解得克利、滅達樂及復祿芬等農藥[6]。由文獻顯示，可分解農藥微生物種類繁多，包括枯草桿菌屬、假單孢桿菌屬等多種菌株，當中菌種不乏為生物肥料、生物農藥常用菌種，有關微生物於農業上使用，目前也大多針對肥料、病害防治等方向研發，國內廠商顯少針對具農藥降解功效微生物進行開發研究，以目前全世界對食品安全意識提升，農藥分解、吸收、消除等相關產品極具開發及商業潛力。綜合上述，利用微生物進行農業廢棄物再生利用為世界趨勢，然國內針對再生循環資材中農藥之衰退尚無相關有效解決產品，本團隊研究中即發現前述開發可作為生物農藥、生物肥料應用之 *B. subtilis* 151B1 菌株，具有降解殺蟲劑馬拉松 (malathion) 及第滅寧 (deltamethrin) 與殺菌劑三賽唑 (tricyclazole) 之效果 (黃等人，未發表資料)。

益生菌於畜牧飼養之應用

抗生素於畜禽養殖之應用，起源於1940年代之研究發現以益生菌*Streptomyces aureofaciens*餵食動物，可促進動物之生長，繼而發現使動物增長之因素主要來自菌株所產生之抗生素chlortetracycline[3]。然而因長期使用生素導致抗藥性病原崛起，另因公衛與畜禽產品食用安全之考量及產業需求，各國亦逐步修訂飼料添加物使用規範，其中歐盟於2006年起停用含藥物飼料添加物，美國於2017年起逐漸降低使用品項與數量，而臺灣至2014年已經停用超過34種以上含藥物飼料添加物。在需依循飼料添加物使用規範又需兼顧維繫家畜禽產能下，研發其他替代預防性藥物的功能性飼料添加物有其必要性。而來自然界生物性之益生菌之應用後續也備受畜禽及水產領域重視[1,32]。微生物類飼料添加物除了可以調節及建立家畜禽腸道微生物生態平衡外，亦可提升動物免疫力及促進生長[8,15,18,29]。其中芽孢桿菌屬益生菌，如: *B. subtilis* 、*B. amyloliquefaciens*、*B. velezensis* 、*B. clausii* 、*B. coagulans* 及*B. licheniformis*等為通過歐洲食品安全局安全性評估，而表列為符合安全資格 (qualified presumption of safety, QPS) 之微生物飼料添加物菌種[26,11]。而臺灣行政院農業委員會107年8月2日所公告之可供家畜、家禽、水產動物之飼料添加物參考

物質中芽孢桿菌屬則有*B. subtilis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. coagulans*、*B. licheniformis*、*B. pumilus*、*B. badius*及*B. cereus*。本團隊所開發*B. subtilis* 151B1飼料添加物，經研究證實可提升仔豬及肉豬飼養之飼料效率，提高肉豬屠體重量、肉量及品質，提升離乳仔豬免疫能力；減少豬隻糞便氣味中硫化氫及琉醇含量，降低糞便臭味，改善飼養場域整體環境；減少豬隻腸道內下痢潛在病原因子大腸桿菌菌數；縮短肉豬上市時間等多重畜產飼養動物應用功效 (林等人，未發表資料)。

益生菌於水產養殖之應用

隨著大眾對水產品食安之重視及維繫環境永續發展之考量，無抗水產養殖亦漸成為國際發展趨勢，其中益生菌在水產養殖之應用，除可提升飼料利用效率、促進養殖水產之生長、提升水產耐環境逆境、增強免疫力及對病原具抗性之作用，另亦有改善養殖池水質等多重水產養殖功效，因此益生菌為最多被研究及開發之抗生素及藥物替代方案[2;34]。益生菌可分泌抗細菌素、酵素 (溶菌酶與蛋白酶) 或與環境共同作用產生過氧化氫或有機酸等達到抗菌效果，可抑制病原菌，控制水產動物疾病的發生，且對於在宿主腸道的病原性細菌，亦會有抑制致病菌的擴散之能力。益菌微生物本身亦可作為食物的來源，例如蝦類養殖的過程中，添加微藻與益生菌產物可促進養殖蝦之成長[14]。此外，亦有研究證實益生菌之使用有助於養殖生物對抗疾病入侵，改善腸道菌相平衡，並可透過腸道皮膜細胞、細胞激素的刺激生成與傳遞，再誘發啟動養殖生物之免疫系統，清除外來病原並抑制水產致病原的感染與擴散[34]。其中芽孢桿菌屬細菌因具產生內生孢子，可耐環境逆境，於應用場域有較優異之適存性且持續性較長，亦為廣泛被開發應用於水產養殖之菌種[17]。而本團隊研究結果證實所開發枯草桿菌151B1水產飼料添加物，具能增進魚隻的飽滿度，提高取肉率，提升飼料效率，並能有效抑制潰瘍性結腸炎及Vibrionales (弧菌目) 病原及減少腸道中*Achromobacter insuavis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia plymuthica*、*Escherichia coli*等病原菌，降低魚病發生。並可改善養殖水質，降低養殖水體中有機物量，調整養殖水體中藻類餌料的生物相及改變魚腸道菌相等多重水產養殖應用功效 (高等人，未發表資料)。

結論與展望

單一微生物菌種具有多功能用途，然常因僅侷限在單一領域或研究室獨立研發，或僅聚焦單一場域應用開發之基礎研究階段，而使所開發產品之無法擴展應用場域並限縮市場。藉由跨領域合作共同開發之機制，將有助提升所開發產品市場競爭力，並可將單一菌種同時應用作物健康保健、作物安全、循環農業、畜禽產養殖、水產養殖等多功能場域，加速商品化產業化時程並建立相關應用效能資料與學理證據。而次世代定序技術之應用，除有助探索一環境中存在微生物族群之全貌，藉由此技術亦有助瞭解所開發微生物製劑產品，在導入應用場域後，對生態環境中微生物群相之影響及其前間交互作用消長關係，此相關資訊之解析除能更透徹瞭解所導入產品標的微生物菌種在此環境中之適存性，亦可藉此探知有益之核心菌叢 (core microbiome) 或新穎益生菌叢並進而開發其用途。

謝　　辭

本研究承蒙科技部「智慧科技於農業生產之應用」專案計畫 (計畫編號: MOST 107-2321-B-005-011 及 MOST 108-2321-B-005-006) 及行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 108 及 109 年度科技計畫-「生物製劑研發及田間應用示範」(計畫編號: 108 農-14.2.2-檢-B1(4)；109 農科-12.2.2-檢-B1(4)) 經費補助，特致謝忱。另行政院農業委員會台中區農業改良場埔里分場陳俊位分場長、張富翔助理研究員及同仁於百香果植株栽培管理之協助與試驗場地之提供，亦表誠摯感謝。

引用文獻

1. Afrc, R. F. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.
2. Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., and Mohsin, M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. Fish & Shellfish Immunology 45: 733-741.
3. Angelakis, E. 2017. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. Microbial Pathogenesis 106: 162-170.
4. Bell, T. H., Hockett, K. L., Alcalá-Briseño, R. I., Barbercheck, M., Beattie, G. A., et al. 2019. Manipulating wild and tamed phytobiomes: challenges and opportunities.

Phytobiomes Journal 3: 3-21
5. Berlec, A. 2012. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics. Plant Science 193-194: 96-102.
6. Castillo Diaz, J. M., Delgado-Moreno, L., Núñez, R., Nogales, R., and Romero, E. 2016. Enhancing pesticide degradation using indigenous microorganisms isolated under high pesticide load in bioremediation systems with vermicomposts. Bioresource Technology 214: 234-241.
7. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.
8. Giancamillo, D., Vitari, A., F. , Savoini, G., Bontempo, V., Bersani, C., et al. 2008. Effects of orally administered probiotic Pediococcus acidilactici on the small and large intestine of weaning piglets - a qualitative and quantitative micro-anatomical study. Histology and Histopathology 23: 651-664.
9. Grant, R. J., Daniell, T. J., and Betts, W. B. 2002. Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. Journal of Applied Microbiology 92: 534-540.
10. Gupta, S., Allen-Vercoe, E., and Petrof, E. O. 2016. Fecal microbiota transplantation: in perspective. Therapeutic Advances in Gastroenterology 9: 229-239.
11. Hazards, E., Panel, O. B., Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., et al. 2020. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019. EFSA Journal 18:e05965.
12. Hseih, S. H. 2018. Revealing the biofilm formation, efficacy in biocontrol of tomato bacterial wilt and growth promotion by three *Bacillus subtilis* group strains. Master Thesis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 50 pp.
13. Hussain, S. S., Mehnaz, S., and Siddique, K. H. M. 2018. Harnessing the plant microbiome for improved abiotic stress tolerance. In Plant Microbiome: Stress Response, ed. D Egamberdieva, P Ahmad:21-43. Singapore: Springer Singapore. Number of 21-43 pp. .
14. Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., and Dominy, W. 2008. Enhanced growth effects on shrimp (Litopenaeus vannamei) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. Aquaculture Nutrition 14: 533-543.
15. Kirchgessner, M., Roth, F. X., Eidelsburger, U., and Gedek, B. 1993. The nutritive efficiency of Bacillus as a probiotic in the raising of piglets. I. Effect on the growth parameters and gastrointestinal environment. Archives of Animal Nutrition 44: 111-121.
16. Kahrström, C. T., Pariente, N., and Weiss, U. 2016. Intestinal microbiota in health and disease. Nature 535: 47-47.
17. Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., and Lu, Y. 2019. A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. Fish & Shellfish Immunology 87: 820-828.
18. Kyriakis, S. C., Tsiloyiannis, V. K., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A. C., et al. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhea syndrome of piglets. Research in Veterinary Science 67: 223-228.
19. Lee, P. C. 2019. Control of Fusarium disease on passion fruits by *Bacillus subtilis* and chemical fungicides. Master Thesis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 99 pp.
20. Lin, Y. H. 2015. Identification of antagonistic microorganisms against anthracnose on tea

and passion fruit and their potential application in disease control. Master Thesis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 90 pp.
21. Maloney, S., Maule, A., and Smith, A. 1993. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology 59: 2007-2013.
22. Marchesi, J. R., and Ravel, J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome 3: 31-31.
23. Mueller, U. G., and Sachs, J. L. 2015. Engineering microbiomes to improve plant and animal health. Trends in Microbiology 23: 606-617.
24. Nicholson, W. L. 2002. Roles of Bacillus endospores in the environment. Cellular and Molecular Life Sciences 59: 410-416.
25. Orozco-Mosqueda, M. d. C., Rocha-Granados, M. d. C., Glick, B. R., and Santoyo, G. 2018. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. Microbiological Research 208: 25-31.
26. Rychen, G. et al. 2018. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA Journal 16:e05206.
27. Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Wei, H.-X., et al. 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 4927-4932.
28. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology 84: 197-215.
29. Schierack, P., Wieler, L. H., Taras, D., Herwig, V., Tachu, B., et al. 2007. *Bacillus cereus* var. toyoi enhanced systemic immune response in piglets. Veterinary Immunology and Immunopathology 118: 1-11.
30. Su, S. C., and Huang, J. W. 1983. Effect of Soil amendment on the control of watermelon Fusarium wilt Plant Protection Bulletin 25: 127-137.
31. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., and Gordon, J. I. 2007. The human microbiome project. Nature 449: 804.
32. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 655-671.
33. Whipps, J., Lewis, K., and Cooke, R. 1988. Mycoparasitism and plant disease control. In Fungi in Biological Control Systems, ed. N Burge pp161-187, Manchester University Press.
34. Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., et al. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. Veterinary Quarterly 36: 228-241.

ABSTRACT

Application of Probiotic Microbiomes in Agriculture

Huang, T. P. [1,5], Chen, Y. H.[1], Huang, W. D.[2], Lin, C. S.[3], Kao, C. Y.[4], Lu, C. L.[4], Yang, S. S.[5], Chung, W. H.[1], Huang, J. W.[1]

1. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.
2. Plant Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Xiangshan, Hsinchu Taiwan, R.O.C.
3. Animal Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Xiangshan, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.
4. Aquatic Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Xiangshan, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.
5. Pesticide Residue Analysis Center, College of Agriculture and Natural Resources, National Chung Hsing University, Taichung , Taiwan, R.O.C.

Probiotics are referred to as live microorganisms which could modulate gastrointestinal microbial communities and are beneficial to the hosts. They are known to improve intestinal microbial balance, to improve feed utilization, to promote growth, to strengthen immune response, and to suppress pathogens infections in humans and animals. They also could be used as biofertilizers to provide nutrients for the crop; as biostimulants to protect plants against abiotic stress; and as biopesticides to protect plants against biotic stress. They could be as a potential alternative or additional products to the agrochemicals and antibiotics due to their non-toxic, safe nature to the humans, animals and environments. By integration and collaboration of various professions, we propose to develop and optimize fermentation technology probiotic microbiomes products and validate their efficacy in various agricultural applications. Here, *Bacillus subtilis* strain 151 based products developed by our team for application in agriculture will be discussed. Our results indicated that *B. subtilis* 151B1 possessed plant growth promoting traits including activities in production of protease, amylase, cellulose, lipase and IAA, and phosphorus-solubilizing and could be used as a biofertilizer. They also could be used as a biopesticide to control various plant diseases caused by bacterial and fungal pathogens. Moreover, *B. subtilis* 151B1exhibited activities in degradation of pesticides malathion and deltamethrin, and a fungicide tricyclazole. Our findings indicated that the use *B. subtilis* 151B1 as feed additive for the hogs increased the feed intake and growth rate, and shortened the feeding time in comparison to the control. It also improved the weight of pork tenderloin and the texture of short fillet. Additionally, the H_2S and thiol contents in the hog feces were decreased with the feed additive of *B. subtilis* 151B1 suggesting a potential for the improvement of the farm environment. The application of *B. subtilis* 151B1 as aquaculture feed additive improved the feed conversion ratio and enhanced the fishes growth. While the strain 151B1 showed ability in reduction of NO_3 in the water of the aquaculture farm. By next generation sequence analysis, we found that application of strain 151B1 could reduce the pathogenic *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. population and enhance the beneficial *Bacillus* spp. And *Lactobacillus* spp., and *Trichoderma* spp. in the rhizosphere microbiome. Similarly,

the decrease of the pathogenic Fusobacteriales and Vibrionales population and the increase in beneficial Lactobacillales in the gut microbiota of the fishes with the treatment of strain 151B1 were found, suggesting a potential of strain 151B1 in the reduction of fish disease incidence. In conclusion, the probiotic microbiome developed possessed excellent potential for future applications in crop protection, as feed additives to promote productive performance of livestock, and in aquaculture. The practical applications of Bacillus based probiotic products could serve as alternatives of chemical pesticides, fertilizers and antibiotics for sustainable agriculture, and finally ensure food safety and sustainable environments to the publics.

Key words: Aquafeeds, Biopesticides, Biofertilizers, Feed additives, Next generation sequencing, Probiotics, Microbiome.