

# 投餵益健飼料對吳郭魚成長和腸道的影響

陳建彰<sup>1</sup>、謝豐群<sup>1</sup>、劉嫻姝<sup>1</sup>、黃美瑩<sup>2</sup>、周瑞良<sup>3</sup>、蘇慧敏<sup>1</sup>、郭喬培<sup>1</sup>、楊順德<sup>1</sup>

<sup>1</sup>水產試驗所淡水養殖研究中心、<sup>2</sup>水產養殖組、<sup>3</sup>東港養殖研究中心

## 前言

吳郭魚為臺灣重要的養殖物種，以往慣行方法為追求單位產量提升，以增加放養密度和高成長魚種來換取養殖產能，反而忽略維持養殖環境穩定、減低養殖動物緊迫及周遭環境的生態平衡。近年來因氣候變遷，水溫及鹽度的劇變易造成養殖動物緊迫而誘發疾病，因疾病而影響養殖效益成為吳郭魚養殖永續發展的主要問題。以往的解決方式是利用藥物控制疾病以降低死亡率，而吳郭魚飼料中添加抗生素，不僅增加飼料成本約10%，且有抗藥性等衍生問題。因此，應用益生菌預防及控制養殖吳郭魚疾病日益受到重視，可以改善養殖環境、抑制病原菌的生長、提高養殖動物成長性能和飼料效率、增強抗病力、提高動物緊迫抵抗力和整體活力，對改善水產動物體內外環保有重要的作用。然而目前水產養殖業者施用益生菌的方式，多以粉溶水拌合吸附於飼料後投餵，但也因而致使微生物添加物的高流失性及人力成本增加，再者可資應用的益生菌品項繁多，其生物特性及有效活性、添加於飼料的方法及劑量、保存方式與期限各自不同，以致應用成效不穩定。

本研究為於飼料製程中添加複合益生

菌，且維持一定的生物活性，以本所研發的短小芽胞桿菌 D5 (*Bacillus pumilus* D5) (黃等，2016) 及腸膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides* B4) 含葡聚糖 (黃等，2017) 等多功能之益生菌，透過飼料包覆製程並經菌株活性確效，與生技公司及飼料廠合作，共同商業化量產益健飼料，於所內建置吳郭魚養殖驗證場域，以有效增加成長率、活存率及抗病力，以求達到減抗和增進養殖效益之目標。

## 材料與方法

### 一、益健飼料製備

本試驗使用的益健飼料為與飼料廠合作商業化試量產的飼料，其中應用了本所東港養殖研究中心的飼料包覆製程技術，將益生菌 *B. pumilus* D5 與 *L. mesenteroides* B4 含葡聚糖包覆於飼料上，並經本所養殖組菌數活性確效。

### 二、投餵試驗

本試驗應用平均體重為 12.57 g 的尼羅吳郭魚苗 (*Oreochromis niloticus*)，經隨機分成對照組及試驗組各 2 重複，共計 4 池，每池 150 m<sup>2</sup>，各放養 835 尾，水體約為 225 公噸，於蓄養試驗期間少量進水以補足養殖土

池的蒸散以及底部滲透的水量。試驗組投餵含複合益生菌的吳郭魚益健飼料，對照組則投餵同配方而未添加複合益生菌的商用飼料。蓄養試驗全期為 34 週，試驗結束後進行成長效能評估、腸道菌相檢測及腸道組織型態分析。

### 三、成長效能評估

蓄養試驗結束後，每組隨機採樣 20 尾以上，量測魚隻體長，紀錄其收成之體重 (average weight, g) 及活存率 (survival rate, %)。

### 四、腸道菌群分析

暫停投餵飼料 4 天後，試驗組及對照組分別採樣 3 尾魚的末端腸道組織進行均質，每組混合成一個樣本，以 QIAamp DNA Microbiome Kit (Qiagen) 萃取腸道微生物基因體 DNA，接著進行次世代定序分析，腸道菌的 16s rRNA 基因以 PCR 放大 V3-V4 區域，所使用的引子 (primer) 為 341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' 及 805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'，長度為 465 bp。PCR 產物經純化後，進行 paired-end library 構築，以 Illumina MiSeq 平台進行解序 (2 × 300 bp)，將所得序列進行分析，以各檢體所含的菌種種類及菌叢分布比例 (Tri-I, New Taipei, Taiwan)。本次試驗以高通量次世代定序分析腸道菌群，每個樣本得到平均約 150,546 條有效讀本 (effective reads)，將這些有效序列進行叢集 (cluster)，其中序列相似 (Identity > = 97%) 歸類為同一個 OTU (operational taxonomic unit; 操作分類單元)，最終再將所獲得的 OTU 進行菌種分類，經資料分析，共 24,186 個 OTU。

## 結果與討論

### 一、益健飼料對吳郭魚養殖成長分析

12.57 g 的魚苗經養殖 242 天後，蓄養試驗結束時試驗組的魚隻收成體重為 860 ± 23.45 g，顯著高於對照組魚隻之收成體重 (785 ± 18.15 g) ( $p < 0.05$ ) (圖 1)。試驗組的活存率為 78%，高於對照組的 68%，但兩組間並無統計上的差異。相較於慣行養殖方式，本研究以益生菌 *B. pumilus* D5 與 *L. mesenteroides* B4 含葡聚醣包覆於飼料的益健飼料可有效提升吳郭魚的成長，縮短養殖

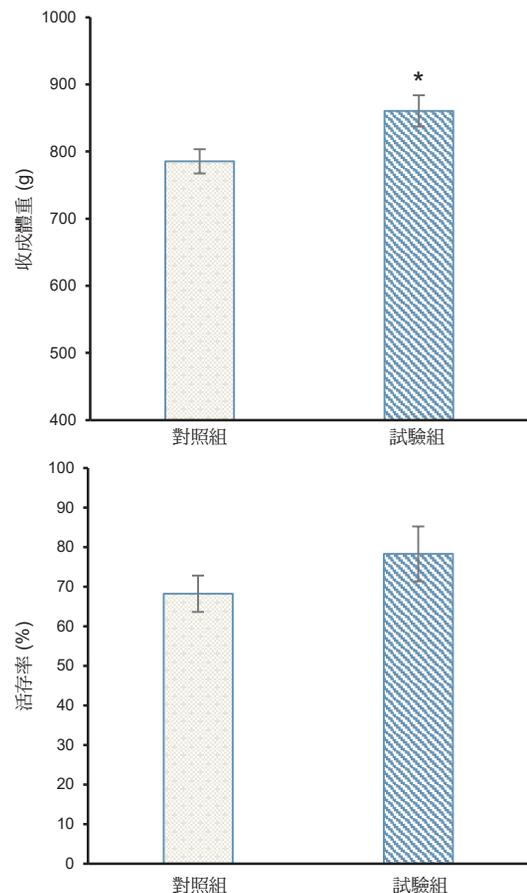


圖 1 吳郭魚成長及活存率分析 (\* 表示組間有顯著差異,  $p < 0.05$ )

期程，其活存率亦較高，可以有效降低吳郭魚的養殖成本進而提升養殖收益。

## 二、腸道菌相分析

由腸道菌相分析結果 (表 1)，在屬的階層中，對照組的比例分別為葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*) 0.081%、產氣單胞菌屬 (*Aeromonas*) 0.467%、愛德華氏菌屬 (*Edwardsiella*) 0.039% 及弧菌屬 (*Vibrio*) 0.611% 等相關致病菌屬，皆高於試驗組的菌相比例。進一步比較種的階層，對照組的比例分別為豚鼠產氣單胞菌 (*Aeromonas caviae*) 0.055%、溫和產氣單胞菌 (*Aeromonas sobria*) 0.259%、愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 0.033% 及乳酸鏈球菌 (*Lactococcus garvieae*) 0.003%，亦皆高於試驗組的菌相比例。投餵益健飼料後 120 天後觀察到魚體內致病菌佔比如產氣單胞菌、愛德華氏菌及乳酸鏈球菌

等較低。此外試驗組腸道有 0.015% *B. pumilus* D5 附生，對照組為 0.001%，益生菌 D5 可穩定的定殖在腸道中，有效改善腸道菌相。

## 三、腸道組織型態分析

在吳郭魚投餵試驗中，對照組及試驗組的組織切片 (圖 2) 顯示，試驗組腸絨毛的發育良好，其排列緊密且高度增加，試驗組腸絨毛高度為 466  $\mu\text{m}$ ，高於對照組 332  $\mu\text{m}$ ，有極顯著差異 ( $p < 0.001$ )，厚度為 97.9  $\mu\text{m}$ ，高於對照組 87.2  $\mu\text{m}$  (圖 3)。而餵食 *L. mesenteroides* B4 含葡聚醣的白蝦 (*Litopenaeus vannamei*)，可以增加其腸道絨毛高度 (黃等，2023)。因此，可知餵食含 *B. pumilus* D5 與 *L. mesenteroides* B4 含葡聚醣的益健飼料有助於吳郭魚腸道組織型態發育完善，進而增加吸收面積及提升消化利用率，提升成長效能。

表 1 腸道菌相分析

腸道菌群	對照組	試驗組
屬名		
葡萄球菌屬 ( <i>Staphylococcus</i> )	59 (0.081%)	3 (0.004%)
產氣單胞菌屬 ( <i>Aeromonas</i> )	339 (0.467%)	3 (0.004%)
愛德華氏菌屬 ( <i>Edwardsiella</i> )	28 (0.039%)	3 (0.004%)
弧菌屬 ( <i>Vibrio</i> )	443 (0.611%)	4 (0.006%)
種名		
豚鼠產氣單胞菌 ( <i>Aeromonas caviae</i> )	40 (0.055%)	0 (0%)
溫和產氣單胞菌 ( <i>Aeromonas sobria</i> )	188 (0.259%)	1 (0.001%)
愛德華氏菌 ( <i>Edwardsiella tarda</i> )	24 (0.033%)	3 (0.004%)
乳酸鏈球菌 ( <i>Lactococcus garvieae</i> )	2 (0.003%)	0 (0%)
短小芽胞桿菌 D5 ( <i>Bacillus pumilus</i> D5)	1 (0.001%)	11 (0.015%)

數字代表細菌菌群中的 OTU 讀數，括號中的數字代表在各組中的相對豐度

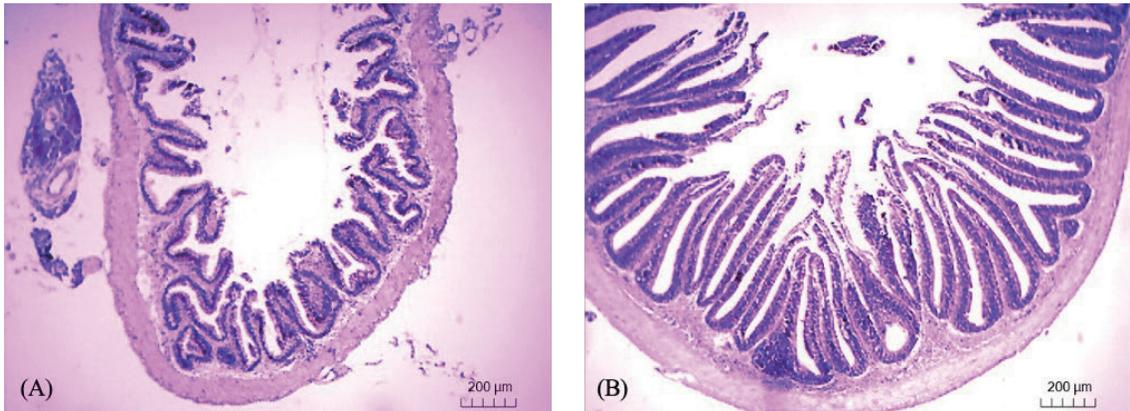


圖 2 腸道組織型態分析 (A：對照組；B：試驗組)

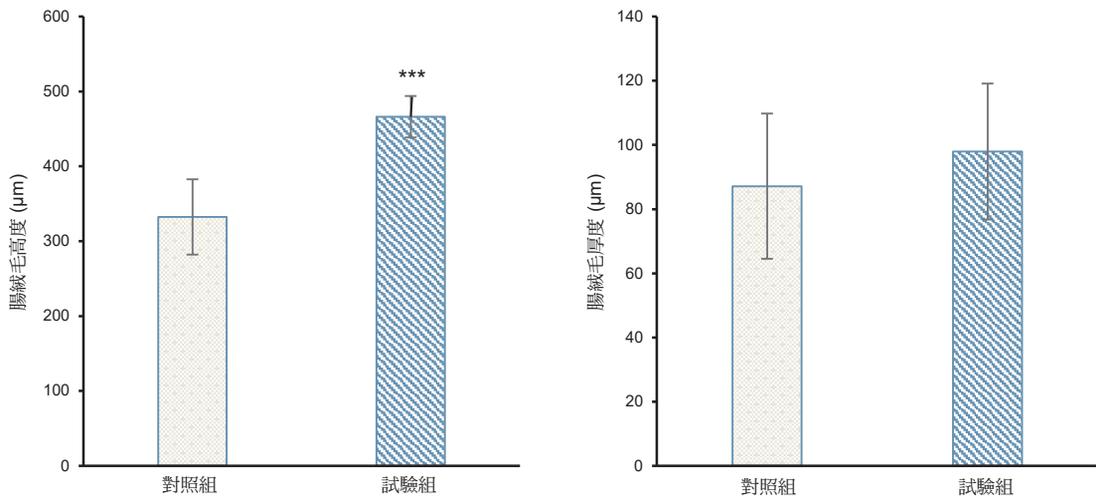


圖 3 腸絨毛的高度和厚度比較 (\*\*\*) 表示組間有極顯著差異， $p < 0.001$

#### 四、應用益健飼料的健康管理技術

為因應極端氣候變化及減抗養殖，確立在吳郭魚健康養殖管理技術中應用益健飼料，以達成吳郭魚友善養殖 (圖 4)。在種苗放養階段，可以選擇放養高成長或抗病品系的尼羅吳郭魚，一般採 3-6 萬尾/公頃的放養密度，因為市場的全魚價格較為浮動，放養不同規格的魚可以在不同的時間點收成，避免和同業競爭出魚。在日常養殖管理方

面，使用益健飼料不僅可以促進吳郭魚的成長、提高育成率及增加魚體抗病力外，同時也可以結合環境益生菌來穩定養殖水體環境、抑制病原菌及優化魚體內外菌相。當魚隻面對長時間高溫且無降雨，或是短時間強降雨的情境時，容易爆發疾病，此時仍需使用合法用藥，因此，在日常飼料中投餵含 *B. pumilus* D5 與 *L. mesenteroides* B4 含葡聚醣的益健飼料，可有效強化魚隻的健康及降低

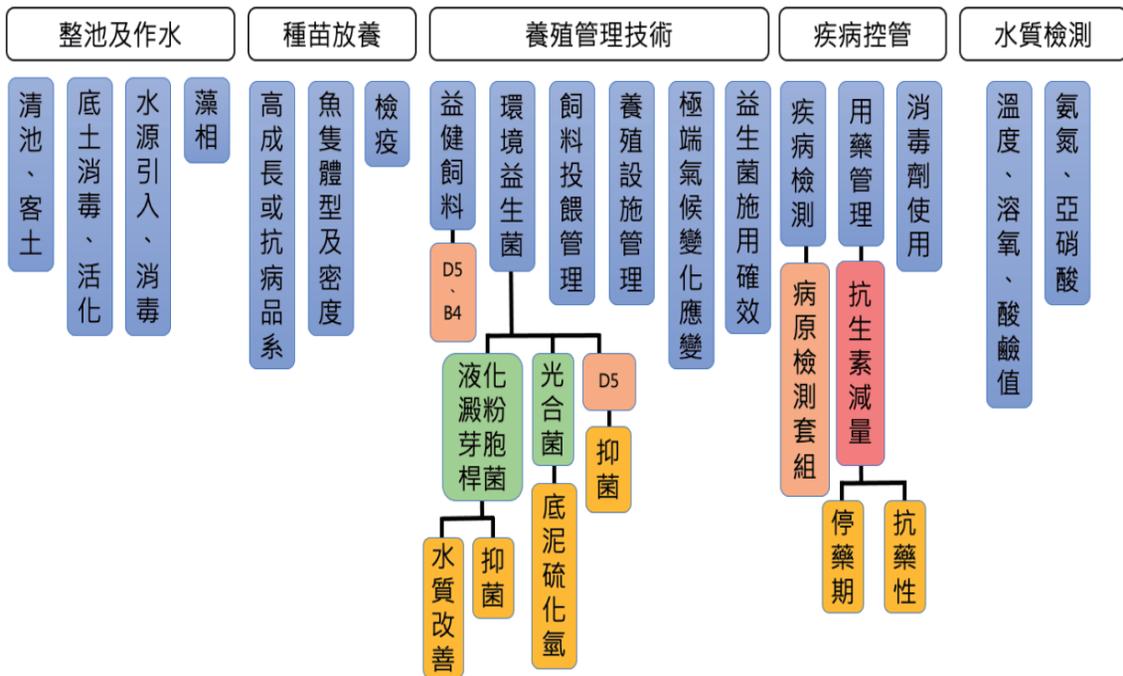


圖 4 應用益健飼料的健康管理技術

疾病發生率，達到抗生素減量，避免養殖中後期藥物敏感性降低及上市前的藥物殘留檢出等風險。疾病檢測方面，建議配合本所研發的常見病原檢測套組，定期檢測水體環境及魚隻體內病原菌數量，進而評估養殖環境發生疾病感染的風險指數，即時判別病因及定期檢測養殖物健康情形，減少疾病造成之損失，提升養殖成效。水質定期檢測及搭配環境益生菌定期施用，可以快速降解氨氮及亞硝酸，穩定水質降低養殖物緊迫性，加上水車及造流增氧機養殖設施使用管理，建立健康管理標準作業程序。

## 結語

透過運用飼料包覆製程，將複合有益微

生物於飼料製程中添加，整合相關產業包含保健飼料添加業者及飼料廠確立益健飼料商業化生產製程，完成吳郭魚益健飼料技術套組開發，並於驗證場域進行養殖實證，顯示投餵益健飼料確證 *B. pumilus* D5 在魚體腸道中仍保有活性，可抑制病原菌生長，並有效提升成長效能、改善腸道菌相及腸道組織結構發育、提升飼料效率及育成率。因此，結合應用益健飼料安全管理技術之輔導機制，標準化養殖作業流程，以降低水產動物死亡之情形，強化養殖動物健康，進而減少抗生素施用。後續將持續推廣益健飼料的研發成果，逐步擴散至水產養殖相關產業，達成吳郭魚友善養殖及永續經營，生產安全零藥殘水產品，提升國際市場地位，增加產業競爭力。