

### 雨水對蝦池養殖環境變化之探討

先後爆發肝胰腺桿狀病毒及白點桿狀病毒感染後，引起草蝦養殖事業一蹶不振，養殖業者損失慘重，但有些業者不輕易放棄，仍繼續努力；最近數年業者認為養殖過程中若遇到降大雨則更易引發病情，是否雨水對養殖環境會產生某些變化，進而影響草蝦的正常生理功能，並導致引發草蝦大量暴斃情形，值得研究，以期在養殖過程中能適時加以因應，進而改善水質環境，減少病害之發生。

2003 年台南地區全年降雨量為 888.5 mm，只達前 3 年平均值 52.57%，屬偏低年雨量，雨水質分

析：pH 平均值  $5.97 \pm 0.41$ ， $\text{SO}_4^{2-}$  平均值  $2.7 \pm 1.8$  mg/L， $\text{NO}_3^-$  平均值  $0.8 \pm 0.7$  mg/L，Cl<sup>-</sup> 平均值  $9.0 \pm 6.7$  mg/L， $\text{Mg}^{2+}$  平均值  $2.5 \pm 2.0$  mg/L， $\text{K}^+$  平均值  $1.3 \pm 0.6$  mg/L， $\text{Mn}^{2+}$  均值  $0.04 \pm 0.01$  mg/L， $\text{Ca}^{2+}$  平均值  $6.1 \pm 4.2$  mg/L，陽離子當量濃度以  $\text{Ca}^{2+}$  最高，而後依序為  $\text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Mn}^{2+}$ 。蝦養殖池降雨前後水質比較：化學離子成份變化，Cl<sup>-</sup>、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  與  $\text{Ca}^{2+}$  等隨雨量明顯下降趨勢， $\text{Mn}^{2+}$ 、F<sup>-</sup> 無顯著變化。擬降雨量對養殖池水之水質變化硬度、總鹼度與總溶解固體量化學離子成份變化，隨模擬降雨量愈多則有下降之趨勢，但不隨時間而變化。

表 1 草蝦養殖池之化學物質分析

分析 次序	養殖池（池號）	日期	下雨量 (mm)	Phosphate (mg/L)	Silicate (mg/L)	Nitrate (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	NH <sub>4</sub> -N (mg/L)
1	下雨前養殖池（1）	7/23	26	0.046	0.210	1.4	0.006	0.052
	下雨前養殖池（2）			0.130	0.210	1.0	0.004	0.049
	下雨前養殖池（3）			0.080	0.240	2.2	0.001	0.036
	下雨後養殖池（1）	7/24		0.046	0.120	1.2	0.045	0.058
	下雨後養殖池（2）			0.092	0.100	0.8	0.001	0.049
	下雨後養殖池（3）			0.050	0.160	2.1	0.001	0.078
2	下雨前養殖池（1）	8/3	62	0.040	0.070	0.8	0.040	0.220
	下雨前養殖池（2）			0.006	0.010	0.9	0.001	0.080
	下雨前養殖池（3）			0.011	0.070	0.7	0.001	0.140
	下雨後養殖池（1）	8/5		0.509	0.072	1.3	0.001	0.495
	下雨後養殖池（2）			0.128	0.046	0.6	0.001	0.358
	下雨後養殖池（3）			0.010	0.015	0.8	0.001	0.395

### 甲殼素增進吳郭魚免疫能力之研究

飼料中添加甲殼素 (chitosan) 與多醣體 ( $\beta$ -glucan)，誘導增強吳郭魚細胞性免疫能力，從魚體分離純化出 macrophage，在 *in vitro* 的條件下，進行 macrophage 吞噬葡萄球菌 (*Staphylococcus*

*epidermidis*) 之試驗。目的在於檢測試驗魚 macrophage 胞的吞噬能力，測試甲殼素或多醣體是否可以有效提高 macrophage 吞噬細菌的活性，亦即運用免疫學的方法來增強魚類細胞性免疫的能力，進而達到預防或減少魚類病害的發生率。

篩選試驗吳郭魚。試驗分三組進行，分別為甲殼素飼育組、多醣體飼育組、及對照組等。甲殼素飼育組吳郭魚平均魚體重為 130.07 g，平均魚體長為 18.7 cm，飼料為福壽牌成鰻鰾粉，投餌量為 1.5% 魚體重，甲殼素添加量為 3% 鰻粉量，平均每尾魚供應 0.058 g 甲殼素 (0.045% 魚體重)。多醣體飼育組吳郭魚平均魚體重為 133.90 g，平均魚體長為 18.9 cm，飼料為福壽牌成鰻鰾粉，投餌量為 1.5% 魚體重，多醣體添加量為 3% 鰻粉量，平均每尾魚供應 0.060 g 多醣體 (0.045% 魚體重)。對照組吳郭魚平均魚體重為 137.13 g，平均魚體長為 19.4 cm，飼料為福壽牌成鰻鰾粉，投餌量為 1.5% 魚體重。

無菌摘取脾臟組織放在含 1% penicillin /streptomycin (p/s)，5% fetal calf serum (FCS) 之 L-15 培養液中，剪碎組織。細胞懸浮液加入 34/51% (v/v) percoll gradient，離心條件為  $400 \times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ，30 min，再離心一次，沉澱巨噬細胞懸浮在 10% FCS 之 L-15，細胞濃度為  $3.3 \times 10^7$ 。取 15 mm 圓形玻璃片放入 4 well flask 中，用 pipette 吸取細胞懸浮液滴入 well 中培養，在  $20^{\circ}\text{C}$  培養箱培養，培養時間為 1.5 小時，讓巨噬細胞沉澱，並粘附在圓形玻璃片上，準備進行細菌吞噬試驗。

從冷凍乾燥管取出真空冷凍乾燥葡萄球菌，培養在 Tryptic Soy Agar (TSA) 培養基，溫度為  $24-48^{\circ}\text{C}$ ，充分活化細菌，再轉入 Tryptic Soy Broth (TSB) 中大量培養 24–36 小時 ( $30^{\circ}\text{C}$ )。加入 0.5%

formalin solution 充分殺死細菌，細菌用 phosphate buffer saline (PBS) 洗 5 次，可完全去除 formalin，將細菌懸浮在 10% FCS 之 L-15 培養液中備用，細菌濃度調整為  $1.6 \times 10^7$  cfu/mL。

巨噬細胞經 1.5 h 培養，細胞充分粘附在 4 well flask 中之圓形玻璃片上，以 L-15 + 2% FCS 洗 3 次，洗去未附著的細胞，加入含 10% FCS 之 L-15 之細菌懸浮液，靜置培養 10 分鐘，進行巨噬細胞吞噬細菌試驗，細菌吞噬試驗結束後細胞以中性福馬林固定 5 分鐘，用 PBS 洗 3 次，滴入 1% Giemsa solution 進行染色 1.5 小時，再用 PBS 洗 3 次，洗去殘留的染劑，室溫靜置乾燥，用 Entella 封蓋，放在顯微鏡下觀察。在顯微鏡下觀察時，隨機取樣，隨機選取 100 個巨噬細胞，詳細計算其吞噬葡萄球菌的數量，同時，比較甲殼素飼育組、多醣體飼育組、及對照組等試驗組，其巨噬細胞吞噬能力之差異。

*in vitro* 試驗巨噬細胞吞噬葡萄球菌之能力，試驗結果顯示，甲殼素飼育組與對照組，吞噬細菌的數量都小於 20 個，主要的吞噬範圍集中在 1–10 細菌，平均吞噬細菌的數量分別為 4.28 及 4.31，但多醣體飼育組吞噬能力很強，可以吞噬較多數量的葡萄球菌，有 17% 細胞可以吞噬 21–25 個細菌，34% 細胞可以吞噬  $> 25$  個細菌，平均吞噬細菌的數量  $> 17.66$ 。

表 1 以甲殼素與多醣體飼育吳郭魚，*in vitro* 試驗巨噬細胞吞噬葡萄球菌之能力

組別	吞噬葡萄球菌的數量						平均吞噬量
	1 - 5	6 - 10	11 - 15	16 - 20	21 - 25	$> 25$	
對照組	71 (71%)	23 (23%)	5 (5%)	1 (1%)	0	0	4.28
甲殼素飼育組	84 (84%)	19 (19%)	3 (3%)	5 (5%)	0	0	4.31
多醣體飼育組	11 (11%)	19 (19%)	11 (11%)	8 (8%)	17 (17%)	34 (34%)	17.66 *

\* 多醣體飼育組巨噬吞噬量  $> 25$  的部分，均以 25 計算