

飼料中添加幾丁質對草蝦免疫活性之影響

張錦宜・徐崇仁

水產養殖系

一、前言

台灣的養蝦業主要以養殖草蝦及斑節蝦為主。1988 年草蝦病變，產量銳減；1992 年斑節蝦罹患白斑病，造成大量死亡，使得養蝦事業面臨困境，一直無法突破，專家學者投注大量人力、物力研究改善對策，並輔導業者走向正確養殖方法，雖時有成功之例，但目前仍無法恢復往日之養蝦盛況。種蝦健康問題、幼蝦品質不良、養殖池老化、水質管理不良及用藥不當等等都是造成蝦類死亡的原因。由於蝦類在幼蝦期成長迅速，罹病率高，業者使用藥物頻繁，容易造成養殖池中的微生物具抗藥性，不但非治本之道，而且會衍生出更嚴重的公共衛生問題。比較起來，於飼料中添加具抗病病原菌能力或可提高蝦類免疫效果的聚醣類之幾丁質，應為一較適當的作法。根據 1995 年試驗結果，添加適當濃度之幾丁質於飼料中餵飼斑節蝦，可顯著提高斑節蝦之成長率及活存率。本實驗進一步探討飼料中添加幾丁質對蝦類非專一性免疫活性的影響，以瞭解其作用機制。

二、材料與方法

(一)飼料中添加幾丁質對草蝦活存率影響試驗

1、實驗蝦：

購自台南縣民間繁殖場之草蝦後期幼蝦 PL15，飼養於 500 公升玻璃纖維桶，先以豐年蝦及人工餌料 (NOSAN R-2, 日本農產工業株式會社) 餵飼，再配合草蝦幼蝦飼料(台榮飼料公司)，飼養期間 2 個月，然後進行成長及活存率試驗。

2、飼料調配：

於幼蝦飼料 (配方由本所提供，台榮公司配製，表 1) 中添加 200、400、600、800、1000 ppm 等不同含量之幾丁質 (chitin from shrimp shells, Sigma)，製成粒狀飼料，原飼料亦打粒作為對照組飼料。

表 1 草蝦幼蝦飼料配方

成	份	含 量
Flour		28.0
Fish meal		30.0
Squid meal		7.0
Soybean meal(defatted)		13.5
Yeast powder		2.0
Shrimp scale meal		5.0
Shorts		3.5
Oil		6.0
Vitamin mix		3.0
Mineral mix		2.0
Total		100.0

3、蕃養條件：

將幼蝦(長約 2.5~3.5 cm, 重約 0.08~0.15 g) 飼養於長 60 cm × 寬 30 cm × 高 30 cm 水族箱中，內鋪有 3 cm 厚細砂，每缸放 40 尾，分別投餵含有 200、400、600、800、1000 ppm 幾丁質的幼蝦飼料及對照組飼料，重覆實驗。飼養期間為 40 天。

4、弧菌菌株分離與鑑定：

本省蝦類細菌性疾病主要以弧菌症(vibriosis)為主，常造成大量死亡，故以弧菌為感染菌株。以滅菌白金耳自罹患白斑病的斑節蝦肝胰臟取一小塊組織，塗抹於 TSA (tryptone soya agar + 2.0% NaCl, Difco) 及 TCBS(thiosulphate citrate bile salt sucrose agar, Difco) 培養基培養 18~24 小時 (培養溫度 28 °C)，再經 3 次純化分離，並以 Vibriostatic compound 0/129 10 μ g/disc 及 150 μ g/disc 8mm dia (Creative Microbiologicals LTD., R.O.C.) 測定，初步鑑定為弧菌屬後，將菌液以生理食鹽水調配為濃度 3.0×10^8 CFU/ml，再按照 API 20E (API system, La Balmeles-Grotes, France) 操作方法將菌液注入 well 內，培養於 28°C，24 小時後觀察並記錄結果，再將資料輸入所附電腦軟體(API, ATB system, France)初步確認菌種，再參考 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 所列菌種生化特性，確定菌株種名，並與 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Md) 標準菌株比對生化特性。

5、感染及活存率試驗：

先進行實驗菌株對草蝦之半致死濃度實驗，觀察期間為一星期，再將上述蓄養之草蝦進行病原菌株感染試驗，採肌肉注射方法，注射劑量為 0.1 ml/尾，每缸水族箱放養 12 尾，實驗期間為 2 星期。每天觀察並記錄已注射病原菌的實驗蝦死亡情形，再比較各組活存率差異。

活存率計算方法如下：

$$\% \text{ of survival} = \frac{\text{No. of survival shrimp}}{\text{Total No. of shrimp}-A} \times 100$$

A 代表第 1 天死亡數目，似因感染注射對試驗蝦造成壓迫之故。

(二)飼料中添加幾丁質對草蝦非專一性免疫活性影響試驗

本實驗採用酚氧化酵素(phenoloxidase, PO)活性指標，其測定方法如下：

1、Hemocyte lysate supernatant (HLS) 的製備：

以含有 50 μ l 抗凝劑 (glucose 0.1M, trisodium citrate 30 mM, citric acid 26 mM, EDTA 10 mM, pH 4.6，溶於鹽度 20 ppt 的海水，以 121°C，15 min 高溫高壓滅菌) 針頭抽取草蝦血淋巴 1 ml，經 300 g、10 min 離心後取血球細胞，以 cacodylate-citrate (sodium cacodylate 0.01 M; sodium chloride 0.45 M; trisodium citrate 0.1 M; pH 7.0) 緩衝液洗細胞一次後，細胞懸浮於冰的 cacodylate (CAC, sodium cacodylate 0.01 M; sodium chloride 0.45 M; calcium chloride 10 mM; magnesium chloride 26 mM; pH 7.0) 緩衝液以細胞破碎儀擊碎後，再以 43,000 g 離心 20 min，取上清液，上清液以 CAC 緩衝液調整蛋白質濃度為 3~6 mg/ml 後置於 -20°C 備用。

2、草蝦巨噬細胞 PO 活性的測定：

將採自上述不同飼養條件之草蝦之血球細胞製成 HLS，取 200 μ l 的 HLS 培養在 37°C，作用 15 min，加入 400 μ l 的受質 L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine, 1.6mg/ml; sigma)，作用一分鐘後，立即加入 400 μ l cacodylate 緩衝液，將混合液置於波長 490 nm 光譜儀測定吸光值。酵素活性以每分鐘每毫克蛋白質增加 0.001 者為一單位。

三、結果與討論

(一)飼料中添加幾丁質對草蝦活存率影響試驗

1、試驗菌株生化特性鑑定：

自罹患白斑病斑節蝦肝胰臟分離出 10 株 *Vibrio* sp. 菌株，以佔優勢者為實驗菌株。

以 API 20E Kit 進行生化特性鑑定結果，得知 *Vibrio vulnificus* 為優勢菌株，經毒性試驗結果，具致死能力且草蝦注射部位呈現白濁現象，故選為實驗菌株，命名為 PJ1，並與 ATCC 27562 標準菌株比對生化特性。結果由表 2 得知，本實驗菌株與 ATCC 27562 之生化特性相似，具運動性，對 vibrio static agent 0/129 10 μ g 及 150 μ g 敏感，在 TCBS 選擇培養基可

表 2 自罹患白斑症斑節蝦肝胰臟分離之實驗菌株與 ATCC 27562 標準菌株生化特性比對

Tests	Strain PJ1	Type strain ATCC 27562
ONPG	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Citrate utilization	+	+
H ₂ S production	-	-
Urease	-	-
Tryptophane deaminase	-	-
Indole production	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Gelatinase	+	+
Glucose	+	+
Mannitol	+	+
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	-
Sucrose	-	-
Melbiose	-	-
Amygdalin	+	+
Arabinose	-	-
Oxidase	+	+
Nitrate reduction	+	+
Nitrite reduction	-	-
Catalase	+	+
Motility	+	+
Growth on MacConkey agar	+	+
O/F-test	F(Fermentative)	F
O/129 inhibition 10 μ g	+	+
150 μ g	+	+
Growth on TCBS agar	G(Green)	G
Novobiocin	+	+
Chlortetracycline	+	+
Nitrofurantoin	+	+
Streptomycin	+	+

成長，為綠色菌落。對葡萄糖的利用屬於發酵性，可分解 glucose、mannitol、amgdalin，產生酸；無法發酵 inositol、sorbitol、rhamnose、sucrose、melbiose、arabinose。可分解明膠 (gelatin)，產生離胺酸脫羧酵素 (lysine decarboxylase)，鳥胺酸脫羧酵素 (ornithine decarboxylase)，不具精胺酸二水解酵素。具氧化酵素 (oxidase-positive reaction)，可產生 indole，利用檸檬酸鹽 (citrate) 不產生硫化氫 (H_2S)，有 catalase 存在，硝酸鹽可被還原，ONPG 及 Voges-Proskauer 測定為陽性反應，TDA (tryptophane) 為陰性反應，不能利用 urea。對 novobiocin、chlortetracycline、nitrofurantoin、streptomycin 等藥物具感受性。

2、感染及活存率試驗

感染草蝦菌株採全菌之肌肉注射方式，經半致死濃度試驗結果，全菌對草蝦的半致死濃度為 4.8×10^3 CFU/ml，再進行活存率試驗。由實驗結果得知(表 3)，飼料中添加不同濃度的幾丁質飼草蝦，可提高活存率，其中以幾丁質含量為 200、400、600 ppm 的活存率較佳，分別為 70.8%、79.2%、66.7%，又以 400 ppm 組為最佳，而 800、1000 ppm 及對照組活存率較差，分別為 50.0%、54.2%、50.0%。

(二)飼料中添加幾丁質量對草蝦非專一性免疫活性之影響

試驗草蝦以含不同幾丁質濃度之飼料飼養 40 天後，各缸隨機選取 5 尾抽血，依上述方法製成 HLS，立即測定其 PO 活性。由實驗結果

得知(表 4)，飼料中添加不同濃度幾丁質確可顯著提高草蝦血淋巴之 PO 活性，其中又以添加 400、600 及 800 ppm 幾丁質者最佳，PO 活性分別為 4.38、4.65 及 4.50，其次為添加 200 及 1000 ppm 者，PO 活性分別為 2.32 及 2.98。

四、結論與建議

許多報告證實真菌的聚醣類 (β -1,3-glucan)、細菌的脂多醣 (lipopolysaccharide) 和肽醣 (peptidoglycan) 都能增進哺乳類、魚類、甲殼類，甚至植物的抗病力。幾丁質是白色不溶的角質多醣體，在自然界中含量僅次於纖維素，廣泛存在於昆蟲、線蟲、蝦及蟹等甲殼類之甲殼及真菌類的細胞壁中。Suzuki et al. (1982) 發現幾丁質和幾丁聚醣 (chitosan) 亦具有免疫效果。因此本實驗以幾丁質為免疫刺激物添加於飼料中飼草蝦，結果顯示添加幾丁質於飼料中的確可以提高蝦血淋巴的 phenoloxidase 活性，同時使草蝦遭受弧菌感染時活存率提高。活存率試驗時添加 400 ppm 可得最好的效果，但 PO 活性卻以添加 600 ppm 幾丁質最佳，800 ppm 次之，400 ppm 再次之。原因可能是甲殼類的非專一性抗病機制，除了 PO 系統外，尚有沉澱素、殺菌素、凝集素、調理素及溶菌酵素，草蝦的防禦機制是上述的共同表現，故本試驗僅在證實飼料中添加幾丁質確可提高草蝦的非專一性免疫反應，至於提高的程度如何，或何種條件下可達最適之免疫反應，則非僅測 PO 活性單一因子能論斷的。

表 3 飼料中添加幾丁質濃度與草蝦活存率之關係

飼料含幾丁質濃度 (ppm)	草蝦存活率 (%)
0	50.0
200	70.8
400	79.2
600	66.7
800	50.0
1000	54.2

表 4 飼料中添加幾丁質濃度與草蝦血淋巴酚氧化酵素 (phenoloxidase) 活性之關係

飼料含幾丁質濃度 (ppm)	Phenoloxidase specific activity (U/mg/min)
0	1.00
200	2.32
400	4.38
600	4.65
800	4.50
1000	2.98