

多醣應用於強化海鱸抵抗發光菌及鏈球菌感染之研究

張正芳* · 楊佳宏 · 張賜玲 · 周瑞良 · 何碧月 · 許家惠 · 陳紫嫻

行政院農業委員會水產試驗所 東港生技研究中心

摘 要

本試驗主要在探討口投含不同劑量多醣 (β -1,3-1,6-glucan from *Schizophyllum commune*) 之飼料，餵飼海鱸 (*Rachycentron canadum*) 一段時間後，對發光菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 與鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 之抵抗能力，找出有效之添加劑量。由試驗一結果顯示，海鱸餵食含多醣 0、0.1、0.2、0.4、0.8 與 1.6% 飼料 10、20、30 與 40 天後，分別用發光菌進行腹腔注射感染，其中以餵食含多醣 0.4、0.8 與 1.6% 組之存活率較高 ($p < 0.01$)。試驗二改變多醣添加量為 0、0.5、1.0 與 2.0%，首先以四組飼料餵飼平均體重 6.5 g 之海鱸幼苗 15 週，各組之成長與存活率均無顯著差異存在 ($p > 0.05$)。另外，以相同四組飼料餵食海鱸 10、20 與 30 天後，分別以發光菌及鏈球菌進行腹腔注射感染。發光菌攻毒試驗結果，以餵食含多醣 0.5% 組存活率較高 ($p < 0.01$)。而鏈球菌在第 10 天之攻毒試驗結果，也以餵食含多醣組存活率較高 ($p < 0.001$)。由此二試驗之結果，添加多醣 0.5%，餵食海鱸 10 天，即可增強海鱸抵抗發光菌及鏈球菌之感染，而長期間在飼料中添加多醣，並不會影響海鱸之生長。

關鍵詞：海鱸、多醣類，發光菌、鏈球菌、存活率

前 言

海鱸 (*Rachycentron canadum*) 為目前已確立完全養殖技術之海水魚類中，成長最為快速的魚種；比起 2 年才可長至 3 kg 的鮭魚 (*Oncorhynchus kisutch*)、紅魷鯿 (*Seriola dumerili*)、青魷鯿 (*S. quinqueradiata*)，或 1 年成長不到 1 kg 的嘉鱚 (*Pagrus major*)、鱸魚 (*Lateolabrax japonicus*) 等魚種，在養殖上具有絕對的競爭優勢。養殖海鱸肉質鮮美，肉中脂肪含量可達 20% 左右，而脂肪中之高度不飽和脂肪酸 (EPA 與 DHA) 含量高達 5% 左右，遠比鮭魚為高，因此可稱之為健康食品。

近年來，台灣的外海箱網海鱸養殖，年產量已達 3,000 ~ 5,000 ton 左右，發展潛力很大。唯，在箱網養殖過程中，魚隻常會在篩選、搬移或搶食飼料時，相互擦撞而受傷，一旦受到細菌感染，

即會導致極高的死亡率。要克服箱網養殖海鱸遭受病原的侵襲，除了需要進一步改進箱網養殖系統，加強研發育種、飼料、病害防治及養殖自動化等相關技術外，另則需要強化魚體對病原的抵抗力。若能有效克服各項問題，則台灣的外海箱網海鱸養殖，可望媲美挪威的鮭魚養殖，成為最具競爭力的產業之一，可以大幅拓展外銷市場，尤其在我國加入 WTO 之後，對強化我國水產養殖產業的國際競爭力，將有很大的助益。

目前魚類養殖過程中，一旦發生疾病，通常必須使用化學藥物或抗生素來治療，但是過量的使用會產生許多藥物殘留的問題，從整個食品安全的角度考慮，藥物的殘留對消費者健康的危害性非常大。水產疫苗的研發及相關產品的生產使用，使疫苗成為疾病防治上最有效的方法，但迄今對於病毒性疾病及部分的細菌感染症如發光菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 等，仍尚未能研發出有效疫苗。因此，除了使用化學藥物及疫苗外，需另外尋找預防和控制疾病的替代方法。

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號, TEL: (08) 832-4121 轉 272; FAX: (08) 832-0234; E-mail: changch@ms3.hinet.net

魚類抗病機轉多數藉由非特異性防禦系統作為其消滅外來病原之機制，因為不需經過特異性免疫反應中許多的生理調控，而以活化吞噬細胞分泌過氧化物即可迅速反應，並能夠快速針對外來病原進行立即性的防禦反應 (Ainsworth *et al.*, 1991; Edagawa *et al.*, 1993; Stoskopf, 1993)。近年來，有不少的研究報告指出，對魚蝦類授予免疫賦活物質 (例如多醣) 可增強其抗病性。由 *Schizophyllum commune* 抽出之 β -1,3-1,6-glucan 為多醣的一種，對鯉魚 (*Cyprinus carpio*)、青魷、斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 授予這種多醣可增強對細菌性疾病的抵抗力 (Robertson *et al.*, 1990; Yano *et al.*, 1991; Matsuyama *et al.*, 1992; Jeney and Anderson, 1993; Itami *et al.*, 1994)。本中心經多年來之試驗已證實，口投自 *Schizophyllum commune* 萃取之多醣 (β -1,3-1,6-glucan) 可增強草蝦 (*Penaeus monodon*) 與草蝦苗對發光弧菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) 與白點桿狀病毒 (WSSV) 感染的抵抗力 (蘇等, 1995; 張等, 1996, 2002; Liao *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1999, 2003)。目前箱網養殖之海鱷常受到細菌性病原菌如發光菌與鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 等之感染，損失嚴重。本研究擬利用多醣，針對海鱷進行一系列基礎免疫功能探討與強化免疫能力的研究，以期能增強抵抗細菌感染之能力。首先將探討口投多醣後，海鱷對細菌之抵抗能力變化情形，以找出可行之初步添加量，作為更進一步之生長、養殖活存及魚體內之免疫殺菌物質等研究之基礎資料。

材料與方法

一、飼料之配製

本試驗之多醣萃取自 *Schizophyllum commune*，為日本台糖株式會社產品。依據本中心自行研發調配之海鱷基礎飼料配方作為對照組飼料。另外，以同樣配方，添加 0.1、0.2、0.4、0.8 與 1.6% 等不同劑量多醣，製成粒狀飼料，做為試驗一之試驗組飼料。再以相同配方，添加含多醣 0.5、1.0 與 2.0% 等不同劑量多醣，製成粒狀飼料，

做為試驗二之試驗組飼料。

二、成長試驗

試驗魚係本組自行人工繁殖者，選取平均體重 1.5 ~ 7.8 g 之海鱷苗進行成長試驗。將海鱷分為四組各三重覆，投飼添加含不同劑量多醣 0.5、1.0 與 2.0% 及對照等四組人工飼料 15 週。試驗魚分別飼養於 0.5 ton 長方形玻璃纖維桶中，內含 360 L 石英砂過濾海水，採用流水式並加上打氣，流水量為 150 L/hr，水溫為 27 ~ 28 °C，鹽度為 28 ~ 30 psu。試驗期間一天觀察二次，每日依其活動與攝餌情形調整，投餌量為魚體重之 3 ~ 5%，每三週秤重一次。

三、細菌株之活化

菌株 (發光菌與鏈球菌)，由屏東縣家畜疾病防治所魚病室提供。取回後，分別以 BHI (Brain Heart Broth) + 1% NaCl，在 28 °C 培養 24 ~ 48 hr，使之活化。經注射菌液入健康魚體內，在該魚剛死亡時立即由其肝、脾與腎臟，分離出菌株。再經反覆培養、感染數次，使菌株之毒性增強後，進行各項感染試驗。

四、菌液之配製與攻毒菌量預備試驗

由於國內並無純種培養海鱷之標準試驗用魚，而且種魚之交配均採多尾多對方式，自由產卵與受精，因此試驗魚苗之品質常會因來源地點、季節、氣候與種魚健康情形而受影響。因此除謹慎篩選試驗魚苗外，每批試驗魚在正式攻毒試驗前均需先進行攻毒菌量之預備試驗。預備試驗時，菌株由 BHI + 1% NaCl 轉接至 BHIA (BHI + 10% Agar) + 1% NaCl 培養 24 hr 後，以白金耳取出大量菌落，用已滅菌之生理食鹽水調配成 $OD_{540}=1$ 之細菌濃度 (菌量約 6.5×10^9 CFU/ml)，再以滅菌生理食鹽水稀釋 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 與 10^6 等不同濃度，而以生理食鹽水作為空白組。注射 0.1 ml/fish 未經試驗之同批海鱷苗各 10 尾，每濃度三重覆試驗，並配合平板生菌計數法，計算各濃度之生菌數，求出 LD_{50} 之菌量，作為正式感染試驗之依據。

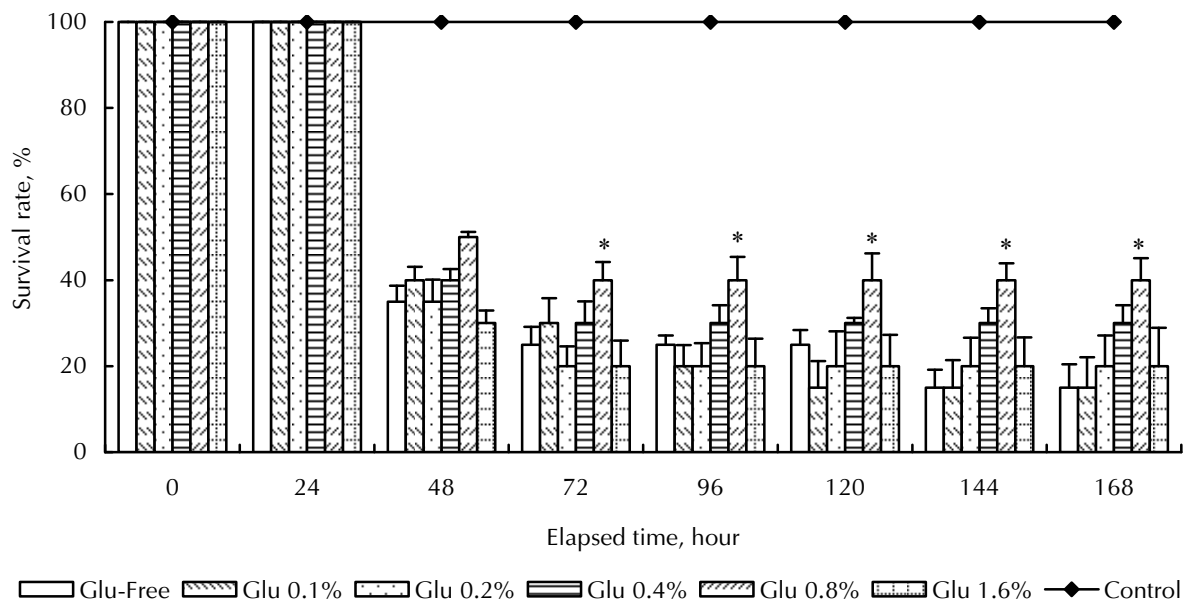


Fig. 1 Survival rate of cobia (136 ± 6.7 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (3.7×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration of diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 10 days. * $p < 0.01$.

海鱸對蓄養水質要求較高，因此注射後每組魚均蓄養在 0.5 ton 長方形玻璃纖維桶中，內含 200 L 石英砂過濾海水。採用流水式並加上打氣，流量為 100 L/hr，一天觀察二次，每日依其活動與攝餌情形調整投餌量。共觀察10天內之死亡率，記錄試驗魚之活動與攝餌情形。若有試驗魚死亡，分別取出肝、脾與腎臟做細菌分離培養與 API 20E (BioMerieux, France) 細菌鑑定，以確定是否為注射之病原菌所引起之感染而死亡。

五、細菌感染攻毒試驗

將供試海鱸，隨機分為六組，每組三重覆，放入18個水容積 1 ton 的長方形玻璃纖維桶中，每桶 120 尾。六組海鱸分別餵飼，對照及含不同濃度之多醣飼料，在第10、20、30與40天時，各進行一次攻毒試驗。每次攻毒試驗時，18個桶分別隨機採取 30 尾魚，進行腹腔注射。其中 20 尾注射同一濃度之菌液 0.1 ml 為感染組，另外 10 尾作為空白監控組，注射生理食鹽水 0.1 ml。注射後，以手指輕按注射部位，防止菌液流出。注射後之海鱸，各組分別放入 0.5 ton 的長方形玻璃纖維桶中，內含 360 L 經石英砂過濾之海水。採用流水式並加上打氣，流量為 150 L/hr，每隔 8 ~ 12 hr

觀察一次，每日依其活動與攝餌情形調整投餌量，並更換部份飼育水。當海鱸死亡時，立即取出肝、脾與腎臟，先經 70% 酒精浸洗一分鐘，剪碎後塗抹於培養基上，分離培養及細菌鑑定，來分離判斷是否為原來注射之菌株。觀察 8 ~ 10 天後，將未死亡及空白組之海鱸，隨機取二至三尾魚，也分別取出肝、脾與腎臟做細菌培養，確定原先注射之細菌是否仍存在魚體內，以判斷活存魚體之健康情況。

六、統計分析方法

各試驗結果，均以 SAS 套裝軟體(1993)，作變異數(ANOVA)與特奇氏公正顯著差異法(Tukey's honest significant difference HSD)等統計分析方法，測試全部處理組及各組間是否有顯著差異。

結 果

一、試驗一

海鱸餵食含多醣0、0.1、0.2、0.4、0.8與1.6%等五組飼料各10、20、30與40天後，分別以發光菌進行人工感染。第10天攻毒試驗結果 (Fig. 1)，

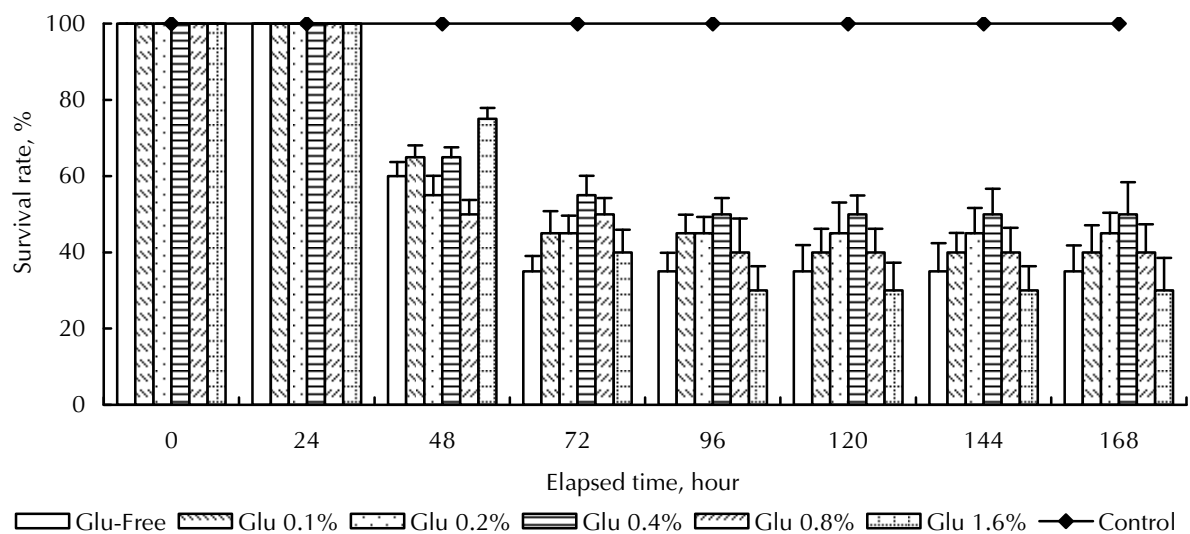


Fig. 2 Survival rate of cobia (136 ± 6.7 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (2.6×10^6 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 20 days.

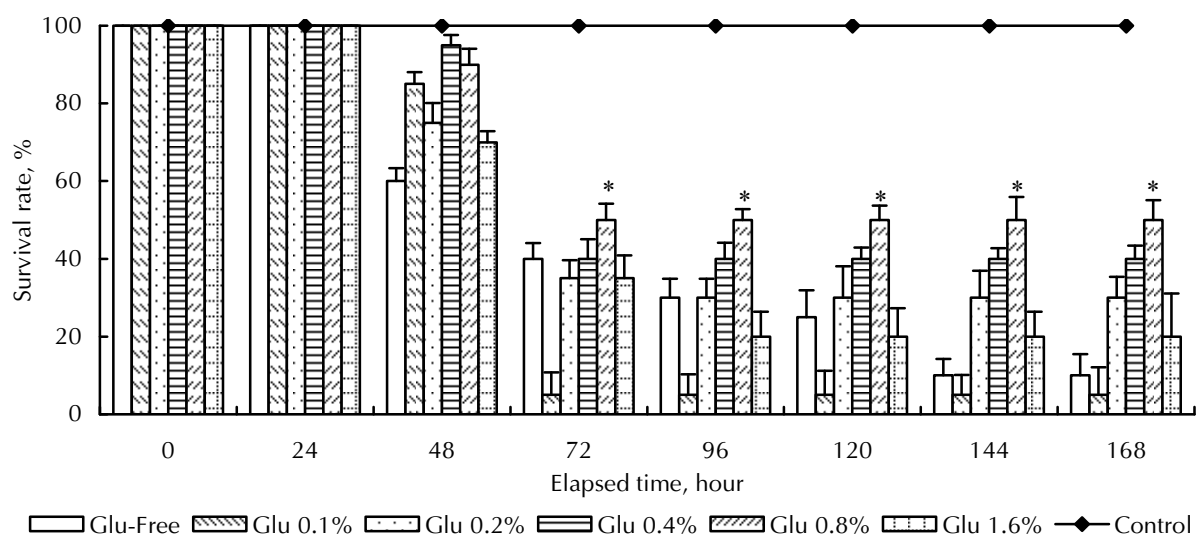


Fig. 3 Survival rate of cobia (136 ± 6.7 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (3.7×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 30 days. * $p < 0.01$.

以飼食含多醣0.4與0.8% 組活存率較高。第20天攻毒試驗結果 (Fig. 2)，雖然以飼食含多醣 0.4% 組活存率高達50%，但各組間並無顯著差異。第30天攻毒試驗結果如 Fig. 3，以飼食含多醣 0.4 與 0.8% 組活存率較其他組高 ($p < 0.01$)。而第40天之結果如 Fig. 4，以飼食含多醣1.6% 組活存率 20% 為最低，其餘各組間並無顯著差異。四次攻毒試驗時，六組之空白監控組，均無試驗魚死亡。

二、試驗二

(一) 成長試驗

由試驗一之結果，將多醣之添加量改變為 0、0.5、1.0 與 2.0% 等四組飼料飼食海鱺。經飼食四組飼料15週後，結果如 Fig. 5 所示。各組之成長與活存率均無顯著差異存在 ($p > 0.05$)，顯示多醣之添加，並不會影響海鱺之成長。由本成長試

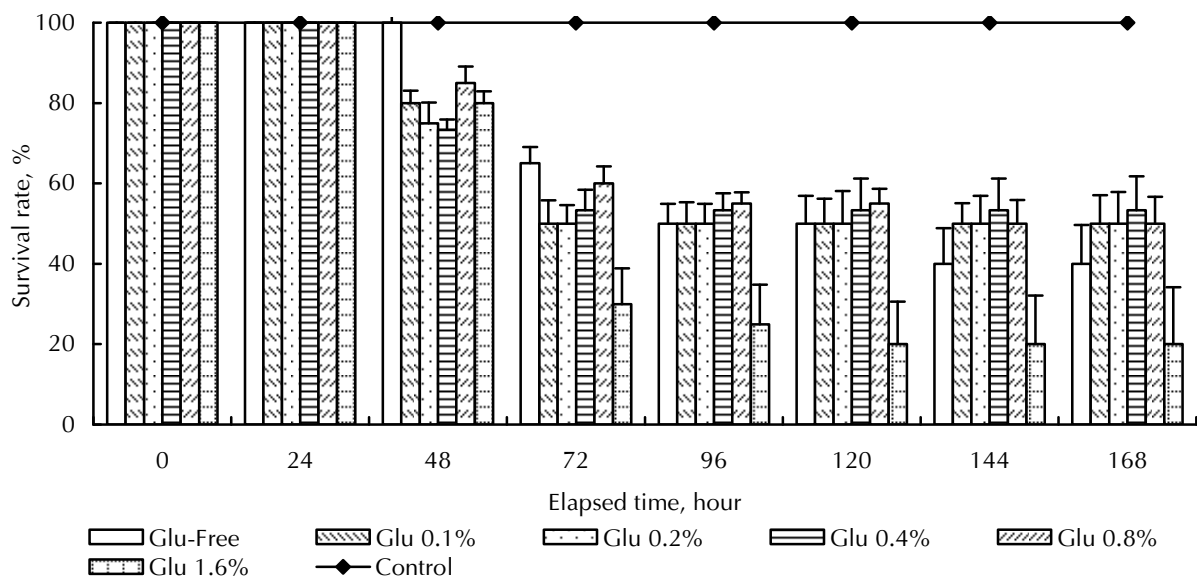


Fig. 4 Survival rate of cobia (136 ± 6.7 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (2.6×10^6 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 40 days.

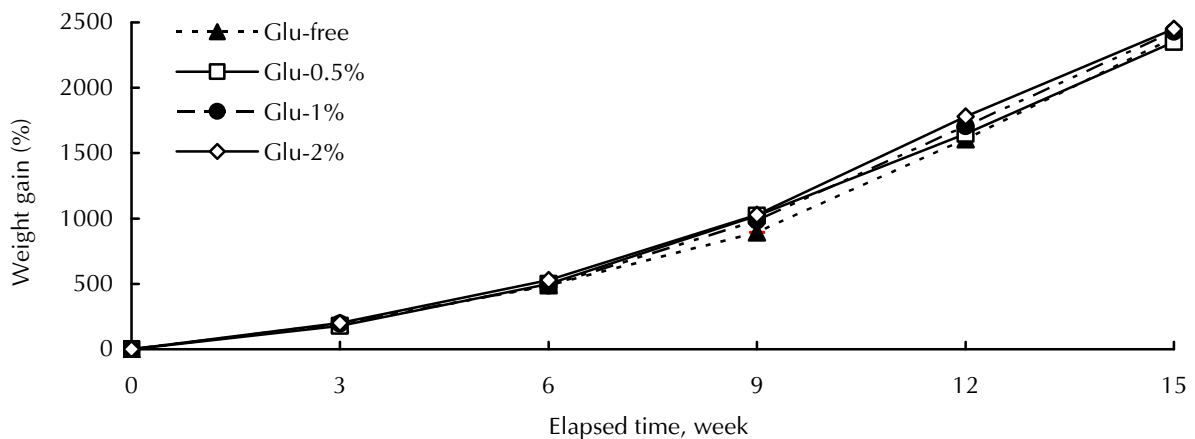


Fig. 5 Weight gain of the cobia after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 15 weeks.

驗之初步結果可知，長時間連續餵飼含多醣飼料，對於海鱺之生長並無不良影響，因此可再進一步試驗，嘗試作為一種免疫賦活添加劑，以增強海鱺之免疫能力，減少因疾病所造成之損失。

(二) 感染試驗

1. 發光菌

由試驗一之結果，將多醣之添加量改變為 0、0.5、1.0 與 2.0% 等四組飼料餵食海鱺 10、

20與30天後，分別以發光菌進行腹腔注射感染。第10天攻毒試驗結果如 Fig. 6，以餵食含多醣0.5與1.0% 組存活率較高 ($p < 0.01$)。而第20與30天攻毒試驗之結果 (Figs. 7, 8)，也以餵食含多醣0.5% 組存活率45% 與 40% 均較其他組高 ($p < 0.01$)。三次攻毒試驗時，四組之空白監控組，均無試驗魚死亡。

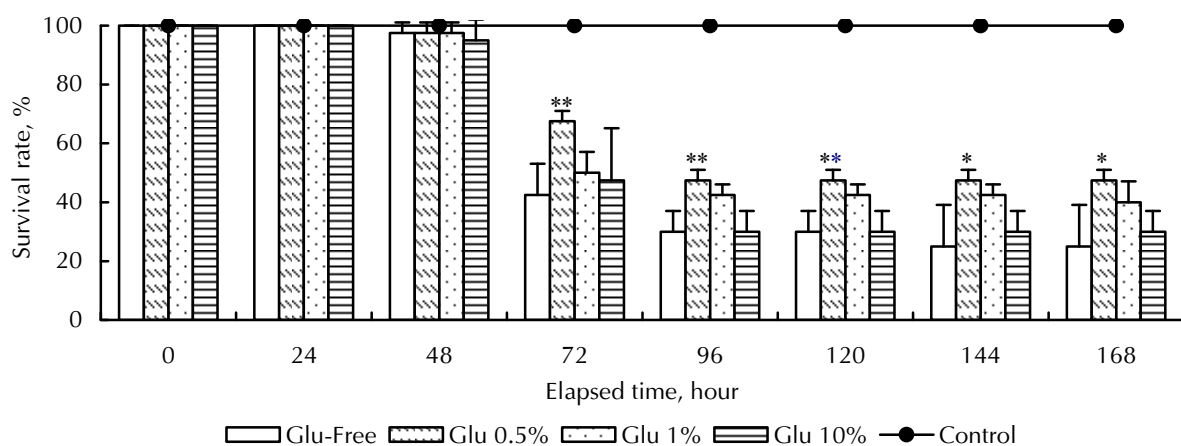


Fig. 6 Survival rate of cobia (147 ± 8.2 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (1×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3,6-glucan (Glu) for 10 days. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

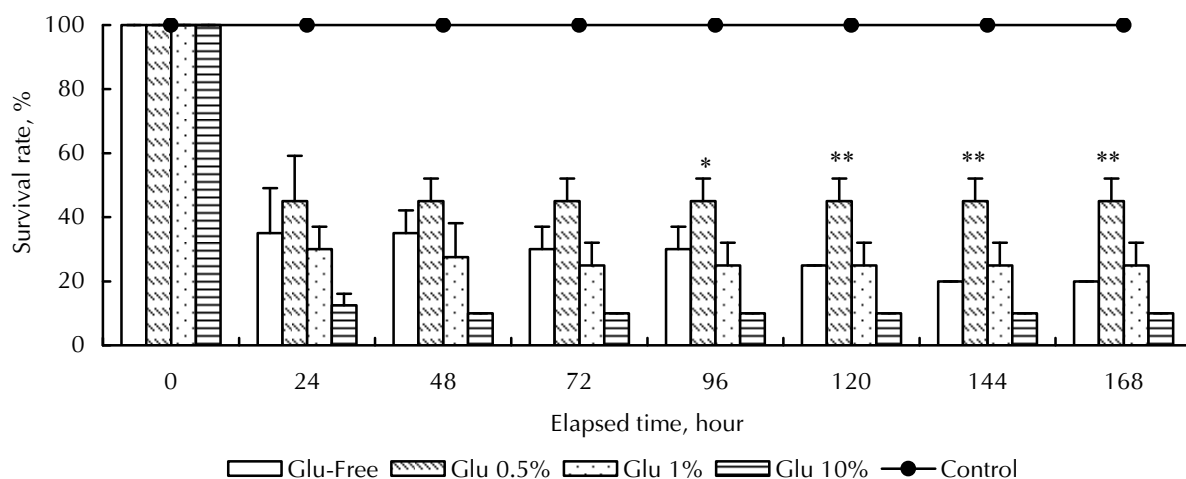


Fig. 7 Survival rate of cobia (147 ± 8.2 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (6.8×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3,6-glucan (Glu) for 20 days. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

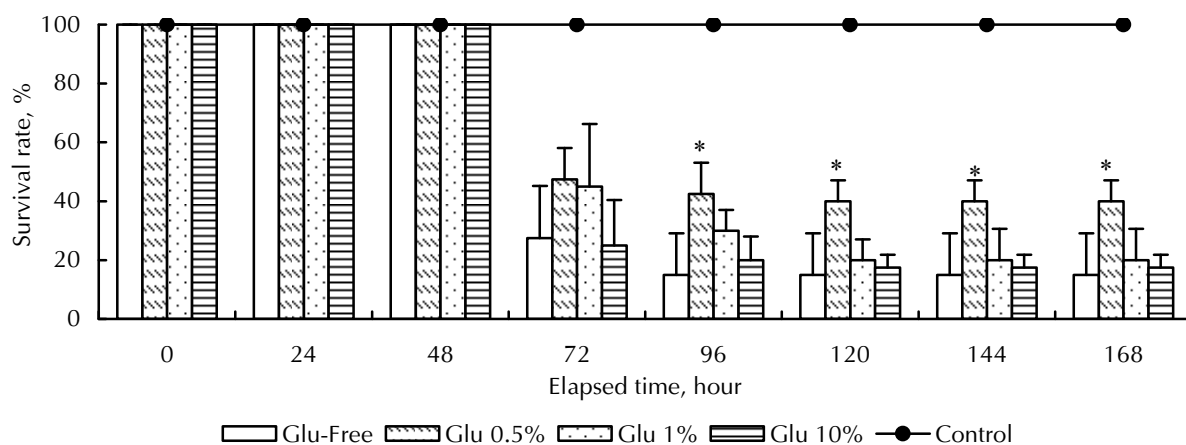


Fig. 8 Survival rate of cobia (147 ± 8.2 g) challenged with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (3.4×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3,6-glucan (Glu) for 30 days. * $p < 0.01$.

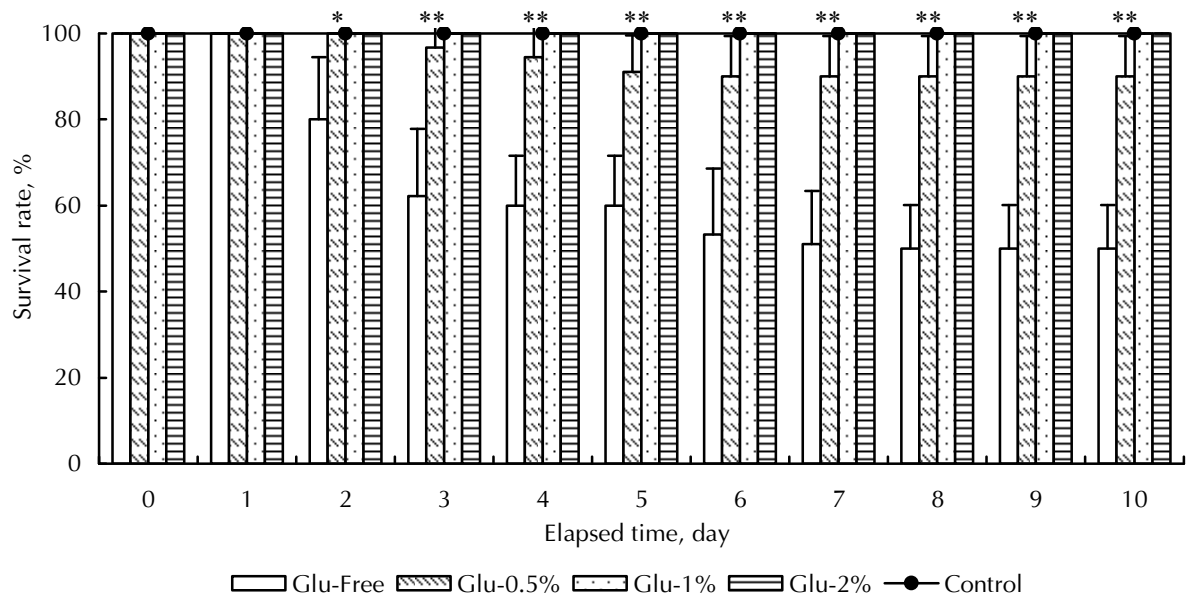


Fig. 9 Survival rate of cobia (57 ± 2.1 g) challenged with *Streptococcus iniae* (8.8×10^2 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 10 days. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

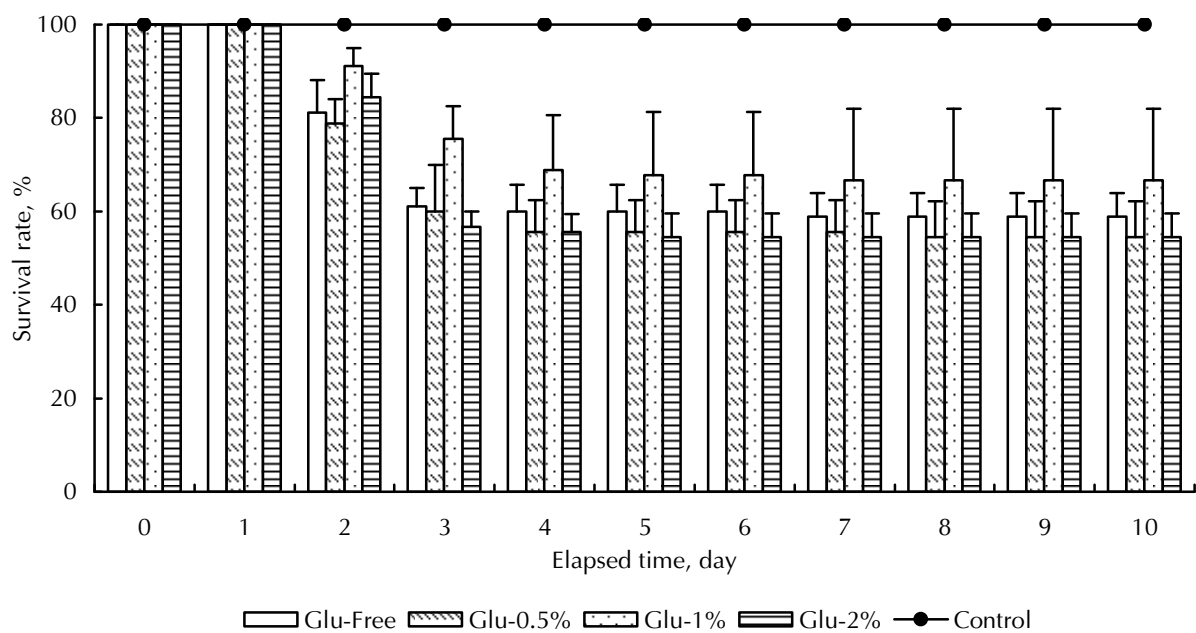


Fig. 10 Survival rate of cobia (57 ± 2.1 g) challenged with *Streptococcus iniae* (1.8×10^3 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 20 days.

2. 鏈球菌

海鱺飼食含多醣0、0.5、1.0與2.0% 等四組飼料各10、20與30天後，分別以鏈球菌 ($10^5 \sim 10^6$ CFU/ml) 進行腹腔注射感染。第10天攻毒試驗結果 (Fig. 9)，以飼食含多醣組活存率較高($p < 0.01$)。第20天攻毒試驗結果 (Fig. 10)，雖然以飼食含多醣組活存率較高，但各組間並無顯著差

異。第30天攻毒試驗之結果，添加組與未添加組之活存率也無顯著差異。

另外，再以較高菌量 (10^8 CFU/ml) 之鏈球菌進行人工感染。第10天攻毒試驗結果 (Fig. 11)，亦以飼食含多醣組活存率較高。第20天攻毒試驗結果 (Fig. 12)，雖然以飼食含多醣組活存率較高，但各組間並無顯著差異。第30天攻毒試驗結

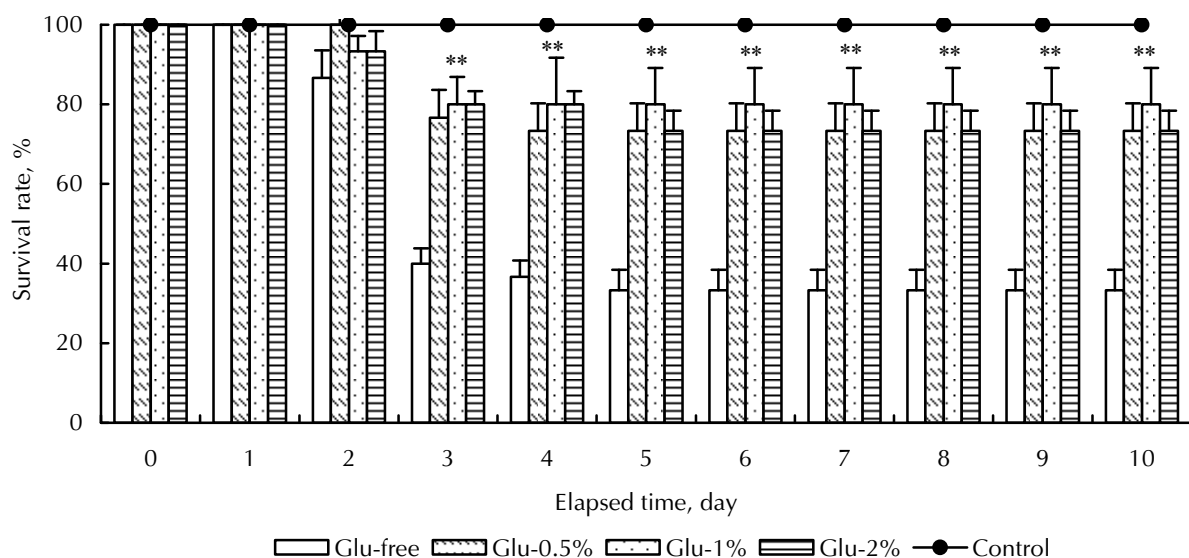


Fig. 11 Survival rate of cobia (68 ± 2.5 g) challenged with *Streptococcus iniae* (7.4×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 10 days. ** $p < 0.001$.

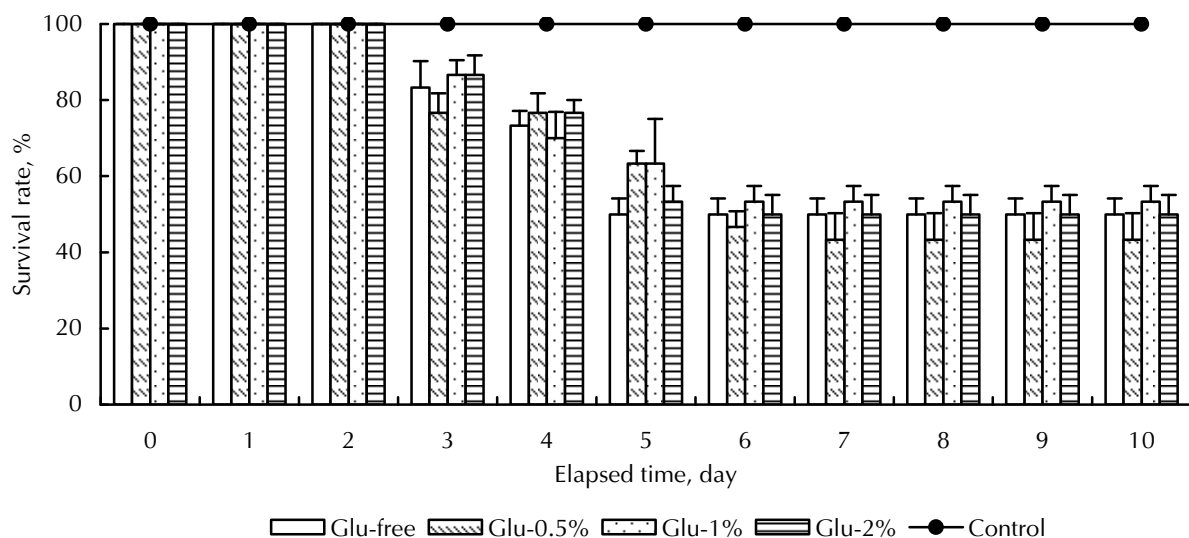


Fig. 12 Survival rate of cobia (68 ± 2.5 g) challenged with *Streptococcus iniae* (1.5×10^5 CFU/g fish weight) after oral administration diets containing graded levels of β -1,3-1,6-glucan (Glu) for 20 days.

果，添加組與未添加組之活存率也無顯著差異。二次不同鏈球菌量分別經三次不同天數之攻毒試驗中全部之空白監控組，均無試驗魚死亡。

感染試驗期間死亡之試驗魚，均進行解剖與細菌培養檢查，內臟器官都可培養出大量之菌株，且受發光菌感染後之肝臟與腎臟等器官具有白色結節的特徵。而受鏈球菌感染後之試驗魚之眼球會出現腫脹與白化的現象。而感染後未死亡

之魚，就無此現象。由此二試驗結果可知添加多醣 0.5%，餵食 10 天，即可增強海鱺抵抗發光菌及鏈球菌之感染。

討 論

細菌性疾病是野生及養殖魚類的主要致死原因之一，目前至少已有 25 屬的細菌被證實會引起

魚類疾病，所以細菌性疾病在魚類病例中可謂佔有相當的重要性 (張, 2001)。由於水生生物生存的水環境中原本就存在著相當多種不同的細菌，很多細菌長存於水中，扮演著伺機性病原的角色，尤其是在目前集約式養殖環境下，會引起魚類感染的病原微生物包括寄生蟲、細菌、黴菌與病毒等，常因擁擠、搬運、水溫變化過劇或水質等緊迫因子而爆發各種疾病，因此多數學者認為緊迫會使魚體免疫系統功能下降而增加罹病的機會 (Song and Kuo, 1981; Secombes and Fletcher, 1992; Suzuki and Iida, 1992)。本研究中之攻毒試驗是採用注射方式，對海鱸是一大緊迫因子，又因魚體健康狀況，每批試驗魚有所差異，常會影響試驗結果，因此在本研究進行每一次攻毒試驗前，均事先拿同批健康試驗魚做過預備試驗，以求出正確 LD_{50} 之菌量，作為正式攻毒試驗之依據。另外，再由注射生理食鹽水之空白監控組來監測魚體健康狀況，並由試驗死亡魚體中分離並確認致病菌株，以增加試驗之可信度。

Matsuyama *et al.* (1992) 在進行青魮鰻攻毒試驗時使用之鏈球菌及發光菌攻擊菌量分別為：鏈球菌 $2 \sim 3 \times 10^5$ CFU/g fish weight；發光菌 $4 \sim 5 \times 10^4$ CFU/g fish weight。另外，彭 (2005) 在進行海鱸攻毒試驗時使用之鏈球菌攻擊菌量則為 $1 \sim 3 \times 10^6$ CFU/g fish weight。而本研究之攻擊菌量，發光菌分別為 $3.7 \times 10^{5-6}$ 與 $1.0 \sim 6.8 \times 10^5$ CFU/g fish weight；鏈球菌分別為 $8.8 \sim 1.8 \times 10^{2-3}$ 與 $1.5 \sim 7.4 \times 10^5$ CFU/g fish weight。攻擊菌量不同，主要原因是試驗魚種、魚隻大小、試驗魚來源及試驗養殖環境之不同，而有所差異。因此需在每一次單獨試驗前進行預備試驗，以正確找出該次試驗攻擊之 LD_{50} 菌量。唯，以 $OD_{540} = 1$ 之細菌濃度調配攻擊菌量時，常會有些微誤差，以致於攻毒之菌量稍高或稍低，就會影響試驗結果，因此在本試驗中之試驗一，除了要得知多醣可添加之濃度外，同時也進行 $OD_{540} = 1$ 時之正負 0.05 內攻擊菌量誤差觀察，若攻擊菌量稍高則會壓抑多醣的效果，這可由試驗一之餵食多醣 20 與 40 天後感染效果可知。因此試驗二攻擊菌量均調在 10^5 CFU/g fish weight。另外，攻毒後試驗魚之蓄養環境對於試驗魚之活存相當重要。尤其是海鱸對於水質條件的要求較高，故在本研究中攻毒後試驗

魚之蓄養，採用較高流量之流水式並加上打氣，以降低因環境水質因子的干擾，增加試驗之準確性。

郭 (1972) 利用 *Aeromonas liquefaciens* 菌接種於泥鰱與鰻魚，發現此菌株之病原體經數次通過魚體後，其病原性會由弱轉強，並指出其原因可能是與細菌內毒素之產生有關。許多研究報告也指出鏈球菌之外毒素，對哺乳類及魚類的毒性有所不同，其致病率也不同 (Duran-Reynals, 1942; Ginsburg, 1972; Hynes and Tagg, 1985; Kamezawa *et al.*, 1989; Kawahara *et al.*, 1989; Gerlach *et al.*, 1996)。Kusuda and Kawai (1982) 萃取鏈球菌菌體內毒素和菌體外毒素做毒性試驗，發現菌體內毒素比菌體外毒素有更強的毒性。另外，Kimura and Kusuda (1979, 1982) 試驗鏈球菌對青魮鰻的致病研究發現，單獨注射鏈球菌外毒素，雖不會引起魚之死亡，卻會引起凸眼、體色變黑和體表出血等臨床症狀。但若先注射鏈球菌所分泌的外毒素，再接種鏈球菌，則會引發臨床症狀及死亡。顯示外毒素可以降低魚體抵抗鏈球菌的能力，有利於細菌在魚體內的增殖。此外，弱毒株也會因事先注射外毒素而提高致病力。因為細菌在培養過程中，會逐漸喪失毒性而轉變成弱毒株。因此本研究攻毒試驗進行前，均需事先將細菌注射進入魚體，在該魚剛死亡時立即由其肝與腎臟，分離出菌株。再經反覆培養與感染數次，使菌株之毒性增強後，立即保存於菌保 (Microbank, Pro-Lab, Canada) 中，再進行各項感染試驗。

許多報告指出免疫刺激物並不會影響成長，虹鱔 (*Oncorhynchus mykiss*) 餵食 pepetidoglucan 60 天後，成長並無差別 (Matsuo and Mijazano, 1993)。草蝦稚蝦連續餵飼含多醣飼料 18 週，對生長並無不良影響 (張, 2000)。由本研究成長試驗之結果可知，長時間連續餵飼含多醣飼料，對於海鱸之生長並無不良影響。因此可作為一種免疫刺激添加物，以增強海鱸之免疫能力，減少因疾病所造成之損失。另外，陳 (2001) 指出多數的免疫刺激物，主要藉由刺激魚類的非特異性免疫系統，提升對病原的抵抗能力。魚類並沒有特異性免疫的記憶特性，因此反應持續時間也較短，所以免疫刺激物的使用時間、使用方法及使用劑量的不同，會影響魚類等之抗病效力。虹鱔口投

pepetidoglucan 56 天的抗病菌能力比 28 天的效果差；河鯰 (*Clarias gariepinus*) 投餵葡聚醣 (β -1,6-linked glucan) 和寡醣類 (oligosaccharide) 45 天，巨噬細胞的毒殺能力較投餵 30 天的效果亦降低許多 (Matsuo and Mijazano, 1993; Yoshida et al., 1995)。過度刺激，免疫反應的效果反而下降，原因可能與其免疫系統之負回饋控制 (negative feedback control) 有關。此外，Kitao et al. (1987)、Kajita et al. (1990) 與 Robertsen et al. (1994) 之研究，Levamisole、FK-565 及葡聚醣作為鮭魚與虹鱒的免疫刺激物時發現，反應與劑量並非呈直線正相關，高劑量不但不能促進，反而會抑制免疫反應。這些報告與本研究在飼料中添加高劑量之多醣組 (1.6 與 2.0%) 或連續口投超過 20 天以上，對於發光菌與鏈球菌之抵抗能力，並不會高於其他劑量組 (0.4, 0.5 與 0.8%) 或連續口投 10 天的結果相似。另外，Matsuyama et al. (1992) 研究，指出多醣類 (β -1,3-glucan) 腹腔注射 (2 ~ 10 mg/kg) 青鮎鰱 3 ~ 6 天，即可增強青鮎鰱之非特異性免疫，提升對鏈球菌之抵抗能力，但對於發光菌卻未能增強其抵抗能力。從本研究的結果來看，使用多醣 0.5%，餵食 10 天以上，能增強海鱷抵抗發光菌及鏈球菌之感染，但以抵抗鏈球菌的效果較明顯。除與細菌本身之特性與毒性外，是否與多醣使用方式、時間及劑量有關，則有待進一步研究。

本研究使用之多醣，部份成分為水溶性多醣 (Schizophyllan)，部份成分為非水溶性多醣 (小島健正，私人連繫資料，1995)。根據過去的研究報告證實 Schizophyllan 可增強鮭魚 (Niki et al., 1991)、鯉魚 (Yano et al., 1989, 1991)、青鮎鰱 (Matsuyama et al., 1992)、斑節蝦 (Itami et al., 1994)、草蝦 (Liao et al., 1996; Chang et al., 1999, 2003) 等種類的非專一性免疫反應，並進而可強化彼等之抵抗病原菌之能力。還有研究報告指出，使用免疫賦活劑添加在飼料中，能增強大西洋鮭魚 (*Salmon salar*) 與虹鱒等魚之頭腎細胞吞噬細菌的能力，並活化補體的替代路徑及溶菌酶的活性，來對抗細菌性疾病 (Robertson et al., 1990; Jeney and Anderson, 1993; Rice et al., 2005)。因此，了解免疫賦活劑在使用上的效力及限制原因，應是增強魚類在養殖期間抵抗病原侵襲的一

項利器。由本研究可知適時適量的使用此類多醣可有效增強海鱷抵抗發光菌及鏈球菌的感染，應可利用添加於海鱷飼料中來提高箱網養殖期間之抗病力與存活率。但在使用上之添加時間、方法及劑量，則需配合海鱷魚體內之免疫酵素的反應，此有待做更進一步的研究。

謝 辭

本研究係在行政院國家科學委員會補助之專題研究計畫 (NSC 90-2313-B-056A-001) 項下完成，謹此誌之。

參考文獻

- 郭光雄 (1972) 魚類病原 *Aeromonas liquefaciens* 之研究-II-注射魚體後產生之病原性變化. 台灣水產學會刊, 2(2): 16-19.
- 陳悠里 (2001) 幾丁聚糖和其衍生物對馬拉巴石斑魚免疫能力的影響. 國立中山大學海洋研究所碩士論文, 2-3.
- 彭增發 (2005) 海鱷鏈球菌感染症之研究. 國立屏東科技大學獸醫學系碩士論文, 18-19.
- 張正芳 (2000) 多醣類應用於強化草蝦抗弧菌與病毒之研究. 國立中山大學海洋研究所 博士論文, 1-2.
- 張鴻猷 (2001) 水產動物疾病: 細菌篇, 黴菌篇. 雲林縣家畜疾病防治所, 1-2.
- 張正芳, 楊佳宏, 陳紫娛, 蘇茂森 (2002) 多醣類 β -1,3-glucan (from *Schizophyllum commune*) 應用於強化草蝦抵抗白點症病毒之研究. 水產研究, 10(1 & 2): 7-20.
- 張正芳, 蘇茂森, 陳宏遠, 廖一久 (1996) 由 *Schizophyllum commune* 萃取之多醣類 (β -1,3-glucan) 與多聚磷酸態維生素 C (polyphosphorylated L-ascorbic acid) 對強化草蝦抵抗弧菌與受傷組織復原能力之研究. 水產研究, 4(1): 43-54.
- 蘇茂森, 劉冠甫, 張正芳, 廖一久 (1995) 由 *Schizophyllum commune* 萃取之 β -1,3-glucan 應用於強化草蝦活力之研究. 水產研究, 3(2): 125-132.
- Ainsworth, A., C. Dexiang and P. R. Waterstrat (1991) Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. J. Aquat Animal Health., 3: 41-47.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, C. F. Lo, G. H. Kou and I. C. Liao (1999) Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot

- syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org., 36: 163-168.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen and I. C. Liao (2003) Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunol., 15: 297-310.
- Duran-Reynals, F. (1942) Tissue permeability and spreading factors in infection. Bacteriol. Rev., 6: 197-252.
- Edagawa, T. M., M. Hattori, M. Onuma and H. Kodamat (1993) Cell surface C-reactive protein of rainbow trout lymphocytes. Dev. Comp. Immunol., 17: 119-127.
- Gerlach, D., J. H. Ozegowski, E. Gunther, S. Vettermann and W. Kohler (1996) Purification and some properties of streptococcal NAD-glycohydrolase. FEMS Microbiol. Lett., 36: 71-78.
- Ginsburg, I. (1972) Mechanisms of cell and tissue injury induced by group A streptococci: relation to poststreptococcal sequelae. J. Infect. Dis., 126: 419-456.
- Hynes, W. L. and J. R. Tagg (1985) A simple plate assay for detection of group A *Streptococcus* proteinase. J. Microbiol. Methods, 4: 25-31.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). In The Third Asian Fisheries Forum (L. M. Chou et al., eds.), Asian Fisheries Society, Manila, Philippine, 375-378.
- Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 116: 315-329.
- Kajita, Y., M. Sakai, S. Atsuta, and M. Kobayashi (1990) The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol., 25: 93-98.
- Kamezawa, Y. and T. Nakahara (1989) Purification and characterization of streptococcal erythrogenic toxin type A produced by *Streptococcus pyogenes* strain NY-5 culture in the synthetic medium NCTC-135. Microbiol. Immunol., 33: 183-194.
- Kawahara, E., H. Sako, S. Nomura and R. Kusuda (1989) Hemolysin production by betahemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Fish Pathol., 24: 219-223.
- Kimura, H. and R. Kusuda (1979) Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails (*Seriola* spp): Effect of the cell free culture on experimental streptococcal infection. J. Fish Dis., 2: 501-510.
- Kimura, H. and R. Kusuda (1982) Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails (*Seriola* spp): Effect of crude exotoxin fractions from cell-free culture on experimental streptococcal infection. J. Fish Dis., 5: 471-478.
- Kitao, T., T. Yoshida, D. P. Anderson, O. W. Dixon and A. Blanch (1987) Immunostimulation of antibody-producing-ducing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. J. Fish Biol., 31: 87-91.
- Kusuda, R., and K. Kawai (1982) Characteristics of *Streptococcus* sp. pathogenic to yellowtail. Fish Pathol., 17: 11-16.
- Liao, I. C., M. S. Su, C. F. Chang, B. Y. Her and T. Kojima (1996) Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by oral administration of β -1,3-glucan from *Schizophyllum commune*. J. Fish. Soc. Taiwan, 23(2): 109-116.
- Matsuo, K. and I. Mijazano (1993) The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi, 59: 1377-1379.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture, 101: 197-203.
- Nikl, L., L. J. Albright and T. P. T. Evelyn (1991) Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aquat. Org., 12: 7-12.
- Rice, P. J., E. L. Adams, T. Ozment-Skelton, A. J. Gonzalez, M. P. Goldman, B. E. Lockhart, L. A. Barker, K. F. Breuel, W. K. Deponti, J. H. Kalbfleisch, H. E. G. D. Brown, S. Gordon and D. L. Williams (2005) Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. J. Pharmacol. Exp. Ther., 314(3): 1079-86.
- Robertsen, B., G. Rorstad, R. Engstad and J. Raa (1990) Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmon salar* L., by a glucan from *Saccaromyces cerevisiae* cell walls. J. Fish Dis., 13:

- 391-400.
- Robertsen, B., G. Rorstad and J. B. Jorgensen (1994) β -glucan as immunostimulants in fish. *Modulators of Fish Immune Response 1* (J. S. Stolen and T. C. Fletcher, eds.), SOS Publications, Fair Haven, NJ, 83-99.
- Secombes, C. J. and T. C. Fletcher (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Rev. Fish Dis.*, 2: 53-71.
- Song, Y. L. and G. H. Kuo (1981) Immune response of eels (*Anguilla japonica*) against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella angillimortiferum* (*E. tarda*) infection. In *Proceedings of Science Seminar on Fish Diseases* (G. H. Kuo, J. L. Fryer and M. L. Landolt, eds.), National Science Council, Taipei, Taiwan, 107-114.
- Stoskopf, M. K. (1993) Immunology. *Fish Medicine* (M. K. Stoskopf, ed.), Latest Ed., WB Saunders Co, Philadelphia, 149-159.
- Suzuki, Y. and T. Iida (1992) Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Rev. Fish Dis.*, 2: 149-160.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection by some β -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1815-1819.
- Yano, T., H. Matsuyama and R. E. P. Mangindaan (1991) Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14: 577-582.
- Yoshida, T., R. Kruger and V. Inglis (1995) Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, 18: 195-198.

Application of Dietary β -1,3-1,6-glucan in Enhancing Resistance of Cobia (*Rachycentron canadum*) against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* Infections

Cheng-Fang Chang^{*}, Jia-Horng Yang, Su-Lean Chang, Ruey-Ling Chou,
Bih-Yueh Her, Chia-Hui Hsu and Tzyy-Ing Chen

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

This study evaluated the optimal concentration of the dietary incorporation of β -1,3-1,6-glucan (Glu) from *Schizophyllum commune* for enhancing the resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* infections in cobia (*Rachycentron canadum*). In experiment 1, fish were fed diets containing graded levels (0%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.8%, and 1.6%) of supplemental Glu for 10, 20, 30, and 40 days. Following these dietary treatments, the fish were challenged by an intraperitoneal injection of a *P. damsela* subsp. *piscicida* solution. The results showed that cobia fed the diet containing 0.4%, 0.8%, and 1.6% Glu showed a significantly ($p < 0.01$) enhanced resistance against *P. damsela* subsp. *piscicida*. In experiment 2, the weight gain and survival of cobia did not significantly differ ($p > 0.05$) after being fed the diets containing 0%, 0.5%, 1.0%, and 2.0% Glu for 15 weeks. The challenge tests showed that fish fed the diet containing 0.5% Glu for 10, 20, and 30 days showed significantly ($p < 0.01$) enhanced resistance against *P. damsela* subsp. *piscicida*. On the other hand, cobia fed the diet containing 0.5% Glu for 10 days showed significantly ($p < 0.001$) enhanced resistance against *S. iniae*. Results obtained from the two experiments strongly demonstrated that oral administration of 0.5% Glu for 10 days enhanced the resistance of cobia against *P. damsela* subsp. *piscicida* and *S. iniae* infections.

Key words: Cobia (*Rachycentron canadum*), β -1,3-1,6-glucan, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Streptococcus iniae*, survival rate

^{*}Correspondence: Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute, Tungkang, Pingtung 928, Taiwan. TEL: (08) 832-4121 ext. 272; FAX: (08) 832-0234; E-mail: changch@ms3.hinet.net