

文章编号: 1004-7271(2006)02-0243-04

·研究简报·

壳聚糖对异育银鲫生长及抗菌能力的影响

陈云波^{1,2}, 华雪铭¹, 周洪琪¹, 沈士林³, 徐忠³, 张旭日⁴, 陆汉斌³

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 皖西学院生物系, 安徽六安 237012;

3. 上海崇明县水产良种场, 上海 202151; 4. 上海崇明县农委, 上海 202150)

摘要:在基础饲料中分别添加 0.0% (对照组)、0.3%、0.5%、1.0%、2.0% 壳聚糖, 饲喂异育银鲫 (体重 46.20 ± 3.56 g) 二个月, 测定鱼的生长与成活, 进行嗜水气单胞菌的感染试验, 并计算半致死量 LD_{50} 。结果表明, 不同浓度的壳聚糖均能极显著地提高鱼的增重, 其中 0.5% 壳聚糖组增重率比对照组提高 33.90% ($P < 0.01$)。壳聚糖对鱼的成活率无显著影响。0.5%、1% 壳聚糖组的异育银鲫对嗜水气单胞菌的抵抗能力显著高于对照组 ($P < 0.05$)。壳聚糖在异育银鲫饲料的适宜添加量为 0.5%。

关键词:壳聚糖; 异育银鲫; 生长; 抗病菌感染能力

中图分类号: S 963 文献标识码: A

Effect of chitosan on growth and resistance to infection of *Aeromonas hydrophila* of allogynogenetic silver crucian carp

CHEN Yun-bo^{1,2}, HUA Xue-ming¹, ZHOU Hong-qi¹, SHEN Shi-lin³

XU Zhong³, ZHANG Xu-ri⁴, LU Han-bin³

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Biology Department, West Anhui University, Luan 237012, China;

3. Chongming Fisheries Breeding Farm, Shanghai 202151, China;

4. Chongming Committee on Agriculture, Shanghai 202150, China)

Abstract: Allogynogenetic silver crucian carp (body weight 46.20 ± 3.56 g) were fed on the basal diets supplemented with 0.0% (control), 0.3%, 0.5%, 1%, 2% chitosan respectively. After two months of feeding, the growth and survival of tested fish were measured. The experiment of infection of *Aeromonas hydrophila* was carried out to determine LD_{50} . Supplement of different levels of chitosan could significantly promote fish body weight gain ($P < 0.01$). Body weight gain of 0.5% chitosan group was improved about 33.90% higher than that of control. The survival rate was not affected by the supplement of chitosan. The resistance to infection of *Aeromonas hydrophila* of 0.5% and 1% chitosan groups was increased ($P < 0.05$). The supplement of 0.5% chitosan was optimum for the feed of Allogynogenetic silver crucian carp.

Key words: chitosan; allogynogenetic silver crucian carp; growth; resistance to infection

收稿日期: 2004-12-28

基金项目: 上海市科委重点攻关项目(013212101)

作者简介: 陈云波(1964-), 男, 安徽舒城人, 副教授, 主要从事水产动物养殖和营养方面的研究。

通讯作者: 周洪琪, Tel: 021-65710017, E-mail: hqzhou@shfu.edu.cn

壳聚糖是由甲壳素脱乙酰基后生成的直链多糖,鉴于其具有良好的生理活性、生物相容性以及无毒性,近年来国内外对其应用研究十分活跃。壳聚糖作为饲料添加剂对水产动物具有促生长效果^[1-3],通过注射、浸泡或添加到饲料中也能够提高水产动物的抗病、免疫功能^[4-6]。本试验将壳聚糖作为饲料添加剂,饲喂异育银鲫,考察壳聚糖对异育银鲫的生长以及抗菌能力的影响,为壳聚糖在水产饲料中的合理应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

壳聚糖由项目组研制。异育银鲫取自上海市崇明水产良种场,试验鱼平均体重为 46.20 ± 3.56 g,平均体长为 11.24 ± 0.63 cm。

1.2 试验设计

采用单因子梯度法,在基础饲料(表 1)中分别添加 0.3%、0.5%、1.0%、2.0% 的壳聚糖,摄食基础饲料的鱼为对照组,试验组和对照组各设三个平行。

表 1 基础饲料组成
Tab.1 Main composition of the basal diet

饲料原料	%	饲料原料	%
鱼粉	9.90	啤酒酵母	4.90
豆粕	20.80	混合无机盐	0.30
菜子粕	19.80	混合维生素	0.20
次粉	24.80	氯化胆碱	0.50
玉米	17.80	豆油	1.00

1.3 试验饲料

按试验设计分别在基础饲料中添加壳聚糖,用逐级扩大混合的方法将粉状原料混合均匀,然后加工成直径为 2.5 mm 的颗粒,晒干备用。试验饲料的营养成分见表 2。

1.4 饲养管理

在崇明水产良种场内的明珠湖($1\ 500 \times 667$ m²)中放 18 个网箱(5 m × 3 m × 2 m),每个网箱放 100 尾试验鱼。试验鱼驯养 10 天,驯养期间投喂基础饲料。饲养试验自 2002 年的 5 月 10 日至 7 月 9 日,每天投饲二次(8:00,16:00),日投饲量为鱼体重的 5%,并根据水温适当调节。试验期间水温为 17 ℃ - 27 ℃。

表 2 试验饲料组成
Tab.2 Nutrition composition of the test diets

试验饲料	水分	粗蛋白质	脂肪	灰分
对照组	9.87	29.85	4.67	4.32
0.3%壳聚糖	10.67	29.54	4.82	4.37
0.5%壳聚糖	10.10	29.47	4.68	4.23
1%壳聚糖	10.56	29.26	4.63	4.34
2%壳聚糖	10.73	28.89	4.41	4.49

1.5 测定

分别在饲养试验开始及结束前将鱼饥饿一天,试验开始对每个网箱的鱼称总体重,抽样测定鱼的体长,试验结束测定每尾鱼的体长、体重及每个网箱鱼的尾数,计算相对增长率、相对增重率和成活率。

分别从各试验组取鱼 20 尾,进行病原菌感染试验。将每组鱼平均分成 4 组,将嗜水气单胞菌的菌

液(6.0×10^8 CFU \times mL $^{-1}$)按 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 四种稀释度注射,每尾鱼腹腔注射 0.3 mL,从每组中另取 5 尾鱼按相同的剂量注射生理盐水作对照,试验期间水温保持 28 ℃,观察记录 5 天内试验鱼的死亡情况。试验重复一次,参考 Reed-Muench 法^[7]计算半致死剂量(LD₅₀)。

$$\text{相对增重率}(\%) = \frac{\text{试验结束鱼体重} - \text{试验开始鱼体重}}{\text{试验开始鱼体重}} \times 100;$$

$$\text{相对增长率}(\%) = \frac{\text{试验结束鱼体长} - \text{试验开始鱼体长}}{\text{试验开始鱼体长}} \times 100;$$

$$\text{成活率}(\%) = \frac{\text{试验结束鱼的尾数}}{\text{试验开始鱼的尾数}} \times 100; \lg LD_{50} = a \lg b + c;$$

$a = \frac{\text{高于} 50\% \text{死亡率} - 50\%}{\text{高于} 50\% \text{死亡率} - \text{低于} 50\% \text{死亡率}}$; b: 稀释系数,本试验中 = 10^{-1} ; c: 高于 50% 死亡率的最小稀释度的对数。

1.6 数据处理

采用方差分析和多重比较(q 检验)。

2 结果

2.1 异育银鲫的生长

饲料中添加不同浓度的壳聚糖对异育银鲫增重率影响极显著($P < 0.01$, 表 3),其中以 0.5% 壳聚糖组的效果最好。添加不同浓度的壳聚糖对异育银鲫体长增长有显著影响($P < 0.05$)。0.3% 和 0.5% 壳聚糖组鱼的增长率显著高于对照组。

表 3 异育银鲫的生长
Tab.3 Growth of allogynogenetic crucian carp

组别	初重(g)	终重(g)	相对增重率(%)	初长(cm)	终长(cm)	相对增长率(%)
对照组	46.20 ± 3.56	99.78 ± 19.05	115.97 ± 10.12 ^{bc}	11.24 ± 0.63	15.02 ± 0.55	33.63 ± 2.21 ^b
0.3%壳聚糖组	46.20 ± 3.56	109.37 ± 20.74	136.73 ± 6.42 ^{ab}	11.24 ± 0.63	15.62 ± 0.58	39.00 ± 2.26 ^a
0.5%壳聚糖组	46.20 ± 3.56	115.44 ± 11.19	149.87 ± 4.92 ^{ab}	11.24 ± 0.63	15.59 ± 0.25	38.67 ± 1.50 ^a
1%壳聚糖组	46.20 ± 3.56	111.90 ± 18.74	142.20 ± 4.00 ^{ab}	11.24 ± 0.63	15.39 ± 0.56	36.90 ± 3.16 ^{ab}
2%壳聚糖组	46.20 ± 3.56	110.47 ± 1.19	136.20 ± 4.48 ^{ab}	11.24 ± 0.63	15.25 ± 0.09	35.70 ± 0.90 ^{ab}

注:表中小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$),下同。

2.2 异育银鲫对嗜水气单胞菌的抗感染能力

异育银鲫摄食壳聚糖以后,0.5%、1%壳聚糖组的鱼对嗜水气单胞菌的抵抗能力有显著提高,这二组鱼的半致死量显著高于对照组和 2%壳聚糖组($P < 0.05$, 表 4)。

表 4 异育银鲫的成活率和 LD₅₀
Tab.4 Survival rate and LD₅₀ of tested fish

组别 group	成活率(%) survive rate	半致死浓度 LD ₅₀
对照组	95.67 ± 4.16 ^a	$10^{-2.03 \pm 0.28}$ Aa
0.3%壳聚糖组	94.00 ± 1.00 ^a	$10^{-1.87 \pm 0.43}$ Aab
0.5%壳聚糖组	95.67 ± 3.21 ^a	$10^{-1.31 \pm 0.11}$ Ab
1%壳聚糖组	96.00 ± 2.00 ^a	$10^{-1.29 \pm 0.16}$ Ab
2%壳聚糖组	97.33 ± 3.06 ^a	$10^{-2.00 \pm 0.24}$ Aa

3 讨论

本试验的异育银鲫摄食适量的壳聚糖以后,鱼对嗜水气单胞菌的抗感染能力极显著提高。Anderson 等对美洲红点鲑的研究具有相似的报导^[4],美洲红点鲑注射或浸泡壳聚糖后,能增强其对杀鲑气单胞菌

的抗感染能力。Siwicki 等给虹鳟口服壳聚糖也能增强其对杀鲑气单胞菌的抗感染能力^[6]。可能这是由于壳聚糖是天然多糖中少见的带正电荷的高分子物质,因其所带正电及其聚合分子的结构,使其具有较强的抑菌与杀菌能力^[8]。离体抗菌试验证实了壳聚糖对革兰氏阳性菌^[9]、革兰氏阴性菌^[9]、气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[2]和弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[2]均有显著的抑菌作用。此外,壳聚糖还能提高鱼的非特异性免疫功能。王树芹等^[10]报道,异育银鲫摄食 0.5% 或 1.0% 壳聚糖二个月,其溶菌酶活性和白细胞吞噬作用显著提高。注射或浸泡壳聚糖也可提高鲮(*Labeo rohita*)^[11]的非特异免疫功能。肖航^[12]曾提出,可能壳聚糖是阳性趋化剂,能够使单核细胞从血管中逸出,并聚集在组织中,形成巨噬细胞,或壳聚糖能够直接刺激局部组织,使细胞增生,继而演变为巨噬细胞。壳聚糖还因其能吸附 $[H^+]$ 而带正电,所以能活化巨噬细胞,增强其吞噬活性,同时还可激活 NK 细胞,诱发淋巴因子的产生,起到杀死胞内微生物的作用^[13],从而增强鱼对病菌的抗感染能力。

壳聚糖是甲壳素部分脱乙酰产物,甲壳胺是甲壳素完全脱乙酰产物,本试验壳聚糖对异育银鲫的促生长效果,与于东祥等^[1]使用的甲壳胺对真鲷幼鱼。真鲷幼鱼饲料中添加 0.5% 或 1% 的甲壳胺,能使幼鱼的增重率分别为对照鱼的 2.8~1.9 倍。壳聚糖的促生长作用可能是由于壳聚糖能够提高鱼的抗病能力,使鱼能健康生长。也可能因为壳聚糖有利于鱼肠道内有益菌群的增殖,有益菌群可能合成维生素等营养物,为动物所利用。

但是 Shiao 等^[14]在饲料中添加 2%、5%、10% 的壳聚糖或甲壳素,均能使罗非鱼的生长受抑制,其受抑程度随添加量的增加而加强。本试验高水平壳聚糖组鱼的生长效果不如低水平组,可能过量的壳聚糖在消化道内影响了营养物质的消化与吸收^[15]。

依据本试验鱼的生长及其对嗜水气单胞菌的抗感染能力,认为壳聚糖在异育银鲫鱼种饲料的适宜添加量为 0.5%。

参考文献:

- [1] 于东祥,柳学周,雷霖霖. 甲壳胺制剂对真鲷幼鱼的促生长作用研究[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3): 62-66.
- [2] 庄承纪,刘劲科,杨清友,等. 壳多糖对罗氏沼虾、糠虾对虾苗生长和抗菌防病作用研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(3): 30-34.
- [3] Kono M, Matsui T, Shimizu C. Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53: 125-129.
- [4] Anderson D P, Siwicki A K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion[J]. Pro. Fish Cult, 1994, 56: 258-261.
- [5] Anderson D P, Siwicki A K, Rumsey G L. Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of nonspecific defense mechanisms and protective immunity[A]. Diseases in Asian Aquaculture Vol. II. Fish Health Section[C], Manila: Asia Fisheries Society, 1995, 413-426.
- [6] Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis[J]. Vet Immunopathol, 1994, 41: 125-139.
- [7] 张寿山,华鼎可(译). 鱼类免疫学[M]. 北京: 农业出版社, 1984. 110-113.
- [8] 郑连英,朱江峰,孙昆山. 壳聚糖的抗菌性能研究[J]. 材料科学与工程, 2000, 18(2): 22-24.
- [9] 蒋玉燕,毕忆群,汪子伟,等. 275 株病菌对壳聚糖的敏感性试验[J]. 浙江省医学科学院报, 1995, 22(6): 7-9.
- [10] 王树芹,周洪琪. 壳聚糖对异育银鲫溶菌酶和白细胞吞噬活性的影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(2): 121-125.
- [11] Sahoo P K, Mukherjee S C. Influence of the immunostimulant, chitosan on immune responses of healthy and cortisol-treated rohu (*Labeo rohita*) [J]. J Aquacult Trop, 1999, 14(3): 209-215.
- [12] 肖航. 甲壳质、壳聚糖及其衍生物的免疫与抗癌活性[J]. 海洋科学, 1999, (3): 30-32.
- [13] 黄俊文. 一种有潜力的饲料添加剂—甲壳素与其衍生物[J]. 兽药与饲料添加剂, 2002, 7: 21-23.
- [14] Shiao S Y, Yi Ping Yu. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* [J]. Aquaculture, 1999, 179: 439-446.
- [15] Lindsay G J H, Walton M J, Adron J W, et al. The growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing chitin and its relationship to chitinolytic enzymes and digestibility[J]. Aquaculture, 1984, 37: 315-334.