

噬菌體療法運用水產養殖的研究與發展

鍾永廷、劉恩良、楊順德

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

世界面臨人口激增，造成糧食的供給不足，加上全球氣候變遷，以及人為的過度捕撈和海洋污染等因素，漁獲量逐年減少；因此，全球水產養殖漁業蓬勃發展，以提供人類足夠的優質水產動物蛋白。目前，水產養殖常採用集約式養殖，但養殖動物一旦遭受致病菌的感染，往往造成大規模的死傷，影響養殖戶的獲利空間。這些病原菌可藉由不同的途徑來感染養殖動物，像是飼料、水體、空氣人為因素以及垂直感染等，在養殖過程中常利用抗生素來防治這些病原菌的感染，但近年來因抗生素的濫用，使得病原菌產生抗藥性，甚至會有多重抗藥性的菌株的產生，大幅減低抗生素的防治效果，為解決這類的問題，噬菌體療法是極具潛力可發展的技術。

噬菌體是病毒的一種，會專一的感染細菌，是由蛋白質外殼以及包裹於內部的核酸所組成，廣泛地存在於自然環境中，尤其是在充滿細菌群落的地方，如泥土、河川、海洋，皆可找到噬菌體的蹤跡。依據生活模式，這些噬菌體可分為溶裂型 (lytic) 或潛溶型、溫和型 (temperate) 噬菌體。噬菌體在經過吸附 (adsorption)、穿透 (penetration)、脫殼

(uncoating)、複製 (replication) 後，產生溶裂蛋白 (holin、lysozyme 及 Rz/Rz1)，溶裂宿主的細胞壁，能釋放噬菌體顆粒，再去感染新的宿主，此溶裂型過程稱為溶裂型生活週期 (lytic cycle)。而潛溶型則會將自身的遺傳物質鑲嵌於宿主染色體中，形成 prophage 潛伏於宿主細胞中，並且與宿主細胞同步複製，對宿主細胞影響不大，此生活週期稱為溶原性 (lysogenic cycle)。一旦宿主細胞受到 UV 光照射或外在環境因素影響，噬菌體被誘發進入 lytic cycle，釋出噬菌體顆粒，裂解宿主細胞，有利於繁衍後代。而噬菌體療法多採用溶裂型噬菌體，因可迅速殺死宿主且不會潛伏於宿主細胞中，較快達到治療的效果，目前已有一些文獻利用噬菌體療法於水產養殖動物致病菌的防治且有顯著的效果。

由於感染水產動物的致病菌種類繁多，本文簡要介紹利用噬菌體進行治療的案例。親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是常見的水生動物致病菌，屬革蘭氏陰性菌，短桿狀，病原環境淡水、海水皆會發生，造成受感染魚隻的出血性敗血症，鰭部和軀體鱗片受損。近年來已有文獻以泥鰻 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 為模式 (Jun et al., 2013)，將不同濃度的 *A. hydrophila* 注射至腹腔當作對照組，實驗組則是注射完 *A.*

hydrophila 後隨即注射噬菌體進行治療，經過 7 天的實驗，未注射噬菌體組的死亡率較實驗組高。接著作者以類似的方式進行實驗，將治療方式改成在飼料中添加噬菌體進行投餵，同樣的對照組較實驗組死亡率高。另外，作者接續做了一個實驗，將高濃度的噬菌體注入泥鰱腹部後，觀察其健康狀況，一個月後發現並不會造成魚隻有任何負面影響。結果顯示，*A. hydrophila* 所誘發泥鰱的感染症，運用噬菌體療法有良好的防治效果，證實此治療方式的可行性。

魚型鏈球菌 (*Streptococcus iniae*)，屬革蘭氏陽性菌，長鏈狀， β 溶血，會導致魚類感染魚類鏈球菌症，造成眼球突出、角膜混濁、出血性全眼炎等症狀，已有文獻利用日本牙鯉 (*Paralichthys olivaceus*) 做為模式 (Matsuoka et al., 2007)，將 *S. iniae* 接種注射至魚體後，再以噬菌體來治療，15 天後觀察結果顯示，經噬菌體治療的組別與對照組相比，有較低的死亡率約 50%，未經處理者則全部死亡；但本實驗也發現，以噬菌體治療的組別中，死亡的魚大多都有抗噬菌體感染的菌株。因此，對於噬菌體療法的有效性還需進一步了解。

哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 屬革蘭氏陰性菌，彎曲桿狀，具發光性，廣泛存在於海洋環境中，也是引起海洋動物弧菌病的重要病原菌，可感染魚、蝦、貝類等海水養殖動物，蝦類感染後會導致生長緩慢，食慾不振和極高的死亡率；魚類則會造成肌肉潰瘍、腎臟、膽囊腫大、胃腸炎以及敗血症。Vinod et al. (2006) 分離到一種泛宿主溶裂型噬菌體，且利用在防治草蝦 (*Penaeus*

monodon) 苗 *V. harveyi* 的感染，作者先以後期蝦生做為模式進行實驗，在水體中加入 *V. harveyi* 感染蝦苗，在感染後 0 小時、24 小時加入噬菌體，48 小時後觀察，結果顯示實驗組較對照組有較高的活存率，噬菌體治療組為 80%，對照組則為 25%；接著作者進行田間試驗，同樣的，有噬菌體處理的組別，蝦苗存活率較高且養殖池內 *V. harveyi* 的量可被抑制。因此，噬菌體療法極可能發展成為蝦類繁殖場對抗 *V. harveyi* 的生物性防治法。綜合以上文獻，噬菌體療法在不同致病菌中皆有良好的防治效果，假以時日應能普遍運用水產養殖業。

噬菌體療法優缺點及發展的可行性

一、優點

噬菌體本身穩定性高且易保存，具有高專一性，以抗生素治療細菌性感染時，除了會殺死致病菌外也同時連帶影響到一些益生菌的生長，而噬菌體專一性極高，並不會破壞到益生菌的菌叢，對於治療生物體後的健康回復情形效果較抗生素來的高。噬菌體的增殖速度快，為指數增殖，在環境合適的情況下感染細菌後，一個裂解週期，每個噬菌體約可產生數百個子代，但會依噬菌體的種類子代數會有所不同。且噬菌體在擴大培養時操作容易，生產時間短，從自然界中就可分離純化，生產成本低。對於多重抗藥性的菌株具有防治效果，根據過去文獻中顯示噬菌體療法確實可用來防治水產動物的致病菌感染，甚至有些效果較抗生素治療來的佳。

二、缺點

噬菌體療法仍面臨一些問題，首先，噬菌體療法只針對細菌性疾病具有治療效果，所以必須了解水產動物發病的類型是否為細菌性疾病，因為噬菌體只能感染細菌，對於病毒或寄生蟲等其他病原無防治效果。而水產動物受到緊迫、體表損傷及健康狀況較差時，自身免疫力較低，常會造成大量致病菌的感染，此時感染的病原菌並不單一，而噬菌體感染宿主時，必須藉由特定的宿主受體蛋白進行專一性的認辨，如果無法認辨到宿主表面的受體，就無法感染宿主，面臨多種致病菌感染時，噬菌體的治療的效果就會大大降低，且同種細菌，當表面受體產生突變或者一些修飾作用如糖基化等，皆會使細菌產生抗性，此時往往單一種噬菌體無法達到治療效果，因此，在噬菌體治療過程常以雞尾酒療法，混和抗生素一起使用或添加多種噬菌體來降低細菌抗性的問題。而利用噬菌體進行治療時，噬菌體能夠殺死細菌，但有些細菌會產生的內毒素，一旦噬菌體裂解細菌細胞後（如圖），內毒素就會釋出到環境中，此時如果內毒素不利於治療對象，則會造成生物體損害或中毒死亡。另外，噬菌體的挑選方面也相當重要，需為溶裂型噬菌體，已有文獻顯示在蝦類致病菌 *V. harveyi* 的研究中 (Ruangpan et al., 1999; Munro et al., 2003)，使用潛溶型噬菌體進行治療，發現不但無治療效果，反而會增強病原體的致病力。廣泛應用噬菌體療法於水產養殖業，若使用不當時，因部分噬菌體具有感染不同種類細菌的能力，大量的噬菌體隨池水排放至天然水域中，可能造成環境中微生物菌叢

受到影響，使得微生態相失去平衡，間接影響植物的生長等問題。因此，總結來說噬菌體療法應用於水產養殖時，必須審慎評估且小心使用，對於噬菌體的種類或是使用量應多加詳估，這是未來發展應用時必須留意的重要課題。



噬菌體裂解細菌產生溶菌斑的情形 (左圖：plaque assay；右圖：spot test)

結語

噬菌體療法是一種可替代抗生素的方法，由於現今抗生素的濫用，造成多重抗藥性的菌株產生，面臨無藥可用的狀況，如果這類致病菌大量爆發，會難以控制且造成養殖業極大的損失，加上有些致病菌具有感染人類的風險，因此，尋找取代抗生素的療法是目前須嚴加正視的問題。根據彙整最近的文獻發現，噬菌體療法應用於水產養殖極具潛力，但要達到商業化或大規模的使用，還需更多實證範例，並且經過嚴格的評估，如噬菌體的種類、使用的方式、添加量等問題。由於目前生物技術蓬勃發展，且噬菌體的基因體不大，可利用次世代定序等方式進行分析，以便瞭解噬菌體感染機制，期待透過這些研究來發展出更有效之生物藥劑，且能應用於水產養殖產業。