

水產病原菌數位檢測裝置之開發

林志遠¹、張錦宜²、吳志偉³、王郁峻¹

¹水產試驗所企劃資訊組、²水產試驗所、³國立臺灣海洋大學機械與機電工程學系

前言

養殖過程中，水中病原菌濃度過高時，可能導致疫情爆發。傳統微生物方法，採集檢體後，需經分離、純化、培養等繁複步驟，不僅曠日費時，而且往往發生養殖生物大量死亡後才檢測出水中病原菌濃度過高導致疾病發生。近幾年來，因為生物技術的進展，開發出免疫螢光、核酸雜交及聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術等較為快速的檢測方法。目前水產病原菌的檢測大多採用塗抹法、血清檢驗或是微量生化反應 (Adams et al., 1995; Morris et al., 1997)，其缺點在於人工操作易因實驗中些許不明顯的差異導致誤判；而 PCR 或是核酸檢測的缺點則包括送件過程的時間耗費、儀器檢測成本高且須在實驗室進行檢測等。

根據聯合國糧食及農業組織 (FAO) 2020 世界漁業和水產養殖狀況 (SOFIA) 報告，預估到 2030 年，魚類總產量將增加至 2.04 億噸，較 2018 年增長 15%。惟近十餘年來，捕撈漁業的產量已呈現停滯甚或下降趨勢，因此在漁產品的供應方面，水產養殖的重要性將與日俱增。為進一步提升水產養殖的質與量，導入智慧化養殖技術勢在必行。

俗諺道「養魚先養水」，代表水產養殖首重水質管理。養殖生物棲息水域的化學、物理和生物因子為水質管理的首要目標。為增殖水產生物，達到養殖獲利的目標，必須維持適合養殖生物成長之環境條件，為了符合這項基本要求，水質監控便是首要，水中物理與化學因子可透過感測器或是化學反應達到監測目的，但水中生物因子如何快速且準確的檢測迄今仍是科學家努力的目標。

本研究係利用本所研發之水產病原性弧菌數檢測套組 (張等, 2011)、水產病原乳酸鏈球菌快速檢測套組 (張等, 2013) 以及鰻魚愛德華氏菌快易檢套組 (朱等, 2016)，以試劑與目標病原菌反應後之變色反應特性所開發的數位檢測裝置，除可精準判定變色反應回推濃度精準定量與大幅縮短檢測時間外，並可透過物聯網功能無線傳輸即時檢測結果，提供病原菌預警。

檢測原理與檢測元件設計

根據比爾－朗博定律 (Beer-Lambert law)，當光穿透樣品溶液時，光的吸收度與吸收係數、光徑長、濃度等均呈正比。此原理主要涉及的電磁波譜範圍是可見光、近紫

外線與近紅外線，利用特定波長的單色光分別透過標準溶液與待測溶液，比較其吸光度差異，即可轉換為濃度。

在光學檢測系統中，光源可說是最重要的元件之一，同時也是體積較大與成本較昂貴的設備；換句話說，光源是檢測設備小型化與降低系統成本的關鍵。目前市售的光源可分為雷射、燈泡及發光二極體 (LED)，在光電應用上 LED 有低成本、低功率消耗、高照度、體積小、單一的光譜、多波長等優點，且使用壽命遠高於其他種類之光源。

感光元件被廣泛地應用在數位相機和其他電子光學設備中，它的用途很簡單，係將透過鏡頭進入的外界光線，轉換成 0 與 1 的數位訊號，再處理成電腦上可以看到的圖片，此過程稱為 A/D 轉換 (analog-to-digital converter)，即是類比 (analog) 轉成數位 (digital) 的過程 (Staller, 2005)。

檢測槽設計是依據比爾定律原理，將裝有待測物的離心管放入 LED 與感光元件之間，依據感光元件接受到的數值，經由 Arduino 單晶片微控制器計算結果，回算出病原菌濃度。

系統外觀架構

本系統架構分成檢測區 (圖 1) 以及 LCD 顯示器 (圖 2)。檢測區內有 3 組檢測槽，用來檢測待測物，目前可針對海洋弧菌、乳酸鏈球菌與艾德華氏菌進行檢測，因原理相同故本文僅以海洋弧菌檢測進行說明。檢測方法只需將待測水體與檢測試劑於離心管充分混合後放入檢測晶片中即完成。系統啟



圖 1 檢測區包括三組獨立檢測槽



圖 2 LCD 顯示器 (菌種選擇模式)

動後 LED 光源會發出特定波長的藍光或綠光，照射至待測物，感光元件接收穿透的光後，Arduino 內部程式即會判斷待測物濃度。檢測完成後會將濃度顯示在 LCD 顯示器上，並上傳雲端資料庫。

系統檢測流程

系統檢測流程如圖 3 所示。將待測物置於待測區後，啟動按鈕並開始檢測，系統會先記錄第 1 筆檢測數據為 V_0 ，接著利用 $V/V_0 > 0.95$ 作為呈色的標準，若數值未小於 0.95 則繼續檢測，並記錄次數+1，直到小於 0.95。若已小於 0.95 則檢測結束，並依據檢測次數計算檢測時間並藉以判定濃度。使用 0.95 作為呈色的標準，除了因為電壓降較明顯以外，更能儘速判斷弧菌濃度，達到節省時間的目的。

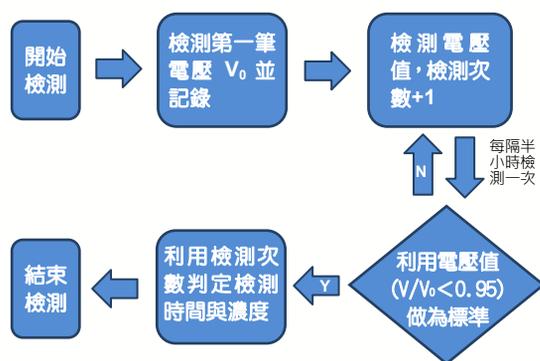


圖 3 系統檢測流程

海洋弧菌檢測試劑

檢測弧菌所使用的試劑係本所研發之 MV-kit (張等, 2011), 檢測之目標體積只需要 40 μl 。而檢測過程中, 會先將流體與 360 μl 的 MV-buffer 混和均勻, 並等待 5 分鐘, 再取出 40 μl 配上 125 μl 的 MV-kit 即可。混和液體會起變色反應, 由透明色轉為紫色 (圖 4), 24 小時內變色代表濃度 $> 4.2 \times 10^6$ CFU/ml, 24 到 30 小時為 $4.2 \times 10^6 - 1.1 \times 10^5$ CFU/ml, 大於 30 小時的則代表 $< 1.1 \times 10^5$

CFU/ml。當水中病原菌濃度大於 10^5 CFU/ml, 表示水中病原菌濃度達危險等級, 須立即處理, 避免爆發疫情。

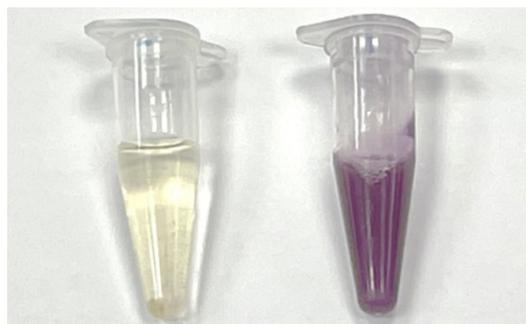


圖 4 右方呈現紫色表示具有海洋弧菌反應

LED 與感光元件穩定度測試

光源穩定性為影響吸收光偵測系統性能的重要因素, 不穩定的光源會造成檢測訊號值變化劇烈, 導致誤差。本研究共測試 3 組 LED 於檢測區 (綠光工作流體為 18.2 M Ω 純水, 藍光工作流體為空氣) 之光出口端, 以感測元件量測波長 515 nm (綠光) 和 467 nm (藍光) 的發光強度, 每 30 秒記錄 1 筆, 共 500 筆。計算結果顯示, 3 組綠光模組的相對標準差分別為 0.000889、0.000898、0.00121; 3 組藍光模組的相對標準差分別為 0.007908、0.007785 以及 0.008259。此結果代表檢測光源均具有絕佳的穩定度。綠光、藍光各 3 組 LED 皆可發射強度穩定的光源, 加上 LED 體積小、價格低、波長選擇性多的優點, 足以應用於本研究的分析。

相同濃度海洋弧菌呈色檢測

在 3 個不同模組裡, 檢測相同濃度 (10^8

CFU/ml) 的海洋弧菌，以 LED 每隔 2.5 秒取得 5,000 筆數據平均值作為電壓值，並延遲 20 秒重複動作，共各 2,000 筆。如圖 5 所示，同濃度的海洋弧菌，在不同模組下，其呈色時間差不超過 40 分鐘，結果相近，證實檢測模組具有一致的穩定性。

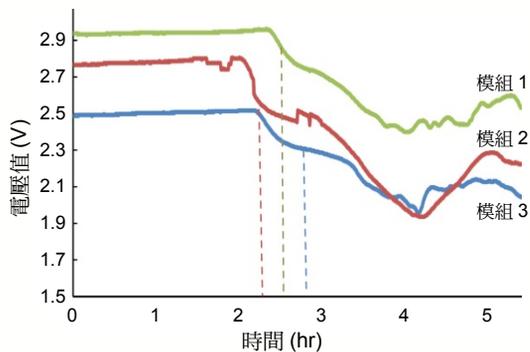


圖 5 相同濃度，不同模組下所呈色的時間

不同濃度海洋弧菌檢測結果

檢測 10^8 、 10^7 、 10^6 及 10^5 CFU/ml 等不同濃度的海洋弧菌，以 LED 每隔 2.5 秒取得 5,000 筆數據平均值作為電壓值，並延遲 20 秒重複動作，共各 2,000 筆。結果如圖 6 所示，不同濃度的海洋弧菌開始呈色的時間點顯著不同，可明確判斷。

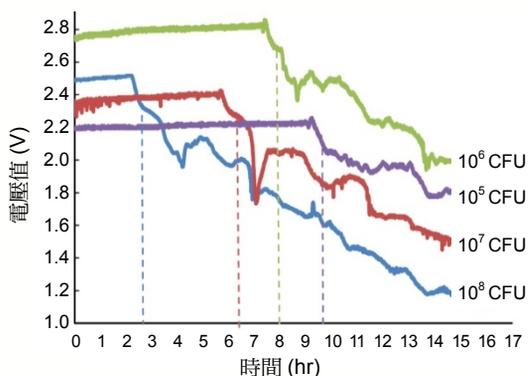


圖 6 不同濃度的所呈色的時間

結論與展望

本研究已成功開發出一套快速、即時且具物聯網功能之檢測系統，並證實具有即時檢測功能，且各檢測模組之穩定度極佳，在 4–9 小時內即可得知病原菌濃度，比一般傳統的目視比色法需耗時 30 小時快速很多，且可精準定量。檢測結果除可直接顯示於系統之 LCD 上，並可透過物聯網功能將結果傳至遠端伺服器，養殖業者可利用手機得知最新檢測結果，但目前仍需以人工採取水樣混和試劑後送入檢測裝置，未來將朝向自動吸取水樣、添加與混和試劑等全自動化發展。

本所之病原菌檢測套組搭配本裝置可提前 20 小時檢測出水中病原菌濃度已達爆發之臨界值，所爭取的黃金 20 小時之時間可使養殖業者提早預警因應，進行相關水質管理，例如大量換水等方式降低病原菌濃度，阻止疫病爆發，大幅降低養殖風險。

本研究成果已實際應用於屏東水產養殖公司，其中之核心技術並已取得中華民國 109 年新型專利 (M605662，名稱：具有物聯網整合之可攜式多光源水產病原菌檢測裝置)，期望未來能與產學研各界進行技術合作與擴散。

誌謝

本研究為行政院農業委員會智慧農業計畫 (108 農科-13.2.8-子-A1) 之部分研究成果，期間承蒙本所水產養殖組提供試驗場域與測試人力支援，特此表達謝意。