

溶藻弧菌快速檢測套組之研發

張錦宜、吳嘉哲、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 廣泛分布於世界各地海水及河口處，是海洋中正常菌群之一，亦是多種水產生物的條件致病菌。其感染的養殖種類曾載於文獻的包括海水魚（黑鯛、黃鰭鯛、大黃魚、石斑）、蝦（草蝦、斑節蝦、白蝦、中國對蝦）及貝類（文蛤、九孔）等，往往導致業者極大的損失。此外，生鮮海產中若帶有大量溶藻弧菌亦會引起人類食物中毒；因此，開發一快速、簡便、人人都可使用的溶藻弧菌檢測套組 (VA-kit)，不論在水產養殖或食品衛生的自主健康管理上，都極有價值。

溶藻弧菌與各菌株之特異性比較

將溶藻弧菌與 24 株台灣水產常見病原菌 (表 1)，逐一進行血清學、16S rRNA、16S-23S rRNA 序列之分析比對，以微生物學方法進行各菌株之形態、色素、運動模式、氧氣需求、代謝途徑、適溫、適鹽等特性分析比對，並利用 BIOLOG™、API™、MICROBACT™ 等生化試驗套組進行了 27 項生理、生化性狀，95 項碳源檢定及 19 項酵素活性分析，以篩選出溶藻弧菌株獨特且可據以開發成檢測套組之特異性狀。

溶藻弧菌檢測套組原型開發

一、背景值干擾源分析及雜訊去除

於上述特異性分析結果中篩選出可用的性狀，確定反應結果會出現肉眼可見的呈色產物，再以 24 株台灣水產常見病原菌與溶藻弧菌混合為試驗檢體，交叉測試反應結果，分析背景中的干擾源，再重新研擬雜訊清除策略。最後開發出的檢測套組原型為體積約 150 μ l 之液狀試劑，檢測時僅需滴加 40 μ l 之檢體，於 40℃ 反應 6—24 小時即可以肉眼判讀，若試劑從無色變為藍紫色 (圖 1)，則表示檢體中有溶藻弧菌。

本套組原型開發完成後，即進行專一性、靈敏度及田間測試。

二、專一性測試

以 25 株台灣水產常在菌標準菌株 (表 1)

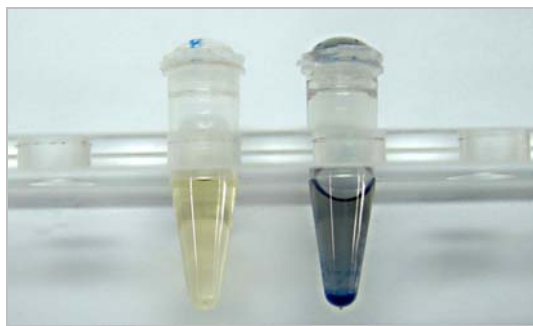


圖 1 溶藻弧菌檢測套組(VA-kit)原型及檢測到溶藻弧菌後之呈色反應(右管)，正反應呈現深藍色，左管為無溶藻弧菌之對照組

懸浮液為試驗檢體，逐一以上述檢測方法測試本套組之呈色反應，結果只有溶藻弧菌檢體會出現藍紫色之呈色反應，腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 在 24 小時後則會呈現淡紫色，不過此兩種顏色可輕易以肉眼區別。

三、靈敏度測試

10 倍連續稀釋的溶藻弧菌懸浮液 ($10^1 - 10^9$ CFU/ml) 先以傳統平板計數法計算細菌數目，再依本套組標準檢測程序進行檢測與判讀，以測試本套組所能偵測的最小濃度。與標準微生物學方法比較，本套組檢測靈敏度可達 100 CFU/ml (圖 2)。

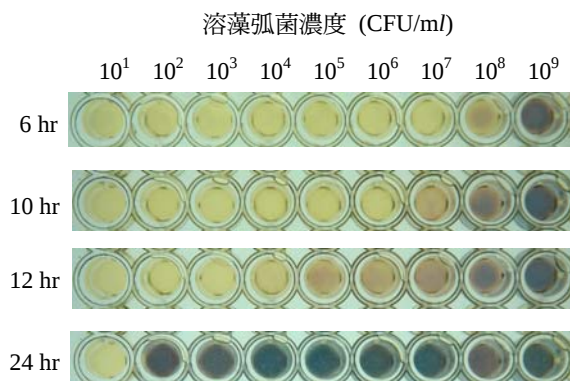


圖 2 溶藻弧菌檢測套組(VA-kit)靈敏度測試結果，並可顯示檢體中溶藻弧菌數量與本套組呈色反應時間之關係

表 1 溶藻弧菌檢測套組對不同標準菌株的呈色反應

菌種	菌株來源編號	菌株國際編號	VA-kit 檢測結果
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BCRC13018	ATCC7966	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	MT423		
<i>Aeromonas sobria</i>	BCRC13066	ATCC43979	
<i>Edwardsiella tarda</i>	BCRC10670	ATCC15947	
<i>Enterococcus faecalis</i>	BCRC10066	ATCC19433	
<i>Enterococcus faecium</i>	BCRC10067	ATCC19434	
<i>Escherichia coli</i>	BCRC51731		
<i>Flavobacterium columnaris</i>		ATCC23463	
<i>Lactococcus garvieae</i>	MT2055		
<i>Listonella anguillarum</i>	BCRC12908	ATCC19264	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	BCRC15320	ATCC19709	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	BCRC10709	ATCC25177	
<i>Nocardia farcinica</i>	BCRC13364	ATCC3308	

<i>Nocardia seriolae</i>	BCRC13745	ATCC43993	
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	BCRC12906	ATCC33539	
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	BCRC17065	ATCC51736	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BCRC10944	ATCC10145	
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>		ATCC33660	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BCRC11030	ATCC12228	
<i>Streptococcus iniae</i>	BCRC14744	ATCC29178	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	BCRC12829	ATCC17749	
<i>Vibrio harveyi</i>	BCRC12907	ATCC14126	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BCRC12865	ATCC27969	
<i>Vibrio salmonicida</i>	BCRC12844	ATCC43839	
<i>Vibrio vulnificus</i>	TG617		

四、定量分析

溶藻弧菌快速檢測套組不僅可以專一性地檢測病原菌，還能根據呈色反應的時間，推定檢體中溶藻弧菌的數量。若檢體中溶藻弧菌的數量 $> 10^8$ CFU/ml，VA-kit 會在 6 小時以內變色；若介於 $10^5 - 10^8$ CFU/ml，變色時間為 12 小時以內；介於 $10^2 - 10^5$ CFU/ml，則 VA-kit 會在 24 小時以內變色。

五、田間試驗

將分離自嘉義鰻魚養殖池、台東九孔養殖池及澎湖牡蠣養殖場之 30 株淡水常在菌及 30 株海水常在菌 (表 2)，分別以 16S rRNA 技術及本套組進行鑑定。結果顯示，自田間分離出的 5 株溶藻弧菌，使用本套組鑑定時均呈現與 16S rRNA 鑑定結果相符的陽性反應，但所分離到的 3 株腸炎弧菌，其中有 1

株 (自澎湖分離所得) 亦在本套組出現偽陽性反應，至於其他 52 株經鑑定不屬於上述兩種弧菌的淡水、海水常在菌，在本套組中均呈現陰性反應。

結論

本套組可準確地檢測出溶藻弧菌，並可推估出檢體中溶藻弧菌的數量，又因為不需使用到繁雜的技巧或特殊的儀器設備，故適合實際應用於養殖現場之健康管理。若能對每一養殖池均建立長期連續的監測紀錄，如此，當水中病原菌數量異常增加時，即可在第一時間做最適當的處理。善用此一簡易、快速的病原菌檢測工具，當可真正落實「預防勝於治療」的健康管理原則。

表 2 田間分離菌株以溶藻弧菌檢測套組檢定之結果

菌株編號	16S rRNA 鑑定結果	VA-kit 檢測結果	菌株編號	16S rRNA 鑑定結果	VA-kit 檢測結果
FW01	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW16	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—
FW02	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW17	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—
FW03	<i>Citrobacter freundii</i>	—	FW18	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—
FW04	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW19	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—
FW05	<i>Citrobacter youngae</i>	—	FW20	<i>Citrobacter</i> sp.	—
FW06	<i>Citrobacter freundii</i>	—	FW21	<i>Citrobacter freundii</i>	—
FW07	<i>Aeromonas sobria</i>	—	FW22	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—
FW08	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW23	<i>Citrobacter freundii</i>	—
FW09	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW24	<i>Moraxella</i> sp.	—
FW10	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW25	<i>Aeromonas culicicola</i>	—
FW11	<i>Citrobacter</i> sp.	—	FW26	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—
FW12	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW27	<i>Citrobacter freundii</i>	—
FW13	<i>Aeromonas hydrophila</i>	—	FW28	<i>Citrobacter freundii</i>	—
FW14	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	—	FW29	<i>Aeromonas hydrophila</i>	—
FW15	<i>Citrobacter freundii</i>	—	FW30	<i>Flavobacterium succinicans</i>	—
SW01	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	SW16	<i>Tenacibaculum</i> sp.	—
SW02	<i>Gamma proteobacterium</i>	—	SW17	<i>Bacillus cereus</i>	—
SW03	<i>Alteromonas</i> sp.	—	SW18	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+
SW04	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	—	SW19	<i>Vibrio fortis</i>	—
SW05	<i>Sulfotobacter</i> sp.	—	SW20	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	—
SW06	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	—	SW21	<i>Alteromonas</i> sp.	—
SW07	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	SW22	<i>Vibrio harveyi</i>	—
SW08	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	SW23	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+
SW09	<i>Pseudomonas</i> sp.	—	SW24	<i>Vibrio fluvialis</i>	—
SW10	<i>Vibrio</i> sp.	—	SW25	<i>Bacillus subtilis</i>	—
SW11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	—	SW26	<i>Sulfotobacter</i> sp.	—
SW12	<i>Maribacter dokdonensis</i>	—	SW27	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+
SW13	<i>Sulfotobacter</i> sp.	—	SW28	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	—
SW14	<i>Vibrio harveyi</i>	—	SW29	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	—
SW15	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	SW30	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—