

水質總生菌數檢測套組之研發

張錦宜、吳嘉哲、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

農產品安全檢測試劑的開發，可以在病原尚未大量繁殖之前提早檢測、鑑定，防止疾病的擴散。其中，總生菌數傳統上作為一種衛生指標，可顯示水中、生鮮食品或其他環境樣品受污染的程度。樣品中總生菌數的含量若超過規定標準，則代表水源、液體或食品來源受到污染，或者在生產過程中的某個階段的衛生條件不合格。根據中華民國行政院衛生署公告的衛生標準，飲用水、自來水及食用冰塊的生菌數標準為 100 CFU/ml；游泳池及溫泉用水的生菌數標準為 500 CFU/ml；生鮮食品、生乳、及冰品溶解水的生菌數標準為 100000 CFU/ml (g)。此外，養殖業者的進水水源，往往受到自家或附近業者的排放水污染，造成水產疫病的快速蔓延，水質總生菌數的自主檢測亦可作為養殖用水水源管理的重要參考。

各菌株同質性狀之篩選

本研究以淡水環境常在菌 30 株、海水環境常在菌 30 株、台灣常見水產病原菌 23 株及衛生指標菌 8 株，共計 25 屬、42 種、91 株不同細菌做為細菌實體資料庫 (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™ 等生化試驗套組篩選了 27 項生理、生化性狀，95 項碳源檢定及 19 項酵素活性分析，以篩選出對各菌株均有作用且具呈色反應之同質性性狀。

水質總生菌數檢測套組 (Total viable bacterial count kit, 以下簡稱 TVBC-kit) 原型開發

一、定性反應之篩選

根據前述篩選出的同質性性狀，汰除容易因不同檢體背景 (淡水、海水、高鹽、高糖、富含動物組織及 pH 變化等) 而導致呈色反應不穩定的性狀，最後篩選出 3 種同質性受體，可於反應後激發出吸收光譜位於 400—450 nm、450—500 nm 及 630—780 nm 之可見光 (圖 1, a—c)，反應終產物分別呈現肉眼可辨識之紫色、深藍色及紅色。經系列濃度測試 (serial concentration assay)，逐一找出最適反應條件後，可大幅增加反應之靈敏度，結果終產物為紫色、深藍色及紅色等呈色反應對上述 91 株菌株之檢出率分別可達 92%、89%及 92%。

表1 本研究所使用的菌種、來源及數量

菌種	菌株	來源 (數量)
<i>Aeromonas culicicola</i>	3	Chayi(2)
<i>A. hydrophila</i>	2	Chayi(1) BCRC13018(1)
<i>A. salmonicida</i>	1	MT423(1)
<i>A. sobria</i>	1	BCRC13066(1)
<i>Alteromonas</i> sp.	1	Taitung(1)
<i>Bacillus cereus</i> biovar <i>toyoi</i>	1	Toyoi Inc.(1)
<i>B.</i> sp.	1	Penghu(1)
<i>B. subtilis</i>	1	Toyoi Inc.(1)
<i>Citrobacter freundii</i>	6	Chayi(6)
<i>C.</i> sp.	2	Chayi(2)
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	4	223BT(1)、E223BT(1)、E317BT(1)、E318BT(1)
<i>E. tarda</i>	1	BCRC10670(1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	BCRC10066(1)
<i>E. faecium</i>	1	BCRC10067(1)
<i>Escherichia coli</i>	2	BCRC51731(1)、BCRC11634(1)
<i>Gamma proteobacterium</i>	1	Taitung(1)
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	MT2055(1)
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	BCRC14845(1)
<i>Listonella anguillarum</i>	1	BCRC12908(1)
<i>Maribacter dokdonensis</i>	1	Taitung(1)
<i>Moraxella</i> sp.	1	Chayi(1)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	2	BCRC12906(1)、Pingtung(1)
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	1	Penghu(1)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14	Chayi(14)
<i>Pseudoalteromona</i> sp.	2	Penghu(2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	BCRC10944(1)、BCRC11633(1)
<i>P.</i> sp.	1	Taitung(1)
<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	1	Taitung(1)
<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	1	Penghu(1)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	2	BCRC12154(1)、BCRC10780(1)
<i>S. epidermidis</i>	2	BCRC10785(1)、BCRC11030(1)
<i>Streptococcus iniae</i>	1	BCRC14744(1)
<i>S. mutans</i>	1	BCRC15256(1)
<i>Sulfitobacter</i> sp.	4	Taitung(2)、Penghu(2)
<i>Tenacibaculum</i> sp.	3	Taitung(1)、Penghu(2)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	8	Penghu(7)、BCRC 12829(1)
<i>V. fluvialis</i>	1	Penghu(1)
<i>V. fortis</i>	2	Penghu(2)
<i>V. harveyi</i>	3	Penghu(2)、BCRC12907(1)
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	Taitung(1)、BCRC12865(1)
<i>V. salmonicida</i>	1	BCRC12844(1)
<i>V.</i> sp.	2	Penghu(1)、Taitung(1)

最後再進行 3 種同質性受體之交叉測試，發現同質性受體具互補性，將發紅光與紫外光的同質性受體加入同一反應系統中(圖 1, d)，可再增加反應之靈敏度。受測的 91 株菌株中，僅 1 株海洋細菌 *Alteromonas* sp. 無法呈色，檢出率提高至 98.9%，符合未來商品化的需求。

二、定量檢測之研發策略

以改良自傳統微生物學之「最大可能數(maximum possible number)」方法，結合前述篩選出的同質性受體顯色技術，建構完成商品化雛型。本方法中使用到的試劑包含 A 與 B 兩種。其中試劑 A 係以相同體積分裝於 2 個獨立透明容器中（分別標示為 A-1 及

A-2），包含有供細菌成長之營養來源以及可產生呈色反應的同質性受體。試劑 B 則為包含鹽類之稀釋液，目的在於將原本檢體中所含有之生菌數量經由一定倍率稀釋，使稀釋後之生菌數量基於生菌檢測標準達成一取樣的臨界值。本套組使用時以吸管取檢體 40 μ l 分別添加於試劑 A-1 與試劑 B 中（圖 2 (a)），將含試劑 B 與檢體之容器劇烈搖晃充分混合後（圖 2 (b)），再以另一吸管取試劑 B 與檢體之混合液 40 μ l，添加於試劑 A-2 中（圖 2 (c)）。將試劑 A-1 及 A-2 同時置於 35°C 中，經 12 小時後以肉眼辨識其顏色（圖 2 (d)），若 A-1 與 A-2 同時變色表示檢體中生菌數過高，不符合衛生標準。

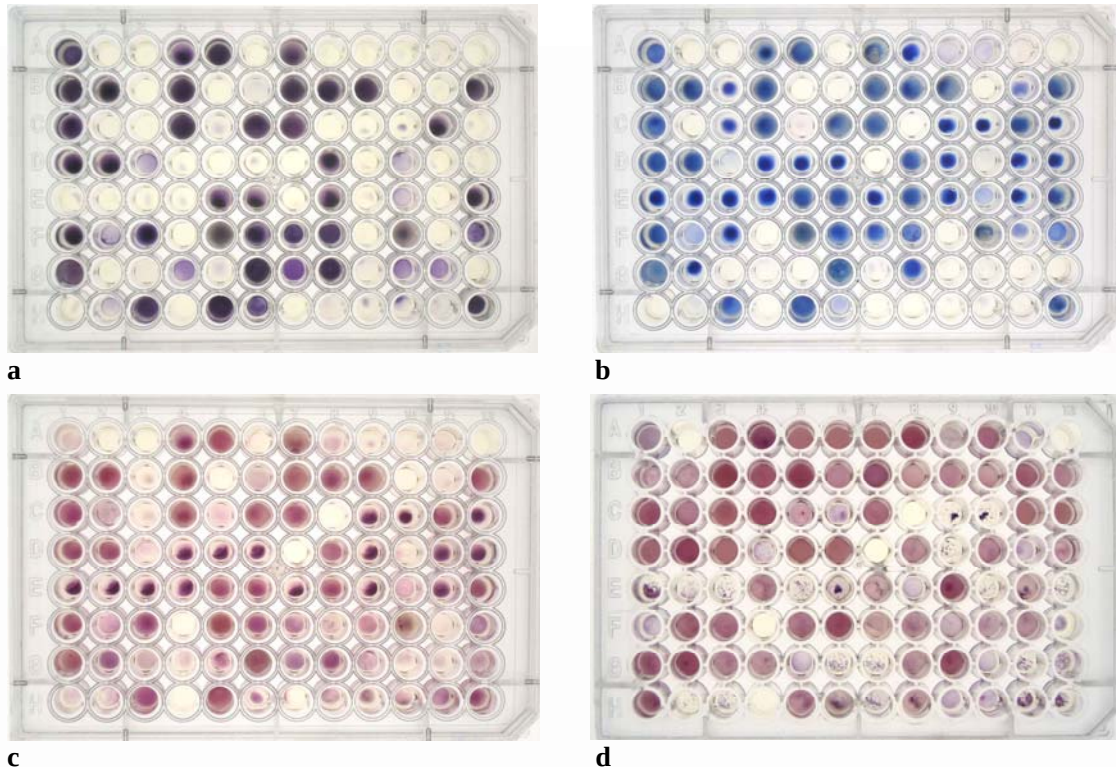


圖 1 受測菌株對同質性受體的呈色反應。(a)吸收光譜為 400-450 nm 的紫色反應；(b)吸收光譜為 450-500 nm 的藍色反應；(c)吸收光譜為 630-780 nm 的紅色反應；(d)2 種同質性受體互補後呈現的紅紫色呈色反應

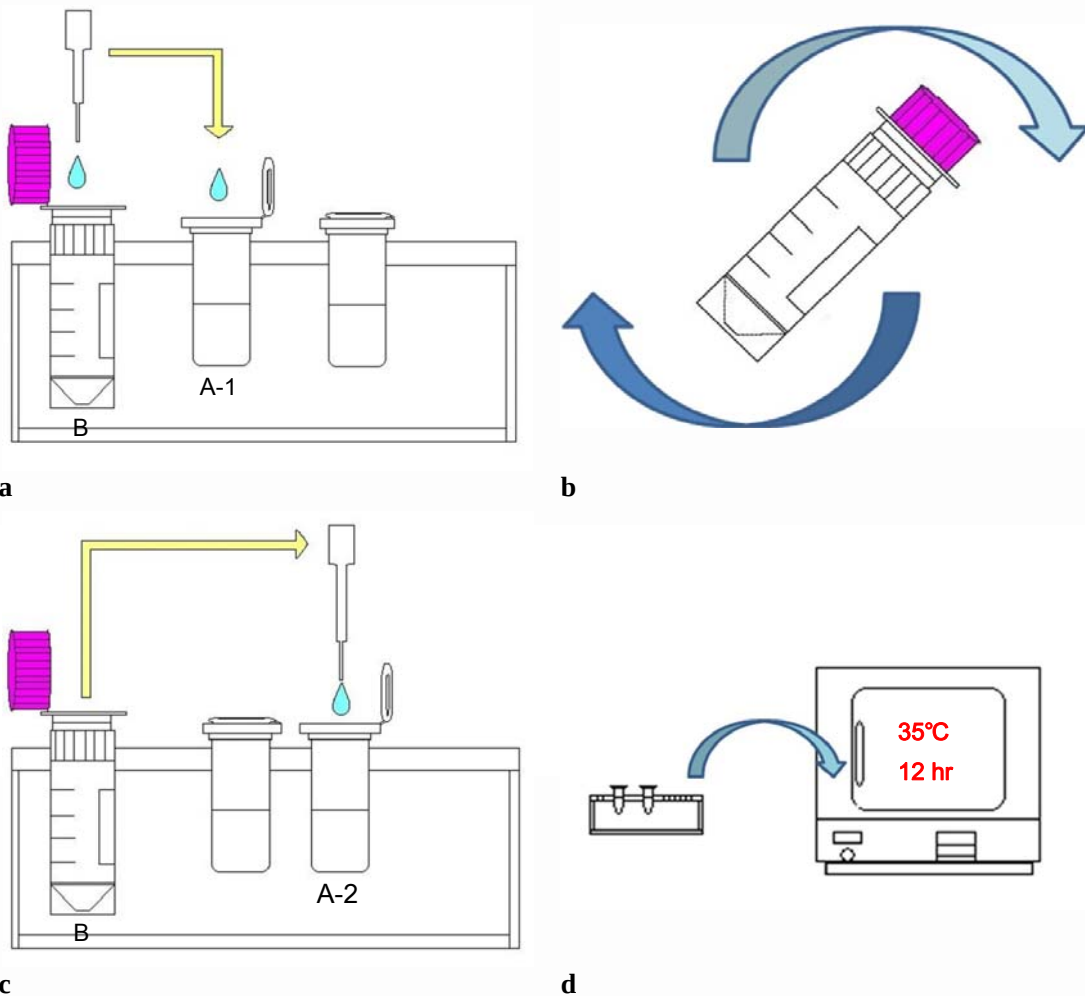


圖 2 使用「水質總生菌數檢測套組」的標準步驟：(a)以吸管取檢體 40 μ l 分別添加於試劑 A-1 與試劑 B 中；(b)將含試劑 B 與檢體之容器劇烈搖晃充分混合後；(c)再以另一吸管取試劑 B 與檢體之混合液 40 μ l，添加於試劑 A-2 中；(d)於 35°C 靜置 12 小時即可觀察結果，若 A-1 與 A-2 同時變色表示檢體中生菌數過高，不符合衛生標準

水質總生菌數檢測套組應用評估

一、實驗室內驗證

試製一批檢測標準分別為總生菌數 100、500 和 100,000 CFU/ml 的 TVBC-100、TVBC-500 及 TVBC-100,000，以不同濃度 ($10^1 - 10^5$ CFU/ml) 的水中常見衛生菌懸浮液，包括 *Aeromonas hydrophila*、*Escherichia*

coli、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica*、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 及 *Streptococcus iniae* 逐一測試，結果檢出情形均符合預期 (表 2)。

二、田間應用性評估

採集飲用水、自來水、游泳池水、冰品融化水、養殖池排放水及水源等，先以傳統平板計數法 (plate count method) 計算細菌

數目，再依本套組標準檢測程序進行檢測與判讀，結果平板計數法得到的總生菌數量與本套組之檢出情形均相符 (表 3)。

結論

本研發成果「水質總生菌數檢測套組」目前開發出 3 種商品原型，可適用於不同的場合：TVBC-100000 適用於檢測養殖場水源是否遭受汙染、並能協助鮮食料理之衛生管理及賣場冰品之衛生控管等；TVBC-500 適用於溫泉、游泳池及休閒商用水業者之定期自我評鑑；TVBC-100 適用於學校、公寓、

大樓水塔、自來水及飲用水之使用者自主管理；善用此一友善的檢測工具，以往不能自行檢測衛生條件的小商家及一般消費大眾，亦能輕易做好自主衛生管理的工作。

本套組係針對不具微生物專業訓練，且沒有微生物實驗室儀器設備的一般消費者而開發的簡單試劑，在應用上著重於協助使用者做好自主衛生管理 (如，可應用於檢知生魚片料理的某一環節出現汙染源，俾加以改善或排除)；對於需要立即檢知生菌數量 (如，已上桌之生魚片)，或需檢測確實生菌數目以決定產品價格者 (如，生乳酪農業)，不建議使用本套組。

表 2 不同濃度的參考菌株以「水質總生菌數檢測套組」檢定之結果

菌 種	細菌數 (CFU/ml)	反應結果 (A-1/A-2)		
		TVBC-100000	TVBC-500	TVBC-100
<i>Aeromonas hydrophila</i>	650000	+/+	+/+	+/+
	70000	+/-	+/+	+/+
	5700	+/-	+/+	+/+
	3500	+/-	+/+	+/+
	1570	+/-	+/+	+/+
	690	+/-	+/+	+/+
	340	+/-	+/-	+/+
	160	+/-	+/-	+/+
	70	+/-	+/-	+/-

表 3 不同樣本以標準方法及「水質總生菌數檢測套組」檢定之結果

樣 本	平板計數法生菌數 (CFU/ml)	反應結果 (A-1/A-2)		
		TVBC-100000	TVBC-500	TVBC-100
飲用水	0	-/-	-/-	-/-
自來水	15	+/-	+/-	+/-
游泳池水	630	+/-	+/+	+/+
冰品融化水	7600	+/-	+/+	+/+
養殖池排放水	440000	+/+	+/+	+/+
養殖池水源	5300	+/-	+/+	+/+