



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201135229 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：100105462

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/569 (2006.01)**

G01H3/04 (2006.01)

(30)優先權：2010/03/10 日本

2010-053586

2010/07/26 日本

2010-167194

(71)申請人：日本電波工業股份有限公司 (日本) NIHON DEMPA KOGYO CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：小山光明 KOYAMA, MITSUAKI (JP)；若松俊一 WAKAMATSU, SHUNICHI (JP)；忍和歌子 SHINOBU, WAKAKO (JP)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：13 共 42 頁

(54)名稱

微生物之檢測方法及微生物檢測裝置

METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS AND MICROORGANISM DETECTING APPARATUS

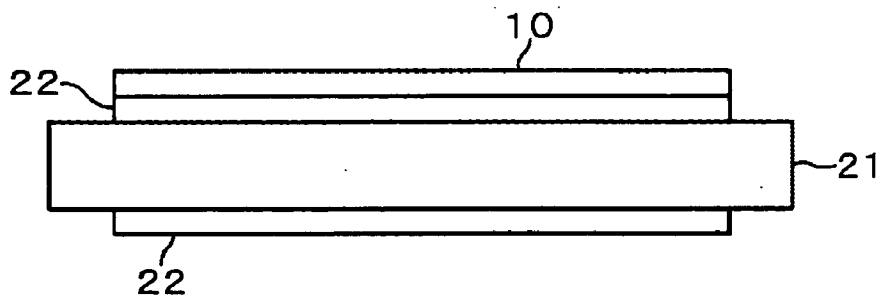
(57)摘要

本發明的課題是在不改變現有的培養方法下，可以在更短的時間內判別樣品液中有無菌體。本發明的解決手段係以形成於晶體振子的電極上之，例如厚度 0.1 μ m ~ 1 μ m 的滅菌洋菜培養基層培養樣品液中的菌體，計測振盪頻率。菌體如果增殖，晶體振子全體的質量會增加，振盪頻率會降低。因此透過監視有無此種經時變化，就可以迅速的辨識樣品液中有無菌體。

10：培養基層

21：水晶片

22：激勵電極





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201135229 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：100105462

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : G01N33/569 (2006.01)

G01H3/04 (2006.01)

(30)優先權：2010/03/10 日本

2010-053586

2010/07/26 日本

2010-167194

(71)申請人：日本電波工業股份有限公司 (日本) NIHON DEMPA KOGYO CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：小山光明 KOYAMA, MITSUAKI (JP)；若松俊一 WAKAMATSU, SHUNICHI (JP)；忍和歌子 SHINOBU, WAKAKO (JP)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：13 共 42 頁

(54)名稱

微生物之檢測方法及微生物檢測裝置

METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS AND MICROORGANISM DETECTING APPARATUS

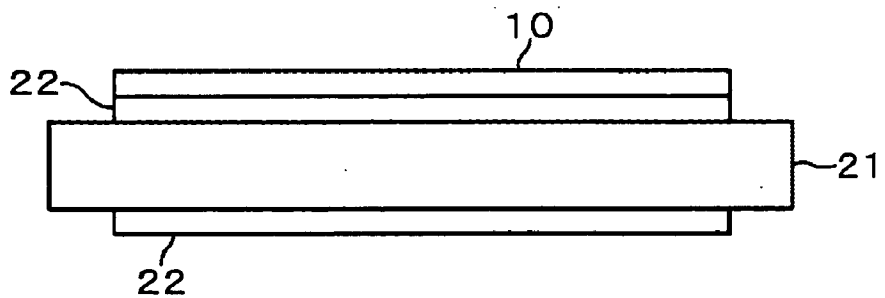
(57)摘要

本發明的課題是在不改變現有的培養方法下，可以在更短的時間內判別樣品液中有無菌體。本發明的解決手段係以形成於晶體振子的電極上之，例如厚度 0.1 μ m ~ 1 μ m 的滅菌洋菜培養基層培養樣品液中的菌體，計測振盪頻率。菌體如果增殖，晶體振子全體的質量會增加，振盪頻率會降低。因此透過監視有無此種經時變化，就可以迅速的辨識樣品液中有無菌體。

10：培養基層

21：水晶片

22：激勵電極



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係關於一種利用壓電振動器檢測有無例如菌體等的微生物之存在、微生物之增殖速度的方法，以及微生物檢測裝置。

【先前技術】

發明背景

近來，人們對食品安全的意識高漲，早期發現導致食品和飲料等發生劣變的劣變菌成為重要的課題。

迄今為止，判斷食品或飲料等是否含有劣變菌的方法，一直是採用Immuno Assay(免疫計測法)、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay：酵素結合免疫吸附法)、氣相色譜-質譜分析計(GC/MS：Gas Chromatograph/Mass Spectrometry)、液相色譜-質譜分析計(LC/MS:Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry)等的計測方法，但是測定的前處理工作煩雜且判定的精確度也難謂足夠。因此，通常是採用花費長時間培養劣變菌的方法。

該培養方法是在培養溫度30℃到60℃之下，以例如2天到4天的時間培養可能存在於樣品液中的劣變菌後，再進行目測檢查菌落的方法。但是，該方法很難適用於食品或飲料等需要在短時間內做出判定的試驗對象，會有製造後無法在短時間內出貨的問題。

專利文獻1中記載一種識別生物試料的方法，雖然記載

了藉測定其表面上的質量增加來直接決定結合到感測器陣列的成份，表面之質量增加的檢測法是晶體振子天平，生物試料是真菌、病毒、細菌的內容，但並非記載本發明的文獻。

先前技術文獻

專利文獻

【專利文獻1】特表2000-513436 (請求項1、7及15)

【發明內容】

發明概要

發明欲解決之課題

本發明是針對相關情況而完成的，其目的在於提供一種可以在更短時間內，簡單、迅速地檢測出樣品液中有無微生物和檢測微生物增殖速度的方法。

用以解決課題之手段

本發明係一種微生物的檢測方法，特徵在於其包含，採用兩面上形成有電極的壓電振動器，對形成於該壓電振動器一面側之電極上的吸附層，即培養基層，供給可能混入了檢測對象的微生物之樣品液的步驟和，

利用振動電路使該壓電振動器振動，測定壓電振動器之振動頻率的步驟，並且

根據前述振動頻率的經時變化求得微生物之有無及微生物之增殖速度的至少一者。

又，另一發明之微生物的檢測方法，特徵在於其包含，採用兩面上形成有電極的壓電振動器，對形成在壓電振動

器一面側之電極上的吸附層，即抗體層，供給可能混入了含有因為抗原抗體反應而吸附在前述抗體層的抗原之檢測對象的微生物的樣品液之步驟和，

對前述抗體層供給液體培養基的步驟和，

利用振動電路使該壓電振動器振動，測定壓電振動器的振動頻率的步驟，並且

根據前述振動頻率的經時變化求得微生物之有無及微生物之增殖速度的至少一者。

另外，列舉出前述檢測方法的具體例。

(a) 培養基層係層厚 $0.1\mu\text{m}$ 到 $1\mu\text{m}$ 的滅菌洋菜培養基。

(b) 前述壓電振動器具備，兩面上形成電極而構成之微生物檢測用的第1振動區域和，以彈性的介面層為媒介設在與前述第1振動區域不同的區域上，並在前述壓電振動器的兩面上形成電極而構成之參照用的第2振動區域，前述吸附層形成於前述第1振動區域之一面側的電極上，前述第2振動區域的任一電極上都未形成吸附層。

(c) 包含將前述振動頻率的測定值當作時間序列數據在顯示部顯示出來的步驟。

(d) 測定前述振動頻率之經時變化的步驟，特徵是其係在將壓電振動器置入具備溫度調節部的恆溫培養容器內的狀態下進行的。

(e) 微生物為菌體。

此外，另一發明是通過，採用兩面上形成有電極的壓電振動器，使檢測對象之微生物吸附在形成於該壓電振動

器一面側之電極上的抗體層，再根據得自該壓電振動器之振動頻率的經時變化求得微生物之有無及微生物之增殖速度的至少一者，藉以對檢測對象物進行檢測的檢測裝置，特徵在於其配備，

具備被供給樣品液的培養空間，並且用以在該培養空間內朝形成有前述抗體層的面支撐壓電振動器的培養容器和，

將可能混入了含有因為抗原抗體反應而吸附在前述抗體層上的抗原之檢測對象，即微生物的樣品液供給給該培養容器的樣品液供給部和，

將液體培養基供給給前述培養容器的培養基供給部和，

用於使前述壓電振動器振動的振動電路。

列舉前述檢測裝置的具體例。

(f) 壓電振動器具備，兩面上形成電極而構成，同時，在其一面側的電極上形成有前述吸附層之微生物檢測用的第1振動區域和，以彈性的介面層為媒介設在與前述第1振動區域不同的區域上，並且在前述壓電振動器的兩面形成電極而構成，同時，在那兩面電極的任一者上都未形成吸附層之參照用的第2振動區域，而且具備使前述第1振動區域振動的第1振動電路和，使前述第2振動區域振動的第2振動電路。

(g) 前述培養容器，具備用以將培養空間保持為恆溫的溫度調節部。

(h) 前述微生物為菌體。

發明效果

本發明係在形成於壓電振動器的電極上之培養基中培養樣品液中的微生物，並且將菌體的增殖當作振動頻率的變化來檢測。其結果，可以既簡便且快速地檢測有無微生物和增殖速度。

圖式簡單說明

第1圖係本發明之實施態樣的培養裝置之一部份的外觀斜視圖。

第2圖係前述培養裝置的各零件上面側分解斜視圖。

第3圖係前述培養裝置的縱斷面圖。

第4圖係本發明的實施態樣之在電極的上面形成培養基層之晶體振子的模式示意縱斷面圖。

第5圖係在添加了樣品液之培養基層中培養細菌的狀態下之前述晶體振子的模式示意縱斷面圖。

第6圖係前述培養裝置的整體構造之模式示意圖。

第7圖係前述晶體振子的頻率溫度特性之一例的特性圖。

第8圖係利用前述培養裝置的測定結果之一例的特性圖。

第9圖係第2實施態樣的微生物檢測裝置的構造示意說明圖。

第10圖係配置在前述微生物檢測裝置的培養器內之晶體振子的構造之示意模式圖。

第11圖(a)、(b)係前述微生物檢測裝置中所使用的晶體振子及配線基板的示意斜視圖。

第12圖係具備前述晶體振子之壓電感測器的示意斜視圖。

第13圖(a)、(b)係利用前述微生物檢測裝置的測定結果之一例的示意特性圖。

【實施方式】

用以實施發明之態樣

以下將用圖式就本發明之菌體檢測方法的實施態樣做說明。第1圖及第2圖分別是該實施態樣中使用的培養裝置的一部份之外觀斜視圖及分解斜視圖。7是培養器(培養容器)，由支持體71和蓋體81組成，其等之間，如第3圖中也有所示，密封部件3A、配線基板3、晶體振子2、水晶壓制部件4各零件依此順序由下開始重疊地構成。

壓電振動器，即晶體振子2係如第2圖所示，由壓電片，即圓形的水晶片21、激勵電極22及導出電極24、25(第4圖中未顯示)構成。在水晶片21的表面側上箔狀的激勵電極22形成比該水晶片21更小的圓形，而，箔狀的導出電極24的一端側連接到前述激勵電極22。該導出電極24沿著水晶片21的端面彎曲並且繞進水晶片21的內側。另一方面，激勵電極22及導出電極25也在水晶片21的內側以和表面側同樣的佈置被連接。前述激勵電極22及導出電極24、25的等效厚度為，例如0.2 μm ，可以採用例如金或銀等作為電極材料。

如第4圖所示，在設於水晶片21上的表面側(接觸樣品

液側)激勵電極22上，形成有成為微生物，例如菌體，即劣變菌的培養環境之吸附層，即培養基層10。該培養基層10可以採用例如滅菌洋菜培養基。該洋菜培養基的層厚為例如， $0.1\mu\text{m}$ 到 $1\mu\text{m}$ 。這是因為層厚在 $0.1\mu\text{m}$ 以下時不利於菌的增殖，而層厚若超過 $1\mu\text{m}$ ，則因洋菜粘度高晶體振子不易驅動。在激勵電極22上形成培養基層10的技術係如下所述地進行。首先，在水晶晶片的表裡兩面，於和多數個水晶片的形成位置相對應的位置上形成電極圖案。接著，將該水晶晶圓以晶圓中心和旋轉中心對準的狀態水平地保持在自由旋轉的真空吸盤(具備真空吸附機能的旋轉台)上。然後將含有調整成預定洋菜濃度的培養基的溶液供給到晶圓中心，同時利用連接到該旋轉吸盤之旋轉軸的馬達使該旋轉吸盤旋轉，藉此使溶液在晶圓表面擴散而形成液體薄膜。因為該液體膜的厚度可以回應轉數做調整，所以通過調整該轉數，可以在晶圓上形成層厚 $0.1\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 的培養基層。之後，利用切割技術裁切晶圓而獲得單一零件的晶體振子。再者，雖然在圖式中描繪了只在激勵電極上形成培養基層10的情形，但是如果利用該旋轉塗布法就可以在整個水晶片表面形成培養基層10。即使在這種情況下，利用電極面積對水晶片表面全體的比例提高的構造，培養基的重量並不會對晶體振子的驅動帶來影響。將這個時刻之該晶體振子的振動頻率當作檢測微生物時的基準。此時，如果洋菜濃度是固定的，黏性阻力就視為固定，應用KANAZAWA-GORDON的公式。

回到第2圖，配線基板3由例如印刷基板構成，其表面上間隔設置著電極31、電極32。在前述電極31、32之間，如後所述地形成貫通孔33，係用以構成品體振子2內側的激勵電極22所面對之氣密空間的凹部，其口徑的尺寸是能容納激勵電極22。在配線基板3的後端側設有接續端子部34、35，並分別以導電通路為中介電氣性連接到電極31、32。密封部件3A由中央形成凹部的圓形體構成，具有封閉貫通孔33下面以構成品體振子2內側空氣的氣密閉空間之作用。晶體振子2的導出電極24、25係以導電性接著劑做電氣性連接。

水晶壓制部件4係採用彈性材料，例如矽氧橡膠做成與配線基板3對應的形狀。水晶壓制部件4下面係如第3圖所示，被構造成可以將晶體振子2之激勵電極的周圍部份壓抵在支持體71側。水晶壓制部件4的作用是將晶體振子2壓抵在形成於配線基板3之貫通孔33的外側區域，將蓋體81安裝到支持體71時，水晶壓制部件4會將晶體振子2及配線基板3壓抵在支持體71側。

蓋體81係如第3圖所示，通過形成於下面的凹部82和設在支持體71側的突起75互相嵌合而相對於支持體71形成定位，同時，螺絲83旋進支持體71側的孔74，從而被固定住。另外，在構成培養器7的蓋體81及支持體71內設有溫度調節部，即加熱器60，利用該加熱器60，將培養基層所在氛圍調整成預先設定的溫度氛圍氣(恆溫氛圍氣)。

支持體71設有容納保持配線基板3的凹部72，在該凹部

72中接合突起73在垂直方向伸長並接合到配線基板3的接合孔37a、37b及水晶壓制部件4的接合孔46a、46b，固定住配線基板3和水晶壓制部件4的位置。

接著就培養裝置的電路部份及信號處理部份做說明；第6圖中50是振動電路，51是信號處理部，52是個人電腦，此個人電腦52的畫面構成顯示部。

振動電路50電氣性地連接到形成於配線基板3上的電極34、35，並且設置在例如，支持體71上。信號處理部51將來自振動電路50的頻率信號進行類比/數位轉換(A/D轉換)，進行預定的信號處理以計測頻率信號的頻率。

接著，將就採用做成這樣的培養裝置來檢測樣品液中是否存在目標菌體的步驟做說明。在此例中，菌體是劣變菌，並備妥讓劣變菌通過的濾器，使樣品液通過該濾器。接著以例如，玻璃吸管採取通過的液體，滴到安裝在支持體71上的之前述晶體振子2上的培養基層10的表面，薄薄的展開。之後，將蓋體安裝到支持體71上，利用加熱器60將培養器7內的溫度(晶體振子2所在氬圍氣的溫度)加熱到例如40~60℃，在此例是加熱到45℃。

然後，維持前述氬圍氣在氣密狀態，培養基層10上的樣品液蒸發而使得例如該氬圍氣成為飽和水蒸汽氬圍氣。另一方面，根據時間序列擷取晶體振子2之振動頻率的計測值傳到個人電腦52，在其畫面中顯示出該時間序列數據。培養器7內直到樣品液的水分蒸發達到飽和為止，晶體振子2的電極上之樣品液及培養基層10的合計質量雖然會改

變，但是一旦飽和氬圍氣被確認，合計質量就會穩定下來。而，如第5圖所示，塗布在培養基層10的樣品液中如果存在劣變菌(檢測對象物15)，就會吸取培養基層的養分並增殖，因此電極上的部分，質量從開始增殖起會增加，振動頻率變大。因此，若將振動頻率的時間序列數據圖表化顯示在例如個人電腦52的畫面，則以例如目測檢測振動頻率的開端就可以確認劣變菌的存在。

另外，通過求出振動頻率的增加程度可以獲得劣變菌的增殖速度。此時，如果預先求得振動頻率與搭載在晶體振子2的電極22上之搭載物的質量間的關係，就可以求得例如每個預定的時間間隔的增殖速度。此外，將分別連通前述氬圍氣的送氣管(送氣通路)、排氣管(排氣通路)連接到培養器7(未圖示出)，在開放排氣管的狀態下從送氣管供給氣體，例如乾燥空氣，以便若干程度地除去晶體振子2上的水分。接著，在培養器7內的設定溫度下，將水蒸汽只比例如飽和水蒸汽氬氛氣略少的空氣送進去，關閉設在送氣管及排氣管上的各個閥門，晶體振子2上的水分稍微蒸發而前述氬圍氣變成飽和水蒸汽之後，再進行振動頻率的計測也可以。

再者，關於培養溫度的設定值，宜在菌體的生長溫度範圍內設定成晶體振子之頻率溫度特性最安定的溫度。第7圖中所示為AT切割的晶體振子的頻率溫度特性之一例。在該情況中，生長溫度範圍內每單位溫度變化的頻率變化量最小的溫度，是曲線圖的極值時的溫度45°C，宜將培養溫

度設定在該溫度。樣品液如果是飲料可以不做處理直接通過前述濾器做成，但是在檢查食品中有無劣變菌的情況下，要用以法定方法為基準的方法培養劣變菌或將劣變菌直接混入水中後，再使之通過前述濾器以做成樣品液。

如果採用此種菌體檢測方法，因為將樣品液滴到培養基層10，等頻率穩定之後，振動頻率會在例如數十分鐘後開始增加，故可在短時間內檢測有無菌體，從而可以快速地檢測出食品或飲料中是否存在劣變菌。而且操作簡單，測定精度也高。

再者，本發明中的菌體係指真菌及細菌等。

採用上述培養裝置，如前所述地處理，使含有劣變菌的樣品液附著在晶體振子2的培養基層10，待振動頻率穩定之後，測定相對於該頻率之頻差的經時變化。測定結果示於第8圖。晶體振子係採用直徑 $\phi 8.7\text{mm}$ ，9MHz的AT切割晶體振子(電極直徑 $\phi 5.0\text{mm}$)，以10mHz/秒計測頻率。採用 *Alicycobacillus acidoterrestris* 的標準株(ATCC49025)作為檢測對象物的菌株，在層厚0.5 μm 的晶體振子上的洋菜培養基中攝氏45度下進行培養。此外，將酵母萃取液、葡萄糖、各種微量元素等添加到該洋菜中。如第8圖所示，從培養開始約0.5小時後，頻率降低1Hz，之後固有頻率也會繼續下降。這是由於劣變菌增殖造成質量增加的結果，由此可以確認劣變菌的增殖。再者，用來檢測頻率的裝置採用的是申請人所販賣之，可極高精確度地測定頻率的裝置(登錄商標NAPiCOS システム)。

另外，因為事先已求出表示重量與振動頻率的關係之校準曲線，可以將頻率差轉換成質量增加量，故可將各培養經過時點中之質量變化速度，亦即各培養經過時點中之檢測對象物的增殖速度數值化。

接著，將就利用抗體來檢測菌體等之微生物的第2實施態樣進行說明。本例之微生物檢測方法係在晶體振子2a之激勵電極22上設置抗體層作為吸附層，在該晶體振子2a的載置氛圍氣中供給培養基溶液(液體培養基)進行微生物培養這一點，與在激勵電極22上形成培養基層10再進行培養之第1實施態樣的檢測方法不同。第9圖所示為利用第2實施態樣之微生物檢測方法的微生物檢測裝置70之構成示意圖。第9圖中，與第1實施態樣共通的構成要素係賦予和第1圖～第6圖所賦予者相同的符號。

示於第9圖的微生物檢測裝置70中，在培養器700是用水晶壓制部件4及密封部件3A將由晶體振子2a和配線基板3a構成的壓電感測器保持在培養器700內這一點，與第2圖、第3圖所示的培養器7是共通的。另一方面，該培養器700的蓋體81上設有用於將樣品液供給到該培養器700內的供給端口704，以及用於從培養器700內排出樣品液的排出端口705，可以從外部供給樣品液和培養基溶液這一點，有異於將樣品液塗布在培養基層10並配置在封閉的氛圍內之第1實施態樣的培養器7。

培養器700的供給端口704具備既防止樣品液和培養基溶液混合，又能暫時保存各液體之未圖示出的樣品環路，

並且與在由保持培養基溶液的注射泵等所構成之培養基溶液供給部701和，由保持樣品液的注射器等所構成之樣品液供給部702之間切換供給端口704的連接端之供給液切換部703連接。另一方面，排出端口705通過吸泵707連接到排液受槽708，利用該吸泵707進行對培養器700內的供給及排出培養基溶液或樣品液。

另外，本例的培養器700在和連接到晶體振子2a的振動電路50一起配置在例如，熱風式恆溫箱706內，藉以進行晶體振子2a的配置氛圍氣之溫度調節的點上，與採用加熱器60進行溫度調節的第1實施態樣不同。

而晶體振子2a連接到振動電路50，並經由信號處理部51連接到個人電腦52這一點則與第6圖所示的第1實施態樣相同。

此處，本實施態樣的晶體振子2a係如第10圖、第11圖(a)、第11圖(b)所示，設在水晶片21表裡兩面的激勵電極22a、22b設成2組，分別形成第1振動區域20a及第2振動區域20b。而第1振動區域20a表面側之激勵電極22a上面形成有抗體層11，其黏附著以檢測對象物15即菌體的表面所特異性地含有之膜蛋白質等為抗原，並與該抗原發生反應的抗體，並構成使菌體吸附在激勵電極22a表面之微生物檢測用的振動區域。另一方面，第2振動區域20b之激勵電極22b的表面形成有阻斷層12，其由不易與前述抗原發生反應的蛋白質等組成，菌體難以吸附在該激勵電極22b的表面。因此第2振動區域20b構成了用來檢測非起因於微生物的吸附

而是起因於其他因素(例如後述之環境變化)之振動頻率變化的參考用振動區域。

抗體對激勵電極22a的固定是將含有前述抗體的試藥供給到例如，另一側的激勵電極22b預先受到屏蔽之晶體振子2a的上面側，藉而在露出來的激勵電極22a的表面形成抗體層11。往另一側的激勵電極22b形成阻斷層12的做法也同樣，是採用先屏蔽形成抗體層11的激勵電極22a之後，再使該另一側的激勵電極22b接觸含有會成為阻斷層之蛋白質的試藥的方式等。

而，如第12圖所示，晶體振子2a配置在能夠從第1振動區域20a及第2振動區域20b各自獨立地取得振動頻率的配線基板3a上，各區域20a、20b連接到不同的振動電路50。在第11圖、第12圖所示的例子中，表面側的激勵電極22a、22b經由共通的導出電極24及配線基板3側的電極32被拉到接續端子部35，連接在振動電路50一側的接地線上。另一方面，內面側的激勵電極22、22b經由不同的導出電極25及配線基板3側的電極31被拉到接續端子部34，並連接到各自獨立的振動電路50。

例如產氣莢膜梭菌等的芽孢菌即使在50°C~70°C這樣比較高的溫度條件下也能增殖，成為在這樣的溫度條件下所保存的食品發生劣變的主要原因。因此，以芽孢菌作為檢測對象物15時，必須在和食品的保存狀態相同的溫度條件下，保持使晶體振子2a與樣品溶液接觸，並測定是否存在吸附於抗體層11上的菌體和有無菌體的增殖。另一方

面，已知晶體振子2a的振動頻率特性會隨著周圍的溫度變化和流體的粘度變化等(簡便起見，以下稱環境變化)發生變化，但是要利用短時間的測定來嚴格區分振動頻率的變化是源於菌體吸附在抗體層11，還是因為恆溫箱706中溫度控制有變動或周圍的流體有粘度變化，是很困難的。

因此，本實施態樣的微生物裝置70是將設置了菌體要吸附的抗體層11之第1振動區域20a和，設置了菌體不吸附的阻斷層12之第2振動區域20b，配置在相同的環境下。藉此，從第1振動區域20a可以取得起因於菌體的吸附、環境變化這兩者之振動頻率的變化，另一方面從第2振動區域20b可以取得排除菌體的吸附而僅起因於周圍的環境變化之振動頻率的變化。因此，通過擷取從第1、第2振動區域20a、20b分別取得之振動頻率的差，可以從第1振動區域20a的振動頻率排除環境變化的影響，取得僅因菌體的吸附而引起的振動頻率的變化。

以下將就上述微生物檢測裝置70的作用做說明。首先，在培養器700內安裝壓電感測器，並將恆溫箱706的溫度設定成培養器700及振動電路50周圍的溫度會成為例如樣品液中所含食品的保存溫度。恆溫箱706的溫度穩定之後，將供給液切換部703連接到培養基溶液供給部701側，然後讓吸泵707運轉，在培養器700內及其所連接的配管內注滿作為送液緩衝液的培養基溶液。然後讓振動電路50運轉，取得來自第1、第2振動區域20a、20b的振動頻率。

然後，將供給液切換部703的連接端切換到樣品液供給

部702，向培養器700供給樣品液，在培養器700內被樣品液置換掉的時點暫時讓吸泵707停止作動。此時，當樣品液中含有會表現出與抗體層11的抗體發生抗原抗體反應的芽孢菌等之劣變菌時，該劣變菌會吸附到抗體層11，如第13圖(a)、第13圖(b)中標記為「劣變菌吸附」的期間所示，第1振動區域20a的振動頻率下降。

另一方面，在設有阻斷層12的第2振動區域20b側，因為幾乎不會發生劣變菌的吸附，所以在前述期間看不到振動頻率的變化。此處，為求簡化，在第13圖(a)、第13圖(b)所示的各例中，從培養基溶液供給部701供給的培養基溶液及從樣品液供給部702供給的樣品液，都預先調整成和用恆溫箱706調整過溫度的培養器700內的溫度大致相同的溫度。而且培養基溶液、樣品液的粘度也調和成大致相同，做成不會發生起因於培養基溶液-樣品液的切換之振動頻率變化的性質。

如此，經過預先設定的時間，經過足夠量的微生物能夠吸附在抗體層11的時間後，再度將供給液切換部703的連接端切換到培養基溶液供給部701，然後讓吸泵707運轉，將培養器700內用培養基溶液加以置換。如此，一旦培養器700內形成被培養基溶液充滿的狀態，便再次停止吸泵707讓培養器700內成為靜置狀態。此處，吸附在抗體層10上的劣變菌活著的情況下，劣變菌會從培養基溶液吸取養分而增殖。此時劣變菌的增殖因為是發生在吸附該劣變菌的抗體層11的表面附近，所以在培養器700內為靜置狀態的情況

下，增殖的劣變菌會在培養基溶液內擴散，其中一部份則吸附在抗體層11上。

這個結果，如第13圖(a)中標記為「劣變菌增殖」的期間所示，因增殖的劣變菌的吸附，隨著時間的經過第1振動區域20a側的振動頻率下降。另一方面，在設有阻斷層12的第2振動區域20b側，依然幾乎看不到振動頻率的下降。而，在第13圖(a)中記載為「劣變菌吸附」及「劣變菌增殖」的期間，在有溫度變化和粘度變化等培養器700內之環境變化的情形中，在載置於共通的溫度、培養基溶液氛圍氣內的第1、第2振動區域20a、20b，伴隨著這些環境變化所發生之振動頻率變化幅度大致為相同程度。

因此，例如，通過擷取得自第1、第2振動區域20a、20b的振動頻率之頻差的絕對值，可以抵消伴隨環境變化而產生之振動頻率的變化，取得純粹因為劣變菌的吸附而發生之振動頻率的變化。然後，和第1實施態樣一樣，用預先求得之顯示劣變菌的重量與振動頻率下降量的關係之校準曲線等來確定劣變菌的吸附量。

另外，起因於環境變化之第1、第2振動區域20a、20b的振動頻率的變化量也有嚴格來說並非等量的情形，在此情形下，將預先求得的比例常數乘以各振動頻率，並使溫度和粘度等之每單位變化的振動頻率變化量彼此達到一致，之後取兩個振動頻率的頻差，可藉而正確地抵消伴隨環境變化而產生的振動頻率的變動。

此外，劣變菌的增殖如果呈指數函數地進展，則培養

基溶液內劣變菌的濃度升高，劣變菌沉積在阻斷層12上，同時，沉積在第2振動區域20b上的劣變菌也開始增殖。結果，會有如同第13圖(a)中標記為「在第2振動區域20b也發生增殖」的期間所示，第2振動區域20b側的振動頻率也開始降低的情形。但是，如前所述，在第2振動區域20b側，振動頻率直到在該區域20b中觀察到劣變菌的增殖為止的期間中(相當於第13圖(a)中的「劣變菌吸附」及「劣變菌增殖」的期間)幾乎不發生變化。因此，若利用這些期間內得到的數據，即可正確地進行有無劣變菌及增殖速度的計測。

而在樣品液中所含劣變菌已死的情況下，如第13圖(b)所示，在標記為「劣變菌吸附」的期間第1振動區域20a的振動頻率雖然下降，但因為該劣變菌並不增殖，所以該第1振動區域20a的振動頻率不會再發生變化。另外，伴隨劣變菌幾乎不吸附的情形，第2振動區域2b的振動頻率也維持在一定的數值。即使在這樣的情況下因環境的變化引起之振動頻率的變化，也可以利用從第1、第2振動區域20a、20b取得之振動頻率的頻差的絕對值來抵消。

若利用第2實施態樣的微生物檢測裝置70，則在培養器700內配置設有抗體層11的晶體振子2a，將樣品液供給給該培養器700再根據設有抗體層11的晶體振子2之振動頻率的變化來檢測有無檢測對象物之微生物或微生物和增殖速度。在習知所實行的以光學顯微鏡等觀察在洋菜培養基上增殖的菌體等之微生物的方法中，為確定有無微生物和增殖速度需要例如3日~1周左右的試驗時間。相對於此，使

用晶體振子2a等之壓電振動器的微生物檢測方法靈敏度高，可以檢測例如奈克這樣非常微量的質量變化。因此不須要等待微生物增殖到可以進行光學觀察，只要在例如10小時～2日這樣比現有技術短非常多的時間就可以檢測檢測對象物的有無和增殖速度。

另外，在使用靈敏度高之晶體振子2a的本方法中，晶體振子2a周圍的溫度變化、與晶體振子2a接觸的液體(樣品液或培養基溶液)的溫度變化和粘度變化等，這些環境變化對晶體振子2a的振動頻率的影響很大。此處，在第2實施態樣的微生物裝置70中，因為採用的晶體振子2a具備設有用以吸附微生物的抗體層11之微生物檢測用第1振動區域20a和，不吸附微生物之參照用的第2振動區域20b，所以擷取自兩振動區域20a、20b之振動頻率的頻差，藉以抵消環境變化的影響，可以正確地把握因微生物的吸附所引起的振動頻率的變化。

此處，示於第1實施態樣的培養裝置和示於第2實施態樣的微生物檢測裝置70的各構成，可依需要適當地做取代。例如，可以將第1實施態樣中所用的加熱器60設在第2實施態樣的微生物裝置70中，反之亦可將第1實施態樣的培養器7設在恆溫室706內。另外，將所謂的流動注射方式之第2實施態樣的微生物裝置70做成像第1實施態樣中的培養器7一樣的批式構造也可以。這種情況下，在沒有設置例如供給端口704和排出端口705的培養器700內配置預先在抗體層11上塗布了樣品液的晶體振子2a，之後，對培養器700

內供給培養基溶液後，用蓋體81做支持體71的蓋子，再將該培養器內部的溫度調整到預先設定的溫度藉以進行微生物的檢測。除此之外，第1實施態樣的培養裝置中也可以使用應用了具備微生物檢測用的第1振動區域20a和參照用的第2振動區域20b的晶體振子2a之壓電感測器(以下，稱雙感測器)。與此相反，在環境變化的影響不會構成問題的情況下，第2實施態樣的微生物裝置70中也可以使用第2圖中記載之未設置參照用的振動區域20b之晶體振子2來代替雙感測器。

【圖式簡單說明】

第1圖係本發明之實施態樣的培養裝置之一部份的外觀斜視圖。

第2圖係前述培養裝置的各零件上面側分解斜視圖。

第3圖係前述培養裝置的縱斷面圖。

第4圖係本發明的實施態樣之在電極的上面形成培養基層之晶體振子的模式示意縱斷面圖。

第5圖係在添加了樣品液之培養基層中培養細菌的狀態下之前述晶體振子的模式示意縱斷面圖。

第6圖係前述培養裝置的整體構造之模式示意圖。

第7圖係前述晶體振子的頻率溫度特性之一例的特性圖。

第8圖係利用前述培養裝置的測定結果之一例的特性圖。

第9圖係第2實施態樣的微生物檢測裝置的構造示意說

明圖。

第10圖係配置在前述微生物檢測裝置的培養器內之晶體振子的構造之示意模式圖。

第11圖(a)、(b)係前述微生物檢測裝置中所使用的晶體振子及配線基板的示意斜視圖。

第12圖係具備前述晶體振子之壓電感測器的示意斜視圖。

第13圖(a)、(b)係利用前述微生物檢測裝置的測定結果之一例的示意特性圖。

【主要元件符號說明】

2...晶體振子	22...激勵電極
2a...晶體振子	22a、22b...激勵電極
3...配線基板	24、25...導出電極
3a...配線基板	31、32...電極
3A...密封部件	33...貫通孔
4...水晶壓制部件	34、35...接續端子部、電極
7...培養器	37a、37b...接合孔
10...培養基層	46a、46b...接合孔
11...抗體層	50...振動電路
12...阻斷層	51...信號處理部
15...檢測對象物(劣變菌)	52...個人電腦
20a...第1振動區域	60...加熱器
20b...第2振動區域	71...支持體
21...水晶片	72...凹部

73...接合突起

74...孔

75...突起

81...蓋體

82...凹部

83...螺絲

700...培養器

701...培養基溶液供給部

702...樣品液供給部

703...供給液切換部

704...供給端口

705...排出端口

706...熱風式恆溫箱

707...吸泵

708...排液受槽

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100105462

※申請日：100.2.18

※IPC 分類：

G01N 33/569 (2006.01)

G01H 3/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

微生物之檢測方法及微生物檢測裝置

METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS AND
MICROORGANISM DETECTING APPARATUS

二、中文發明摘要：

本發明的課題是在不改變現有的培養方法下，可以在更短的時間內判別樣品液中有無菌體。

本發明的解決手段係以形成於晶體振子的電極上之，例如厚度 $0.1\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 的滅菌洋菜培養基層培養樣品液中的菌體，計測振盪頻率。菌體如果增殖，晶體振子全體的質量會增加，振盪頻率會降低。因此透過監視有無此種經時變化，就可以迅速的辨識樣品液中有無菌體。

三、英文發明摘要：

七、申請專利範圍：

1. 一種微生物的檢測方法，特徵在於其包含，

採用在兩面形成電極的壓電振動器，並對形成於該壓電振動器之一面側的電極上之吸附層，即培養基層，供給可能混入了檢測對象之微生物的樣品液的步驟和，

利用振動電路使壓電振動器振動，測定壓電振動器之振動頻率的步驟；並且

根據前述振動頻率的經時變化求得微生物之有無及微生物之增殖速度的至少一者。

2. 如申請專利範圍第1項記載之微生物的檢測方法，特徵在於前述培養基層為層厚 $0.1\mu\text{m}$ 到 $1\mu\text{m}$ 的滅菌洋菜培養基。

3. 一種微生物的檢測方法，特徵在於其包含，

採用在兩面形成電極的壓電振動器，並對形成於壓電振動器之一面側的電極上之吸附層，即抗體層，供給可能混入了具有會因抗原抗體反應而吸附於前述抗體層之抗原的檢測對象，即微生物的樣品液之步驟，和

對前述抗體層供給液體培養基的步驟，和

利用振動電路使壓電振動器振動，測定壓電振動器之振動頻率的步驟；並且

根據前述振動頻率的經時變化求得微生物之有無及微生物之增殖速度的至少一者。

4. 如申請專利範圍第1或3項中記載之微生物的檢測方法，特徵在於前述壓電振動器具備在兩面形成電極而構

成之微生物檢測用的第1振動區域和，以彈性的介面層為媒介而設置在不同於前述第1振動區域的區域上，並且在前述壓電振動器的兩面形成電極而構成之參考用的第2振動區域；前述吸附層係形成於前述第1振動區域之一面側的電極上，而前述第2振動區域的任一個電極上都未形成吸附層。

5. 如申請專利範圍第1或3項中記載之微生物的檢測方法，特徵在於其包含將前述振動頻率的測定值當做時間序列數據顯示在顯示部的步驟。
6. 如申請專利範圍第1或3項中記載之微生物的檢測方法，特徵在於，測定前述振動頻率之經時變化的步驟係在將壓電振動器置入備有溫度調節部之恆溫培養容器內的狀態下進行。
7. 如申請專利範圍第1或3項中記載之微生物的檢測方法，特徵在於前述微生物為菌體。
8. 一種檢測裝置，特徵在於其係，

採用在兩面形成電極的壓電振動器，使檢測對象物之微生物吸附在形成於該壓電振動器之一面側的電極上之抗體層，再根據得自該壓電振動器之振動頻率的經時變化求得微生物之有無及微生物之增殖速度的至少一者，藉此對檢測對象物進行檢測的檢測裝置，並且具備

備有被供給樣品液之培養空間，並且使形成有前述抗體層的面朝向該培養空間地保持該壓電振動器的培

養容器，和

對該培養容器供給可能混入了具有因抗原抗體反應而吸附在前述抗體層的抗原之檢測對象，即微生物，的樣品液之樣品液供給部，和

對前述培養容器供給液體培養基之培養基供給部，和

用於使前述壓電振動器振動的振動電路。

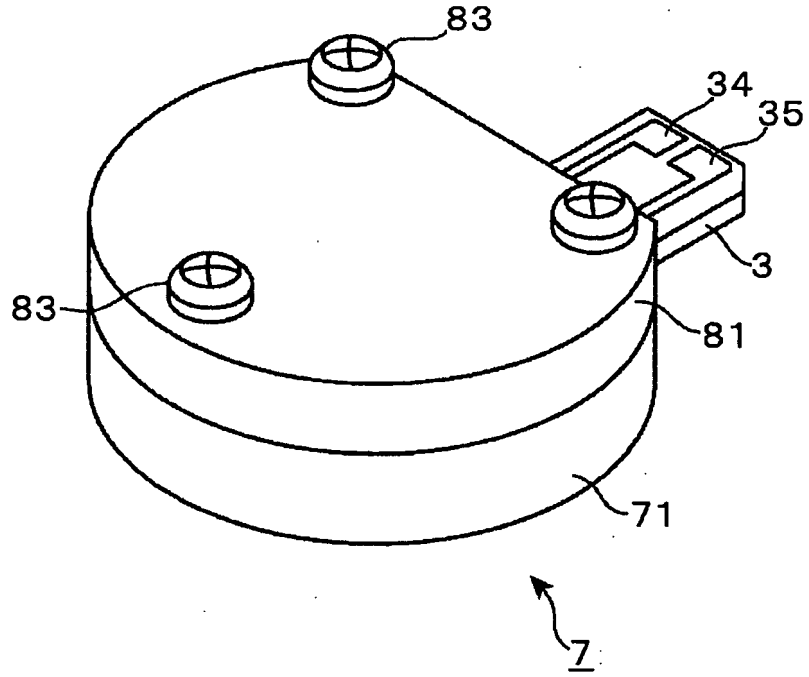
9. 如申請專利範圍第8項中記載的檢測裝置，特徵在於前述壓電振動器於兩面形成電極，並且具備在其一面側的電極上形成有前述吸附層之微生物檢測用的第1振動區域和，以彈性的介面層為媒介而設在不同於前述第1振動區域的區域上，在前述壓電振動器的兩面形成電極而構成，並且在該兩面的電極之任一者都未形成吸附層之參考用的第2振動區域，而且

具備使前述第1振動區域振動的第1振動電路和，使前述第2振動區域振動的第2振動電路。

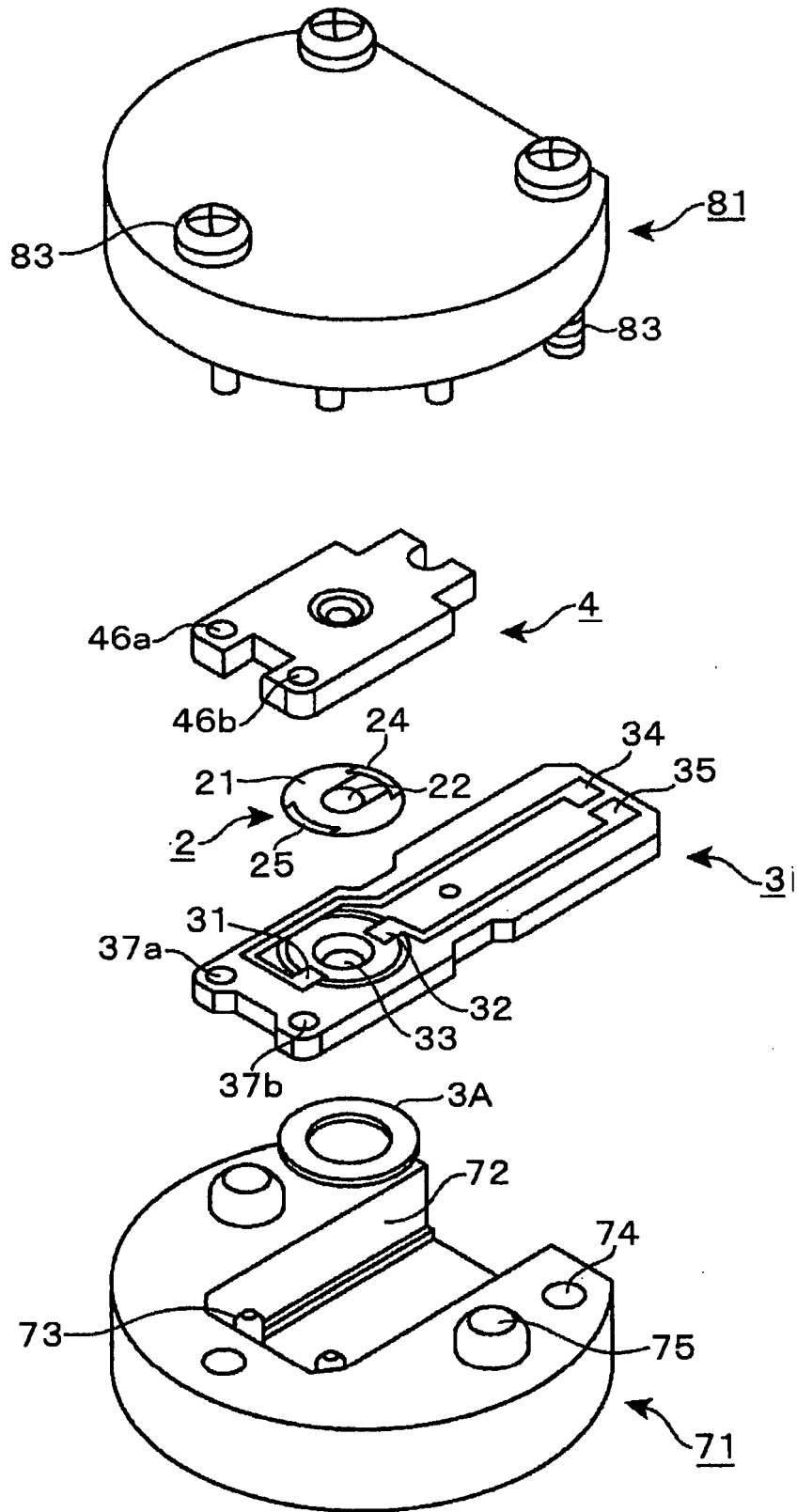
10. 如申請專利範圍第8項記載的檢測裝置，特徵在於前述培養容器具備用以將培養空間內保持恆溫的溫度調節部。

11. 如申請專利範圍第8項中記載的檢測裝置，特徵在於前述微生物為菌體。

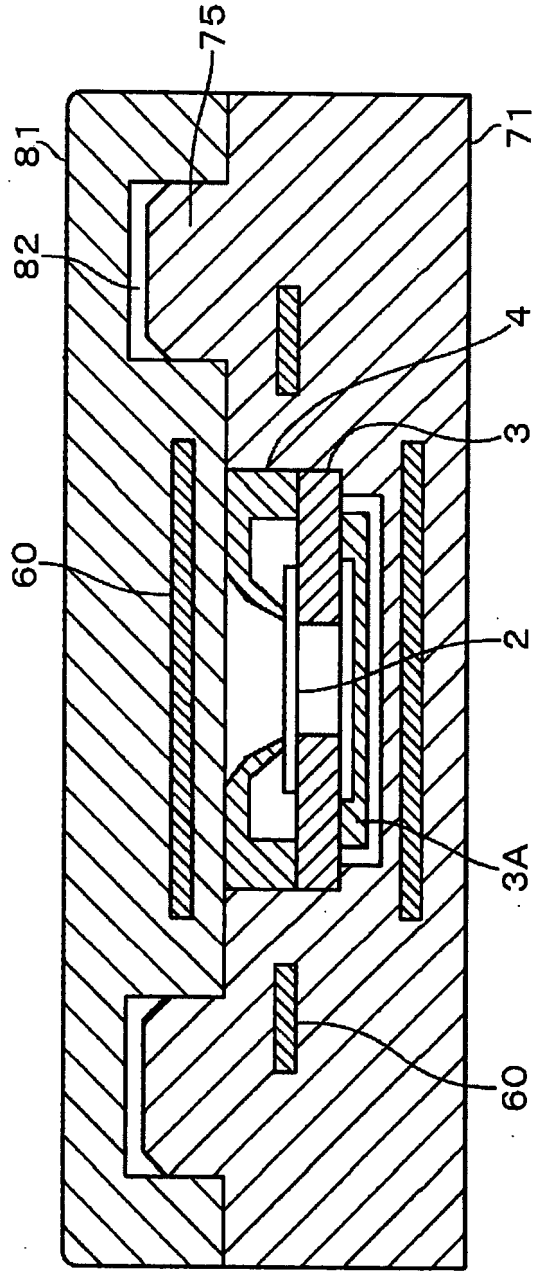
第 1 圖



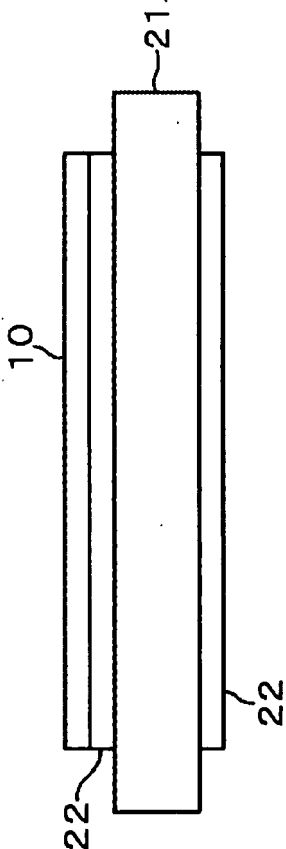
第 2 圖



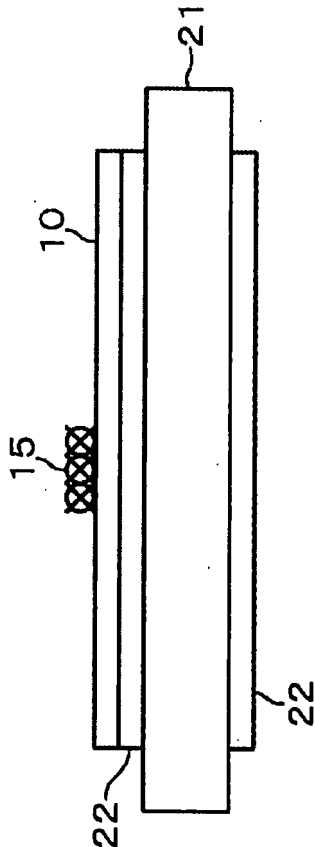
第 3 圖



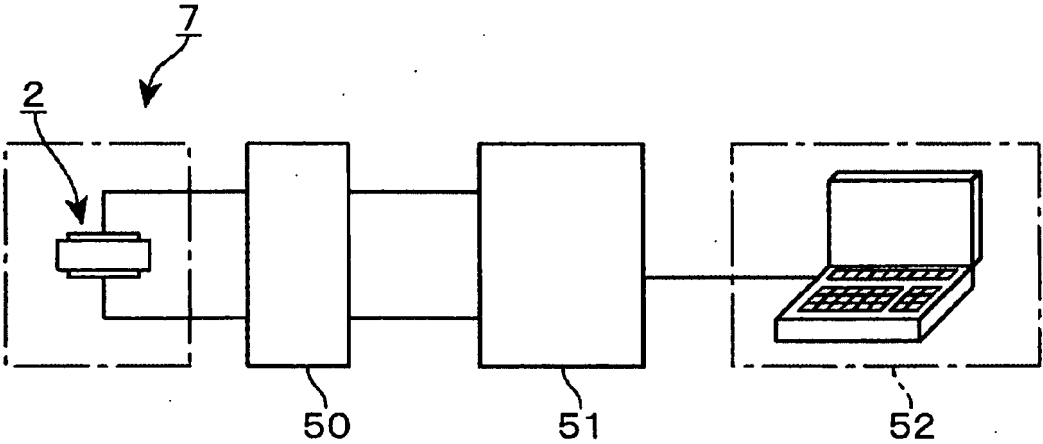
第 4 圖



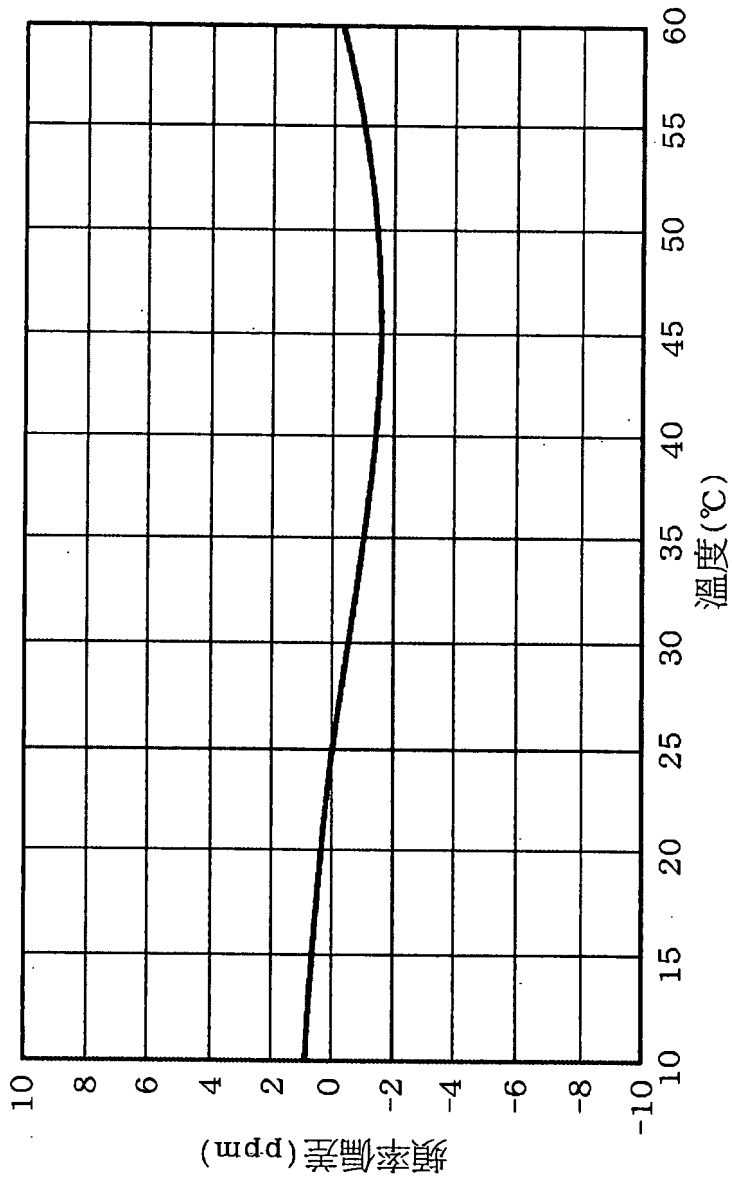
第 5 圖



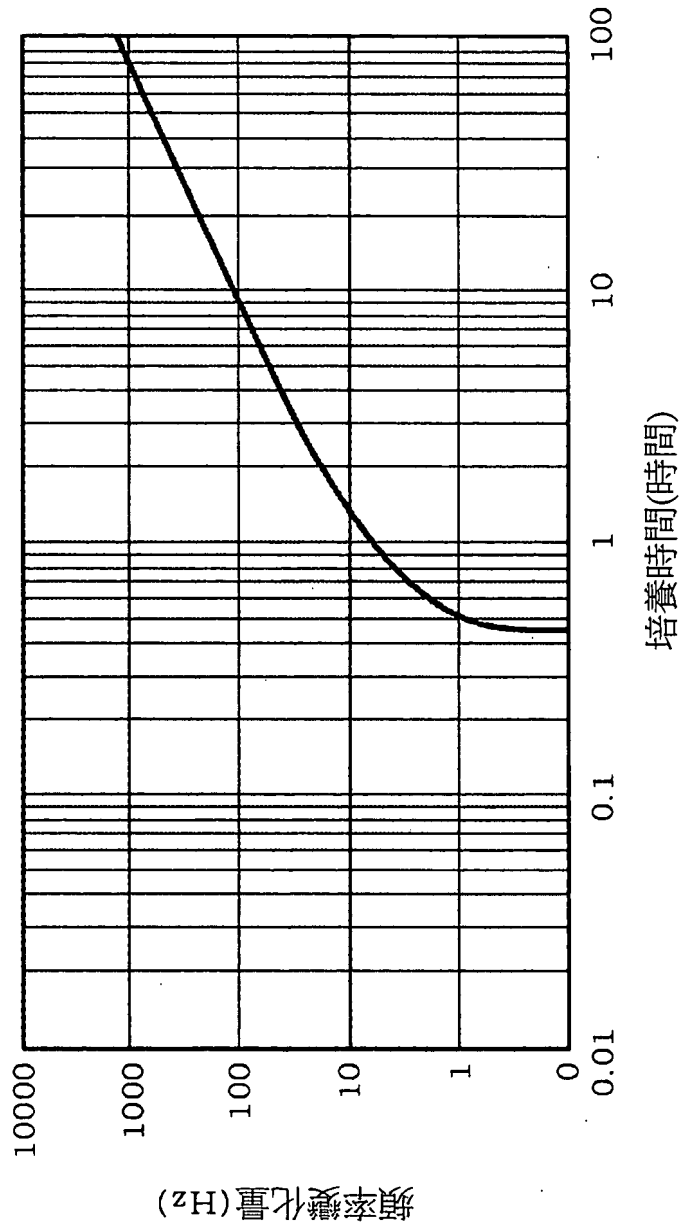
第 6 圖



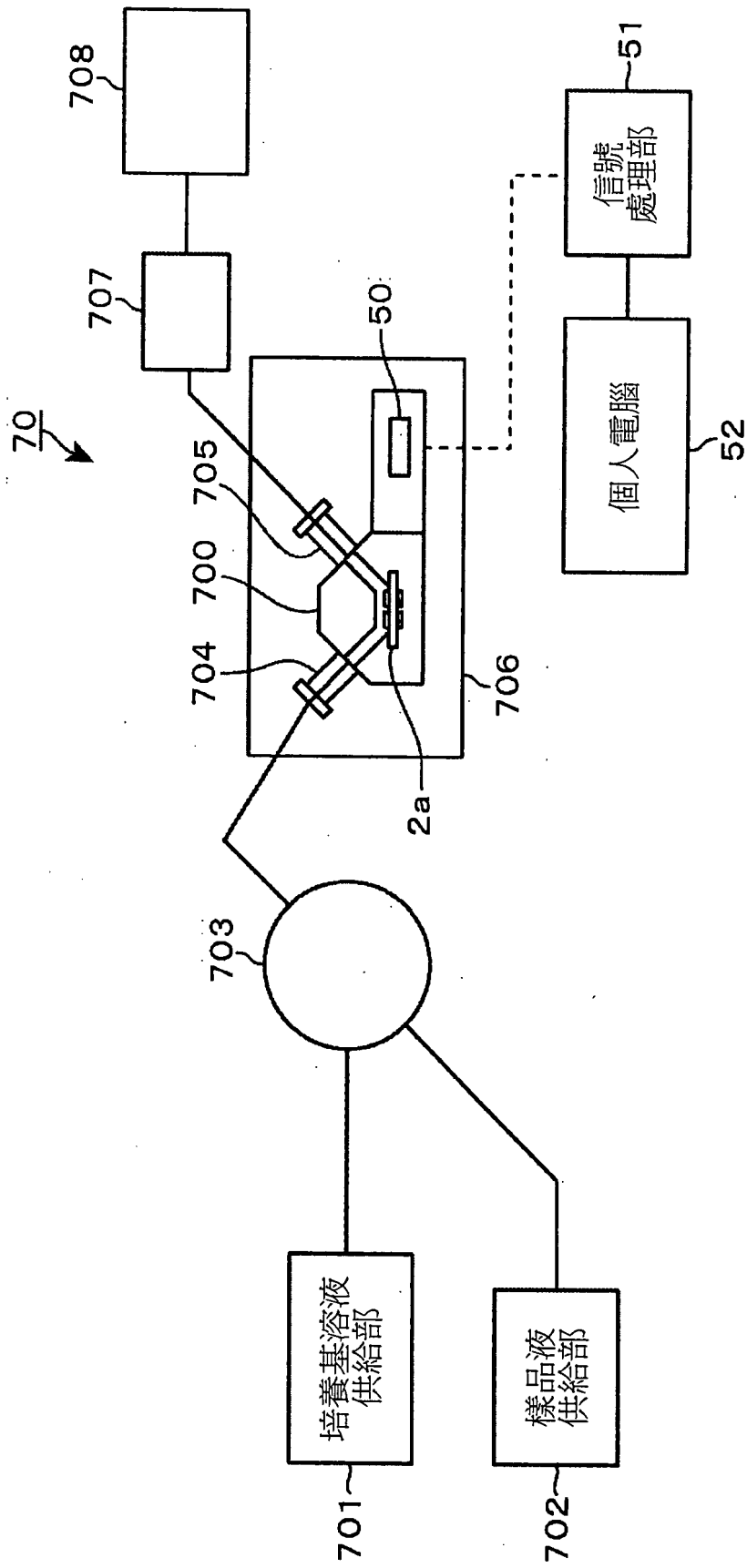
第 7 圖



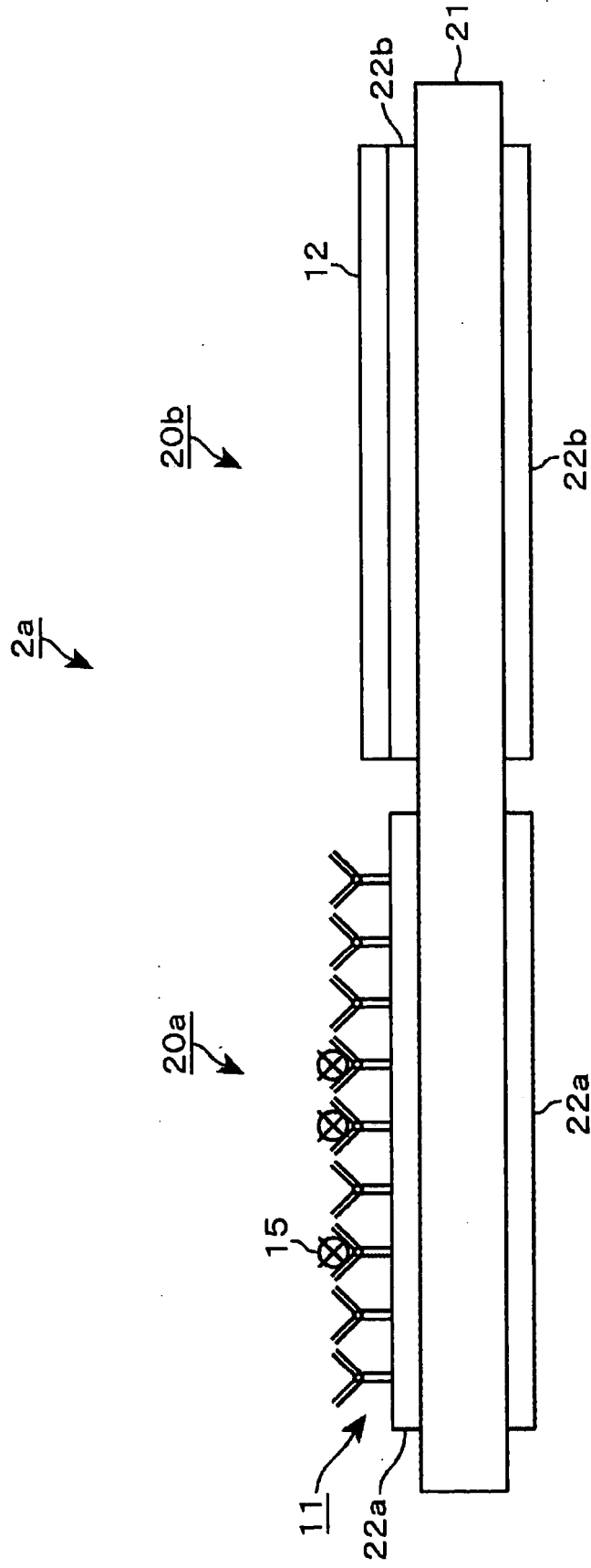
第 8 圖



第 9 圖

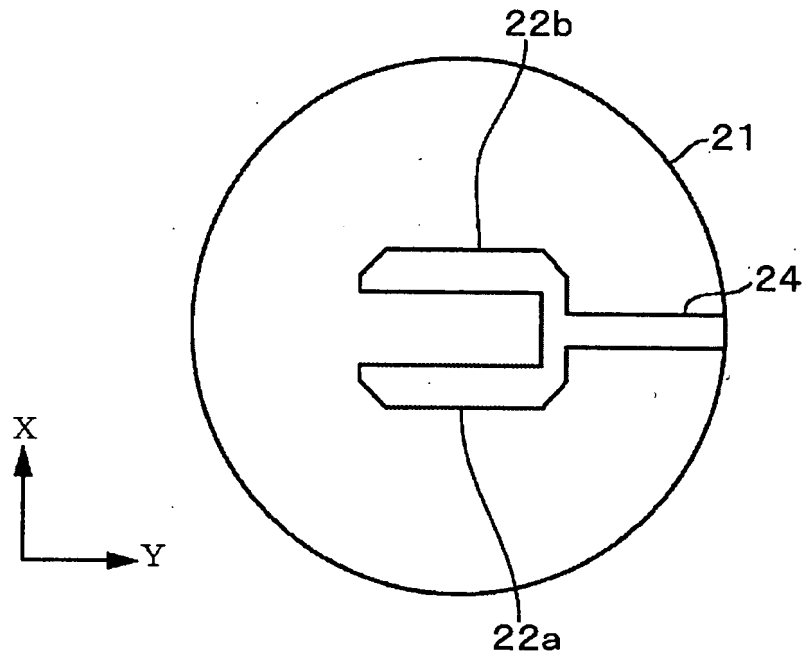


第 10 圖

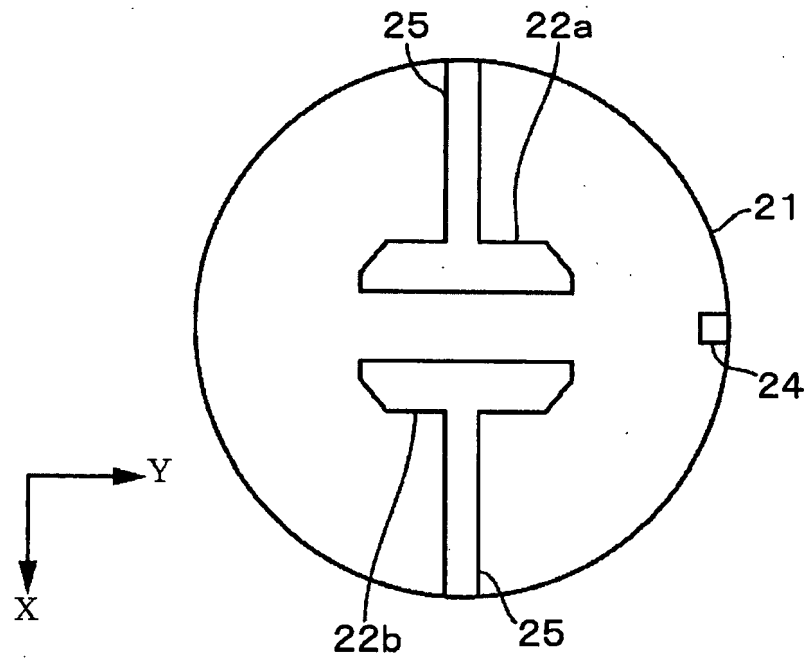


第 11 圖

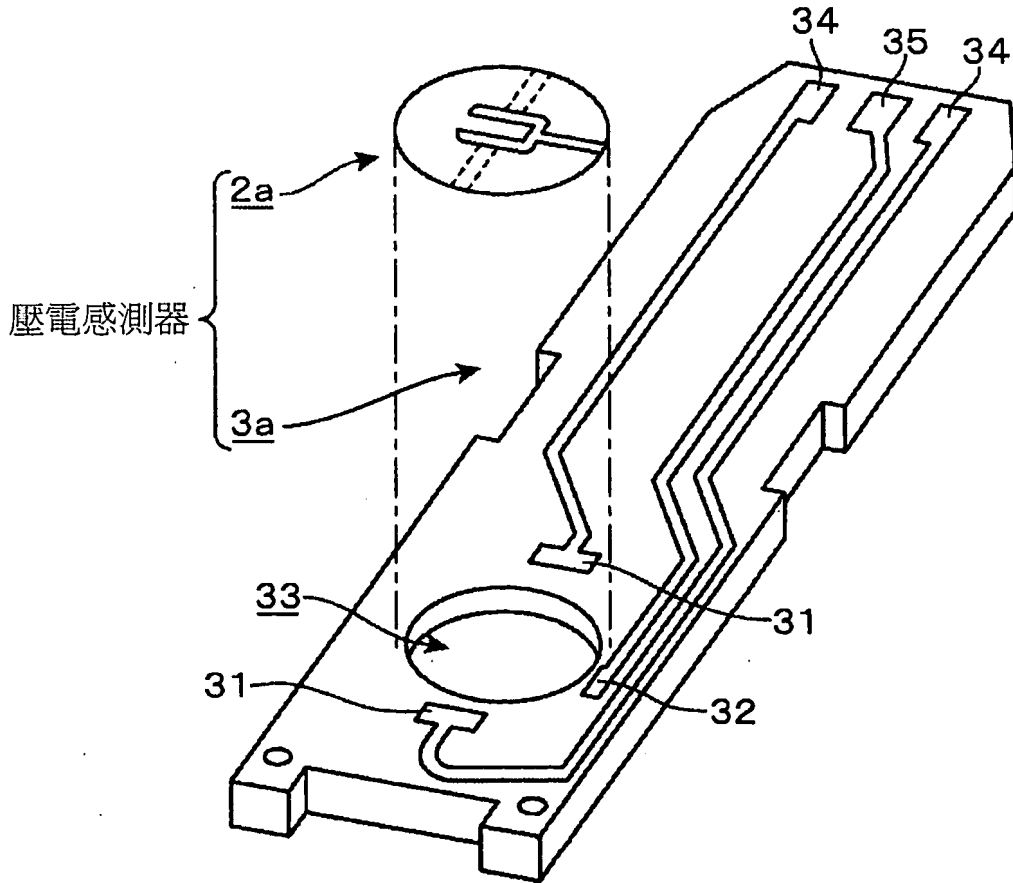
(a) 表面



(b) 表面

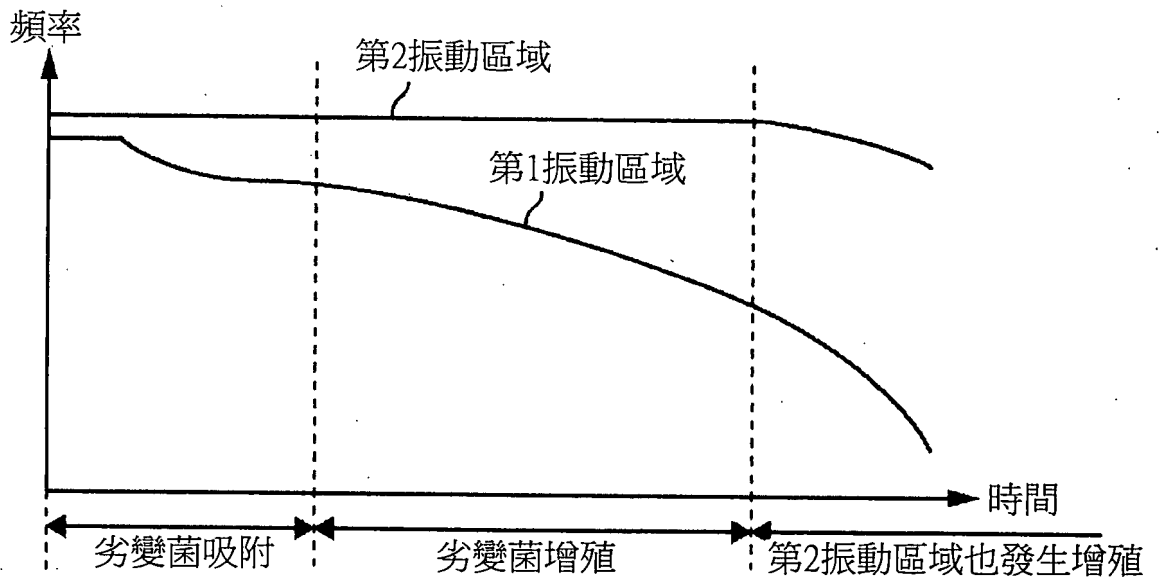


第 12 圖

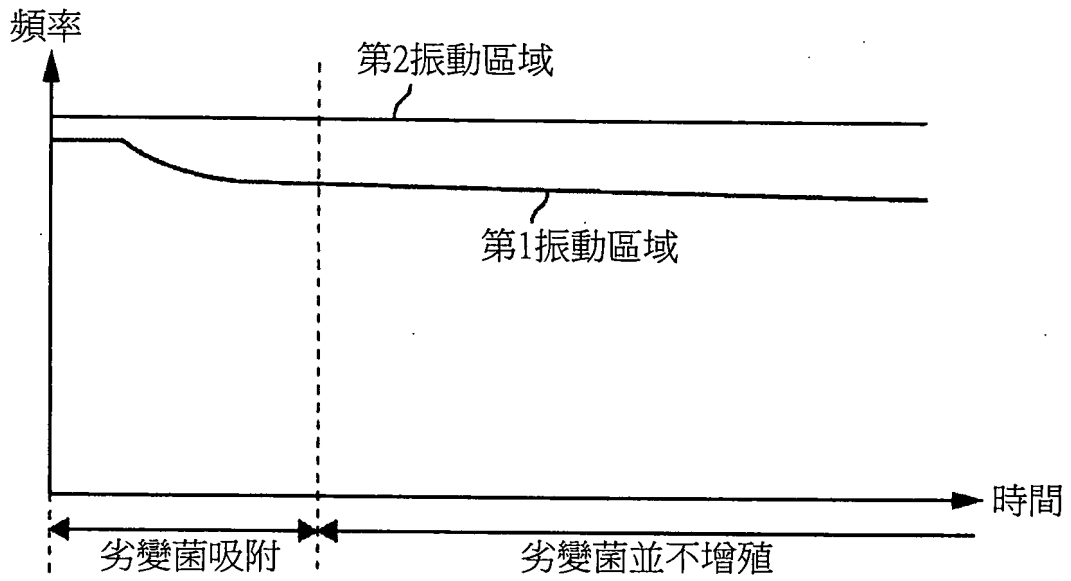


第 13 圖

(a)



(b)



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

10…培養基層

21…水晶片

22…激勵電極

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：