



(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 201414830 A

(43) 公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 16 日

---

(21) 申請案號：102129843 (22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 20 日  
(51) Int. Cl. : C12M1/34 (2006.01) G01N21/64 (2006.01)  
(30) 優先權：2012/08/24 日本 JP2012-185523  
2012/09/11 日本 JP2012-199556  
(71) 申請人：佐竹股份有限公司 (日本) SATAKE CORPORATION (JP)  
日本  
(72) 發明人：中田明子 NAKATA, AKIKO (JP)；伏田真矢 FUSHIDA, SHINYA (JP)；江藤聰  
ETO, AKIRA (JP)；松田真典 MATSUDA, MASANORI (JP)；保坂幸男 HOSAKA,  
YUKIO (JP)  
(74) 代理人：周良謀；周良吉  
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：13 共 39 頁

---

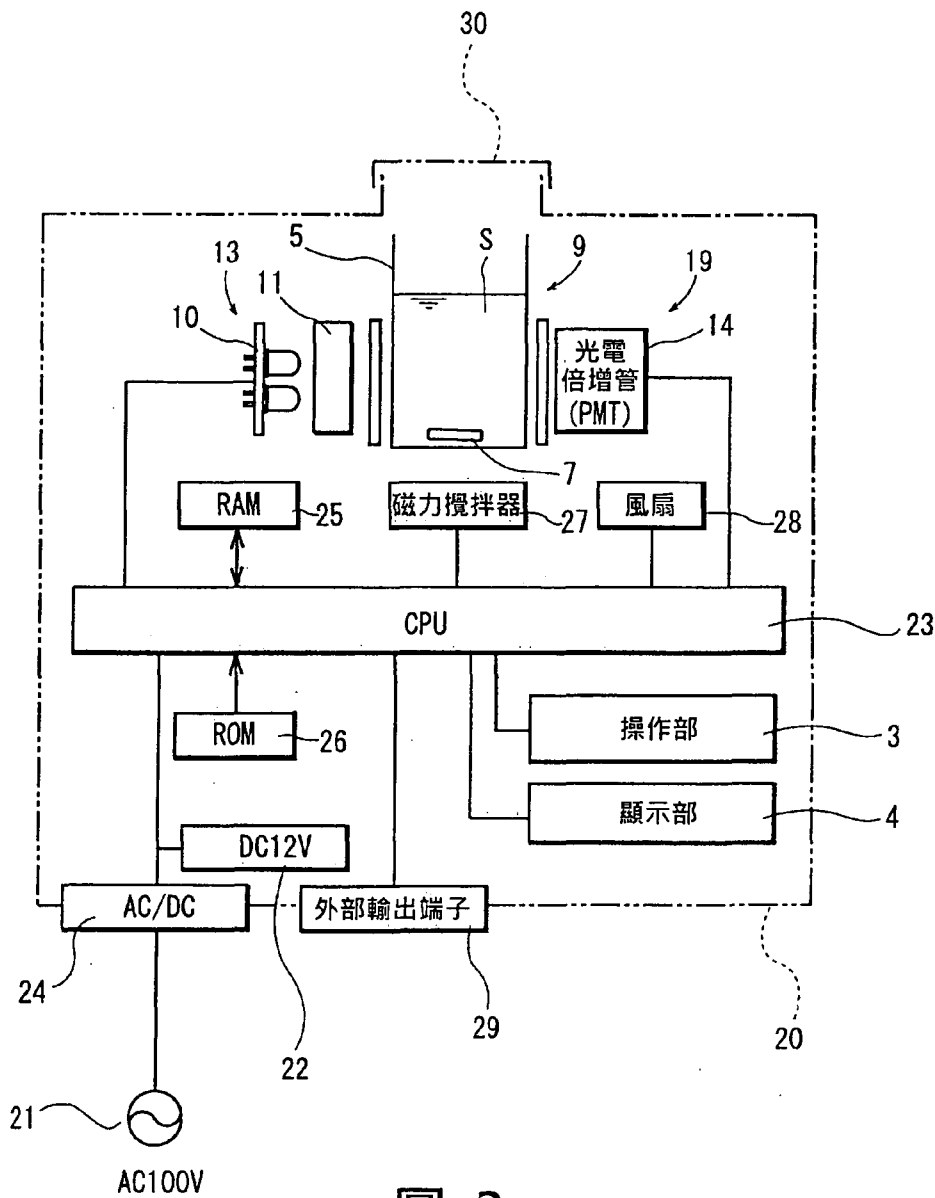
(54) 名稱

微生物之檢查方法及其裝置

METHOD AND DEVICE FOR INSPECTING MICROORGANISMS

(57) 摘要

本發明係關於一種供測定試樣溶液中之微生物量所用的微生物之檢查裝置 1，具備：攪拌混合機構 7，在以透光材質形成之試樣容器 5 施行添加有試樣與螢光染色試劑之試樣溶液的攪拌・混合；激發光源 10，以攪拌混合機構 7 攪拌試樣溶液 5 並具備對試樣容器 5 之被照射面照射激發光的光源；光接收機構 14，偵測藉由來自激發光源 10 之激發光而螢光發光的光線，轉換為電氣訊號；以及控制機構 23，藉由來自光接收機構 14 的電氣訊號檢測發光數，自該發光數算初試樣容器 5 中的試樣所含有之微生物量。



- 3：操作部
- 4：顯示部
- 5：試樣容器
- 7：轉子
- 9：試樣容器收納部
- 10：LED 光源
- 11：平行光轉換機構
- 13：光源部
- 14：光電倍增管 (PMT)
- 19：光接收部
- 20：筐體
- 21：AC 電源
- 22：二次電池
- 23：CPU 基板
- 24：AC/DC 轉換器
- 25：RAM
- 26：ROM
- 27：磁力攪拌器
- 28：風扇
- 29：外部輸出端子
- 30：蓋部
- S：試樣溶液

圖 3



(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 201414830 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 16 日

---

(21)申請案號：102129843 (22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 20 日  
(51)Int. Cl. : C12M1/34 (2006.01) G01N21/64 (2006.01)  
(30)優先權：2012/08/24 日本 JP2012-185523  
2012/09/11 日本 JP2012-199556  
(71)申請人：佐竹股份有限公司 (日本) SATAKE CORPORATION (JP)  
日本  
(72)發明人：中田明子 NAKATA, AKIKO (JP)；伏田真矢 FUSHIDA, SHINYA (JP)；江藤聰  
ETO, AKIRA (JP)；松田真典 MATSUDA, MASANORI (JP)；保坂幸男 HOSAKA,  
YUKIO (JP)  
(74)代理人：周良謀；周良吉  
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：13 共 39 頁

---

(54)名稱

微生物之檢查方法及其裝置

METHOD AND DEVICE FOR INSPECTING MICROORGANISMS

(57)摘要

本發明係關於一種供測定試樣溶液中之微生物量所用的微生物之檢查裝置 1，具備：攪拌混合機構 7，在以透光材質形成之試樣容器 5 施行添加有試樣與螢光染色試劑之試樣溶液的攪拌・混合；激發光源 10，以攪拌混合機構 7 攪拌試樣溶液 5 並具備對試樣容器 5 之被照射面照射激發光的光源；光接收機構 14，偵測藉由來自激發光源 10 之激發光而螢光發光的光線，轉換為電氣訊號；以及控制機構 23，藉由來自光接收機構 14 的電氣訊號檢測發光數，自該發光數算初試樣容器 5 中的試樣所含有之微生物量。

## 發明摘要

※ 申請案號：102129843

C12M 1/34 (2006.01)

※ 申請日：2013.08.20

※IPC 分類：

G01N 21/64 (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

微生物之檢查方法及其裝置

METHOD AND DEVICE FOR INSPECTING MICROORGANISMS

## 【中文】

本發明係關於一種供測定試樣溶液中之微生物量所用的微生物之檢查裝置 1，具備：攪拌混合機構 7，在以透光材質形成之試樣容器 5 施行添加有試樣與螢光染色試劑之試樣溶液的攪拌・混合；激發光源 10，以攪拌混合機構 7 攪拌試樣溶液 5 並具備對試樣容器 5 之被照射面照射激發光的光源；光接收機構 14，偵測藉由來自激發光源 10 之激發光而螢光發光的光線，轉換為電氣訊號；以及控制機構 23，藉由來自光接收機構 14 的電氣訊號檢測發光數，自該發光數算出試樣容器 5 中的試樣所含有之微生物量。

## 【英文】

A microorganism inspection device 1 for measuring the quantity of microorganisms in a sample solution comprises a stirring and mixing device 7 which stirs and mixes the sample solution containing a sample and a fluorescent staining reagent in a sample vessel 5 formed from a light-transmitting material, an excitation light source 10 having a light source which irradiates excitation light onto a light irradiation surface of the sample vessel 5 while the sample solution is stirred by the stirring and mixing device 7, a light-receiving device 14 which detects light that fluoresces due to the excitation light from the excitation light source 10 and converts the light to an electrical signal, and a control device 23 which detects the number of times light is emitted based on the electrical signal from the light receiving device 14, and calculates the quantity of microorganisms contained in the sample in the sample vessel 5 from

201414830

the number of light emissions.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 3 ）圖

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

- 3 操作部
- 4 顯示部
- 5 試樣容器
- 7 轉子
- 9 試樣容器收納部
- 10 LED 光源
- 11 平行光轉換機構
- 13 光源部
- 14 光電倍增管（PMT）
- 19 光接收部
- 20 筐體
- 21 AC 電源
- 22 二次電池
- 23 CPU 基板
- 24 AC/DC 轉換器
- 25 RAM
- 26 ROM
- 27 磁力攪拌器
- 28 風扇
- 29 外部輸出端子
- 30 蓋部
- S 試樣溶液

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

微生物之檢查方法及其裝置

METHOD AND DEVICE FOR INSPECTING MICROORGANISMS

## 【技術領域】

### 【0001】

本發明係關於一種微生物之檢查方法及其裝置，特別是關於一種適合檢測包含於壓艙水等而於其中生存之浮游生物等微生物的微生物之檢查方法及其裝置。

## 【先前技術】

### 【0002】

未載運行李之船舶，爲了使該船舶穩定而搭載壓艙水航行，在載運行李的海域中將所搭載之該壓艙水排出。

壓艙水，一般而言，因在與搭載的海域相異之海域排出，故該壓艙水所含有之浮游生物或細菌等微生物被載運至原本之棲息地以外的海域，有引起破壞生態系等之問題的疑慮。

### 【0003】

爲了處理此等問題，策劃關於壓艙水的管制之國際性規則，採納「用於控制及管理船舶之壓艙水及沉澱物的國際條約（壓艙水管理條約）」。

### 【0004】

關於上述壓艙水管理條約的「對於壓艙水採樣之指引（G2）」，在「壓艙水排出基準（D—2）」中，將自船舶排出之壓艙水所含有而生存於其中的微生物之容許個體數，以該微生物之最小尺寸加以區分規定。例如以如下方式規定：對於最小尺寸爲 50 $\mu\text{m}$  以上之微生物（以下稱作「L 尺寸生物」）爲 10 個/ $\text{m}^3$  以下，對於最小尺寸爲 10 $\mu\text{m}$  以上未滿 50 $\mu\text{m}$  之微生物（以下稱作「s 尺寸生物」）爲 10 個/mL 以下。

**【0005】**

至今為止，作為量測在上述壓艙水等水中棲息的微生物細胞之方法，已知有專利文獻 1 記載之方法。

**【0006】**

上述專利文獻 1 記載之方法為一種微生物細胞之活細胞的量測方法：首先，使與存在於微生物之活細胞的酶或輔酶反應並在細胞內產生螢光物質之化學物質，與含有微生物之測定對象試樣作用。其次，施行一定時間的混合接觸，對試樣照射激發細胞內產生的螢光物質所必須之波長的光線。而後將試樣中自各個微生物發出的光以點的數量加以量測。

**【0007】**

藉此，將習知之洋菜培養方法中必須之 10 小時～數十小時的測定時間顯著地提早為 10 分鐘以內。此外，將活菌發出的光作為點藉由建立光學性地、電性地偵測量測之手段而可將活菌直接自動計數，具有可使殺菌裝置的控制、製品品質的迅速管理快速地施行之優點。

**【0008】**

然則，上述專利文獻 1 記載之方法，因水的種類、溫度、染色劑的種類、濃度、染色時間等之不同而有測定值產生差異的情形。

**【0009】**

作為其他方法，已知有：為了確認將上述壓艙水排出時是否滿足上述排出基準，使以送水泵汲取的海水對流通槽流通並進行影像量測之方法（例如專利文獻 2）；使以送水泵汲取的海水對孔隙相異之過濾單元流通，使濾網上之微生物發光並計算微生物數量（例如專利文獻 3）等之微生物檢查裝置。

**【0010】**

上述專利文獻 2 記載之微生物檢查裝置，具備：染色部，使液體之試樣流動並將存在於該試樣中之具有活細胞的生物染色；濃縮部，使施加該染色之試樣流動並濃縮以使該生物的濃度提高；個體量測部，取得該濃縮之試樣中的含有該生物之個體其影像資訊；以及控制機構，藉由以該個體量測部輸出之該個體的影像資訊施行該生物之測定。

藉此，由於可將試樣之液體中的生物之染色步驟、液體中的生物之濃

縮步驟、液體中的生物之資訊取得步驟等一連串地施行，故與個別施行各方式之手法相比，可將結束一個步驟試樣之一部分前進至次一步驟為止的待機時間大幅地縮短，或使其為 0，在防止待機時間之染色狀態的劣化之意味下具有可取得穩定的生物死活之資訊等優點。

**【0011】**

然則，上述專利文獻 2 記載之微生物檢查裝置，爲了使以送水泵汲取的海水於各種步驟依序流通，故裝置大型化，製造成本變高。而測定結束有至少花費數小時之情形。

**【0012】**

此外，上述專利文獻 3 記載之微生物檢查裝置，其特徵爲具備如下步驟：使海水對將孔隙相異之 3 種濾網直列地配置而構成的過濾單元流通之步驟；使補集於濾網而生存的微生物產生之發色、發光及螢光中的任一項發生之步驟；以及檢測發色、發光及螢光中的任一項並藉由影像解析計算壓艙水或海水中的微生物數之步驟。

藉此，可實現階段性的各尺寸之微生物的捕捉，此一結果，可迅速地測定是否滿足各尺寸之基準所限制的容許殘存基準。

**【0013】**

然則，專利文獻 3 記載之微生物檢查裝置，與專利文獻 1 同樣地使以送水泵汲取的海水於各種步驟依序流通，有裝置大型化、製造成本變高之情形。

[習知技術文獻]

**【專利文獻】**

**【0014】**

專利文獻 1 日本特開平 3-43069

專利文獻 2 日本特開 2009-85898

專利文獻 3 日本特開 2007-135582

**【發明內容】**

[本發明所欲解決的問題]

**【0015】**

鑑於上述問題，本發明之技術課題在於提供一種，能夠將壓艙水中之微生物的量簡便、短時間、且高精度地測定的微生物之檢查方法及其裝置。

[解決問題之技術手段]

**【0016】**

爲了解決上述問題，本發明提供一種技術手段，係用於測定試樣溶液中之微生物量的微生物之檢查裝置；具備：攪拌混合機構，具有以透光材質形成之試樣容器，在該試樣容器內施行試樣溶液的攪拌・混合；激發光源，對該試樣容器照射激發光；光接收機構，偵測光線而轉換爲電氣訊號；以及控制機構，計算該試樣容器中之試樣所含有的微生物量；該試樣溶液，係於試樣添加將微生物染色之螢光染色試劑而構成；該光接收機構，偵測來自該激發光源之該激發光的照射所產生之，來自該試樣溶液的螢光發光；該控制機構，依據來自該光接收機構之電氣訊號檢測發光數，計算該試樣容器中之試樣所含有的微生物量。

藉此，於試樣容器添加試樣、將微生物染色之螢光染色試劑，藉由攪拌混合機構施行試樣容器的攪拌・混合，接著攪拌試樣溶液並使激發光入射至試樣容器，進一步，由於以光接收機構接收微生物的螢光發光，故若與未加攪拌而靜置量測之方法比較，則在極短時間微生物明亮地發光，可簡便並短時間地量測壓艙水中之微生物的量。此外，因本發明之裝置並非爲流通式故可將裝置小型化，製造成本亦變得低廉。

**【0017】**

此外，申請專利範圍第 2 項之發明，其特徵爲：於該光接收機構與該控制機構之間具備濾波機構；該濾波機構，過濾來自該光接收機構之電氣訊號中的，低頻成分之雜訊及高頻成分之雜訊。

藉此，將電氣訊號導入控制機構前，以濾波機構過濾擾動，故可明確地區別和微生物的螢光發光之光接收量相對應的電氣訊號與擾動。藉此，可不產生微生物量的測定誤差，亦不產生測定值產生差異的問題地，穩定測定。

**【0018】**

而申請專利範圍第 3 項之發明，其特徵爲：該濾波機構，爲連結高通濾波器與低通濾波器之帶通濾波器。

**【0019】**

申請專利範圍第 4 項之發明，其特徵為：該激發光源，配置為直交於該試樣容器而照射激發光；該光接收機構，配置為以與該激發光源之激發光直交的角度接收該螢光發光。

藉此，來自激發光源之激發光不入射至直接接收光機構，此外，由於螢光發光的厚度部分變薄（例如，如同圖 2，發光部分的寬度雖為過去之 20mm~30mm，但如寬度 M（3mm）地變窄，厚度部分變薄），故背景與微生物的螢光發光之光量的差異變得極為明確，提高微生物之螢光發光的檢測精度。

**【0020】**

此外，申請專利範圍第 5 項之發明，其特徵為：於該光接收機構與該試樣容器之間，設置狹縫構件。

藉此，由於使成為雜訊的背景之螢光發光的面積縮窄，故提升對於背景之螢光發光的微生物之螢光發光的訊號之比，提高微生物之螢光發光的檢測精度。

**【0021】**

進一步，申請專利範圍第 6 項之發明，其特徵為：於該激發光源與該試樣容器之間，設置將來自該激發光源的光線轉換為平行光之平行光轉換機構。

藉此，抑制來自激發光源之激發光的擴散，因以平行光照射試樣容器之被照射面，故背景之螢光發光的厚度部分變薄，提升對於背景之螢光發光的微生物之螢光發光的訊號之比，提高微生物之螢光發光的檢測精度。

**【0022】**

申請專利範圍第 7 項之發明，其特徵為：該平行光轉換機構，於平板穿設螺紋孔而形成。

藉此，藉低價的材料使來自激發光源之激發光受螺紋孔限制角度，可使自螺紋孔照射之光線的定向角縮窄。因此，由於使背景之螢光發光的厚度部分變薄，故提升對於背景之螢光發光的微生物之螢光發光的訊號之比，提高微生物之螢光發光的檢測精度。

**【0023】**

此外，申請專利範圍第 8 項之發明，其特徵為：該平行光轉換機構，係以凸透鏡形成。

藉此，可藉由低價的材料將來自激發光源之激發光的定向角縮窄。因此，背景之螢光發光的厚度部分變薄，提升對於背景之螢光發光的微生物之螢光發光的訊號之比，提高微生物之螢光發光的檢測精度。

#### 【0024】

申請專利範圍第 9 項之發明，為用於測定試樣溶液中之微生物量的微生物之檢查方法，包含如下步驟：攪拌混合步驟，於試樣容器內施行對試樣添加將微生物染色之螢光染色試劑的試樣溶液之攪拌·混合；激發步驟，對該試樣容器照射激發光；光接收步驟，偵測該激發光的照射產生之來自該試樣容器的螢光發光，將其轉換為電氣訊號；以及微生物數推定步驟，自以該光接收步驟轉換出的電氣訊號檢測發光數，計算該試樣容器中之試樣所含有的微生物量。

藉此，若與未加攪拌而靜置量測之方法比較，則在極短時間微生物明亮地發光，可簡便並短時間地量測壓艙水中之微生物的量。此外，由於螢光發光的厚度部分變薄，故背景與微生物的螢光發光之光量差變得極為明確，可提高微生物之螢光發光的檢測精度。

#### 【0025】

此外，申請專利範圍第 10 項之發明，其特徵為：於該光接收步驟與該微生物數推定步驟之間，具備濾波步驟，將以該光接收步驟轉換出的電氣訊號中，其低頻成分之雜訊及高頻成分之雜訊加以過濾。

藉此，將電氣訊號導入控制機構前，以濾波機構過濾擾動，故可明確地區別和微生物的螢光發光之光接收量相對應的電氣訊號與擾動。藉此，可不產生微生物量的測定誤差，亦不產生測定值產生差異的問題地，穩定測定。

[本發明之效果]

#### 【0026】

依本發明，可提供一種將壓艙水中之微生物的量簡便、短時間、且高精度地測定的微生物之檢查方法及其裝置。

**【圖式簡單說明】**

**【0027】**

- 圖 1 顯示本發明之實施形態的微生物之檢查裝置的全體之立體圖。
- 圖 2 本發明之實施形態的測定部之概略平截面圖。
- 圖 3 顯示本發明之第 1 實施形態的微生物之檢查裝置的全體構成之方塊圖。
- 圖 4 顯示本發明之第 1 實施形態的微生物之檢查裝置的測定流程之流程圖。
- 圖 5 顯示本發明之第 2 實施形態的微生物之檢查裝置的全體構成之方塊圖。
- 圖 6 顯示本發明之第 2 實施形態的濾波機構其電路之一例的圖。
- 圖 7 顯示本發明之第 2 實施形態的微生物之檢查裝置的測定流程之流程圖。
- 圖 8 A、B 顯示平行光轉換機構之一實施形態的概略剖面圖。
- 圖 9 A、B 顯示因狹縫之有無而使觀察面縮窄的作用圖。
- 圖 10A、B 顯示微生物的個體數與光電倍增管 (PMT) 的光接收計數之相關關係的圖表。
- 圖 11A~D 顯示可否檢測微生物死活之試驗的圖表。
- 圖 12A~C 顯示裝設濾波機構前之取得電壓的波形之圖表。
- 圖 13A~D 顯示裝設濾波機構後之取得電壓的波形之圖表。

**【實施方式】**

[實施本發明之最佳形態]

**【0028】**

(第 1 實施形態)

將用於實施本發明之形態參考附圖並加以說明。圖 1 為顯示本實施形態的微生物之檢查裝置的全體之立體圖；圖 2 為本實施形態的測定部之概略平截面圖；圖 3 為顯示本實施形態的微生物之檢查裝置的全體構成之方塊圖。

**【0029】**

如圖 1 及圖 2 所示，本發明之檢查裝置 1，具備以下元件而構成主要部：本體部 2，內建 CPU 基板等控制機構，施行測定結果等資訊處理作業或統計處理作業等；操作部 3，由並設於該本體部 2 之操作鍵等配置構成而形成；顯示部 4，爲了顯示該測定結果等而以液晶面板等形成；以及測定部 6，收納有以透光之透明材質（例如玻璃、石英或丙烯酸樹脂等）形成的分批式之試樣容器 5，光學地計算試樣溶液 S 中之微生物數。符號 7 爲用於將收納在試樣容器 4 內之試樣溶液 S 加以攪拌的轉子，該轉子 7 與試樣溶液 S 及發光試劑一同收納於該試樣容器 5 內，成爲在將該試樣容器 5 收納於測定部 6 時，藉由內建在該測定部 5 內之磁力攪拌器 27 旋轉驅動的構成。藉此，可將試樣容器 5 內之由試樣與發光試劑構成的試樣溶液 S 以既定溫度攪拌混合並計算試樣溶液 S 中之微生物數，若與未加攪拌而靜置量測之方法比較，則在極短時間微生物明亮地發光，可簡便並短時間地量測壓艙水中之微生物的量。

#### 【0030】

圖 1 所示之檢查裝置 1 的尺寸，在寬度爲 300mm，進深爲 300mm，高度爲 100mm，重量爲約 2~4kg 的範圍形成，收納於手提箱（未圖示）等，可攜帶，可進行船舶內之測定、或屋外之測定。

以透光之透明材質形成的分批式之試樣容器 5，形成爲底面 50mmX50mm，高度 60mm 之角柱狀，設定爲水位 40mm 時的內容量爲 100ml（毫升）。試樣容器 5 不限爲此等角柱狀，若可將內容量確保爲 100ml（毫升）程度，則可爲圓柱狀，亦可爲立方體。

#### 【0031】

該測定部 6，如圖 1、圖 2 及圖 3 所示，具備：試樣容器收納部 9，收納試樣容器 5 而加以保持；光源部 13，朝向該試樣容器 5 照射激發光；以及光接收部 19，用於藉由自該光源部 13 照射之激發光觀察受發光試劑染色而於試樣容器 5 內漂浮的微生物。而後，自光接收部 19，與計算試樣溶液 S 中之微生物數，並施行測定結果等資訊處理作業或統計處理作業等之 CPU 基板 23 電性連接。

#### 【0032】

該試樣容器收納部 9，藉由以將該試樣容器 5 之至少二面包圍的保持板

8a、8b 形成，以不遮斷來自該光源部 13 之光線的照射之方式將該試樣容器 5 收納保持。

而如圖 2 所示，以對試樣容器 5 之被照射面 G 使法線 AP 的激發光入射之方式配置光源部 13。該光源部 13 具備：LED 光源 10，配置於該試樣容器收納部 9 附近；平行光轉換機構 11，配置於該 LED 光源 10 之前面，將散射光轉換為平行光（將 LED 的光線，轉換為朝向一面以相同角度均一地照射光線之平行光的構件）；以及激發光用帶通濾波器 12，將由狹縫狀之平行光構成的激發光對試樣容器 5 照射。

### 【0033】

圖 8 為顯示平行光轉換機構 11 之一實施形態的概略剖面圖。圖 8A 所示之例子為，於既定厚度之平板 31 穿設既定徑的螺紋孔 32 而形成平行光轉換機構 11，配合光路長度適當設定平板 31 的厚度 L 與螺紋孔的孔徑。藉此，自 LED 光源 10 照射之入射角度  $\theta$  的散射光，通過螺紋孔 32 時轉換為平行光。圖 8A 所示之例子中， $\theta$  與 L 的最佳條件係藉由 SN 比之試驗加以決定，例如，若使其為 M3（螺紋孔的外徑）X0.5（間距），則  $\theta$  為  $9.5^\circ$ ，L 為 15mm 時最佳。

### 【0034】

圖 8B 所示之平行光轉換機構 11，於 LED 光源 10 之前面設置有凸透鏡 33，自 LED 光源 10 照射的散射光，在通過凸透鏡 33 內射出至外部時轉換為平行光。

### 【0035】

本實施形態之光源部 13，雖使用 LED 光源 10 作為光源，但若可激發微生物所含有之螢光物質，則不限為 LED 光源 10，亦可採用能夠照射平行光的平行光 LED 光源、雷射光源或燈泡。自然，採用能夠照射平行光的平行光 LED 或雷射光源時，不需要前述之平行光轉換機構 11。

### 【0036】

如圖 2 所示，該光接收部 19，將其光接收面 F 配置成具有與來自光源部 13 之法線 AP 的激發光直交之角度。此外，光接收部 19 具備：光電倍增管（PMT）14，配置構成為對自該 LED 光源 10 朝向試樣容器 5 照射激發光的平行光，以與其垂直之光軸接收螢光；螢光用帶通濾波器 15，配置於

該光電倍增管 (PMT) 14 之前面；聚光用透鏡 16，配置於該螢光用帶通濾波器 15 之前面；狹縫 17，配置於該聚光用透鏡 16 之前面；以及繼光鏡 18，設置於該狹縫 17 與該試樣容器 5 之間隙，激發微生物所含有之螢光物質，用於藉此使發光的螢光聚光而成像。

#### 【0037】

該光電倍增管 (PMT) 14 與試樣容器 5 之間的狹縫 17，將觀察面縮窄為狹縫狀。亦即，相對於如圖 9A 地不具狹縫之狀態中，監視以圓形成光接收面 F 的背景，而如圖 9B 地具有狹縫之狀態中，監視以除去斜線以外之縱長狹縫形成光接收面 F 的背景。因此，光接收面 F 之光接收面積如同圖 9B 地縮窄，結果使成為雜訊的背景之螢光發光的面積亦縮窄，故提升對於背景之螢光發光的微生物之螢光發光的訊號之比，提高微生物之螢光發光的檢測精度。

#### 【0038】

另，光接收部 19，雖顯示使用光電倍增管 (PMT) 14 作為光接收感測器之例子，但並不限於此，可採用矽二極體 (SiPD)、雪崩光電二極體 (APD) 等，能夠與光電倍增管 (PMT) 同樣地偵測微生物所含有之螢光物質的發光之各種光檢測器。

#### 【0039】

進一步，參考圖 3，說明本實施形態之檢查裝置 1 的電性控制構成。於形成本體部 2 之筐體 20 內的中央配置 CPU 基板 23，其自 AC 電源 21 與二次電池 22 接收電源的供給，解析以該光電倍增管 (PMT) 14 自光轉換為電的輸出訊號、判定是否為任意的亮度範圍以上、將任意亮度的訊號脈波計數、施行該 LED 光源 10 的開啓・關閉控制等。於該 AC 電源 21 與該 CPU 基板 23 之間，夾設 AC/DC 轉換器 24。

#### 【0040】

於該 CPU 基板 23，分別將該光電倍增管 (PMT) 14、該 LED 光源 10、作為讀取寫入用記憶部之 RAM25 及作為讀取專用記憶部之 ROM26 電性連接。此外，將圖 1 所示之操作部 3 之電源鍵 3a、測定開始鍵 3b、外部輸出鍵 3c 及設定鍵 3d 電性連接。而後，成為可藉由以下按鍵施行如下動作之構成：藉由該電源鍵 3a 的按壓施行開啓・關閉之切換控制；藉由該測定開

始鍵 3b 的按壓開始測定；藉由外部輸出鍵 3c 的按壓對外部之印表機或個人電腦施行資料之傳送；藉由設定鍵 3d 的按壓，施行測定的種類之切換（切換為 L 尺寸微生物的測定或 S 尺寸微生物的測定）判定基準的設定之變更、閾值的設定之變更、測定時間的設定之變更。

#### 【0041】

其他，於該 CPU 基板 23，連接使該轉子 7 藉由磁力旋轉之磁力攪拌器 27、以液晶面板等形成之顯示部 4、CPU 基板 23 等控制機器之冷卻用風扇 28、及 RS-232C 等外部輸出端子 29。

#### 【0042】

圖 4 為顯示測定流程之流程圖，參考圖 1 至圖 4 說明上述構成中的作用。

#### 【0043】

首先，操作者使用移液器等，自溫度 20°C 程度之壓艙水採取 100ml（毫升）作為試樣，投入試樣容器 5（圖 4 之步驟 1）。其次，於試樣容器 5 內添加螢光染色試劑（圖 4 之步驟 2）。此一螢光染色試劑可使用一般所知的鈣黃綠素 AM（Calcein-AM、德國 Promocell GMBH 社製）、FDA 等。鈣黃綠素 AM，具有容易對浮游植物染色之傾向；FDA，具有容易對動物性浮游生物染色之傾向；因此，若將染色試劑產生之染色，藉由混合鈣黃綠素 AM 與 FDA 之試劑施行染色，則減短試劑的染色時間，可使染色所需之時間為過去的一半。之後，操作者於試樣容器 5 投入轉子 7 後，收納至檢查裝置 1 之測定部 6，覆蓋測定部 6 的蓋部 30 藉而使測定準備結束。此處，若按壓電源鍵 3a，則轉子 7 藉由該測定部 6 內所內建之磁力攪拌器 27 的驅動而旋轉，攪拌試樣溶液 S（圖 4 之步驟 3）。

#### 【0044】

接著，操作者藉由操作部之測定開始鍵 3b 的按壓，於既定時間後將 LED 光源 10 點燈，使透射激發光用帶通濾波器 12 的光線照射試樣容器 5。此時，例如以波長特性 450nm~490nm 之波長的光線照射，使試樣容器 5 內之試樣（微生物）螢光發光（圖 4 之步驟 4）。而後，此螢光透射螢光用帶通濾波器 15 而被光電倍增管（PMT）14 偵測（圖 4 之步驟 5）。

#### 【0045】

光電倍增管 (PMT) 14，藉由光電效果的利用將光能轉換為電能，並附加電流放大功能，可高感度地偵測螢光發光。將偵測到的電氣訊號送往 CPU 基板 23，計數一定閾值以上之光接收波形 (圖 4 之步驟 6)。

**【0046】**

進一步，CPU 基板 23，自光接收波形計數值推定存在於該試樣容器 5 內的水 100ml (毫升) 中之微生物數，於顯示部 4 顯示是否滿足排水基準 (圖 4 之步驟 7)。

**【0047】****(第 2 實施形態)**

本實施形態中，在光接收部 19 與 CPU 基板 23 之間設置濾波機構 34 的點與第 1 實施形態相異。其他構成與第 1 實施形態相同故省略說明。以下，依據附圖加以說明。

測定部 6，如圖 1、圖 2 及圖 5 所示，具備：試樣容器收納部 9，收納試樣容器 5 而加以保持；光源部 13，朝向該試樣容器 5 照射激發光；以及光接收部 19，用於藉由自該光源部 13 照射之激發光觀察在試樣容器 5 內漂浮發光的微生物。而後，自光接收部 19 起，介由濾波機構 34 與 CPU 基板 23 電性連接。CPU 基板 23，可藉來自光接收部 19 的電氣訊號計算試樣溶液 S 中之微生物數，施行測定結果等資訊處理作業或統計處理作業等。

**【0048】**

圖 6 為顯示作為本發明之要部的濾波機構其電路之一例的圖。如圖 6 所示，於光電倍增管 (PMT) 14 與 CPU 基板 23 之間，將運算放大器 35、高通濾波電路 36 及低通濾波電路 37 電性連接。該運算放大器 35，將以該光電倍增管 (PMT) 14 因應接收之光接收量而產生的輸出電流轉換為電壓，即便為微小的電流仍可檢測。此外，高通濾波電路 36 為，可使輸入訊號中，較既定頻率更高之頻率的成分不衰減，而較既定頻率更低之頻率的成分遞減之濾波機構。另一方面，低通濾波電路 37 為，可使輸入訊號中，較既定頻率更低之頻率的成分不衰減，而較既定頻率更高之頻率的成分遞減之濾波機構。而若將該高通濾波電路 36 與低通濾波電路 37 連結，則成為僅使必要範圍的頻率通過之帶通濾波電路 38。

**【0049】**

該運算放大器 35，具有運算放大器 OP 與電阻 R。而該高通濾波電路 36 及低通濾波電路 37，分別具有互相電性連接之電阻 R1、R2 與電容器 C1、C2。藉此，以運算放大器 35 將來自光電倍增管 (PMT) 14 的輸出電流轉換為電壓，其次，自帶通濾波電路 38 之輸入側輸入訊號  $V_{in}(t)$ ，則輸出側中成為擾動的電氣訊號被過濾而輸出訊號  $V_{out}(t)$ 。若將此一經過濾的訊號  $V_{out}(t)$  輸入 CPU 基板 23，則因和微生物的螢光發光之光接收量相對應的電氣訊號與擾動已被明確地區別，故可不產生微生物量的測定誤差，亦不產生測定值差異的問題地，穩定測定。

#### 【0050】

圖 7 為顯示測定流程之流程圖，參考圖 1、圖 2、圖 5 至圖 7 說明上述構成中的作用。

#### 【0051】

首先，操作者使用移液器等，自溫度 20°C 程度之壓艙水採取 100ml (毫升) 作為試樣，投入試樣容器 5 (圖 7 之步驟 1)。其次，於試樣容器 5 內添加螢光染色試劑 (圖 7 之步驟 2)。此一螢光染色試劑可使用一般所知的鈣黃綠素 AM (Calcein-AM、德國 Promocell GMBH 社製)、FDA 等。鈣黃綠素 AM，具有容易對浮游植物染色之傾向；FDA，具有容易對動物性浮游生物染色之傾向；因此，若將染色試劑產生之染色，藉由混合鈣黃綠素 AM 與 FDA 之試劑施行染色，則減短試劑的染色時間，可使染色所需之時間為過去的一半。之後，操作者於試樣容器 5 投入轉子 7 後，收納至檢查裝置 1 之測定部 6，覆蓋測定部 6 的蓋部 30 藉而使測定準備結束。此處，若按壓電源鍵 3a，則轉子 7 藉由該測定部 6 內所內建之磁力攪拌器 27 的驅動而旋轉，攪拌試樣溶液 S (圖 7 之步驟 3)。

#### 【0052】

接著，操作者藉由操作部之測定開始鍵 3b 的按壓，於既定時間後將 LED 光源 10 點燈，使透射激發光用帶通濾波器 12 的光線照射試樣容器 5。此時，例如以波長特性 450nm~490nm 之波長的光線照射，使試樣容器 5 內之試樣 (微生物) 螢光發光 (圖 7 之步驟 4)。而後，此螢光透射螢光用帶通濾波器 15 而被光電倍增管 (PMT) 14 偵測 (圖 7 之步驟 5)。

#### 【0053】

光電倍增管 (PMT) 14，藉由光電效果的利用將光能轉換為電能，並附加電流放大功能，可高感度地偵測螢光發光。將偵測出的電氣訊號，以運算放大器 35 放大而輸入至帶通濾波電路 36，輸出已將成為擾動的電氣訊號過濾之訊號 (圖 7 之步驟 6)。接著，將已過濾成為擾動的電氣訊號之訊號傳送至 CPU 基板 23，計數一定閾值以上之光接收波形 (圖 7 之步驟 7)。

#### 【0054】

進一步，CPU 基板 23，自螢光波形計數值推定存在於該試樣容器 5 內的水 100ml (毫升) 中之微生物數，於顯示部 4 顯示是否滿足排水基準 (圖 7 之步驟 8)。

#### 【0055】

以下，對本發明之實施例加以說明。首先，施行上述實施形態的微生物之檢查裝置的檢查精度之確認試驗。

#### [實施例 1]

#### 【0056】

調查微生物的個體數與光電倍增管 (PMT) 的光接收計數之相關關係。將 S 型海水壺形輪蟲 (最小尺寸約  $100\mu\text{m}=\text{L}$  尺寸生物) 於複數個試樣容器 5 (100mL 容量) 分別個體別地收納 5 個體、10 個體、50 個體、100 個體、1000 個體，分別以螢光染色試劑 FDA (濃度 0.01[毫莫耳/公升]) 染色。此一結果，反應收納之微生物的個體數，波形的計數數量漸增加，對 5 個體、10 個體、50 個體及 100 個體之 5 樣本直線地回應 (參考圖 10A、圖 10B)。因此，可自獲得的波形的計數數量推定存在於壓艙水 100mL 中之微生物的個體數。

#### [實施例 2]

#### 【0057】

施行可否依存活死亡檢測微生物之試驗 (參考圖 11A~圖 11D)。將藉由熱進行殺滅處理 (60°C，30 分的加熱) 之 S 型海水壺形輪蟲 (最小尺寸約  $100\mu\text{m}=\text{L}$  尺寸生物)，以螢光染色試劑 FDA (濃度 0.01[毫莫耳/公升]) 染色。製作殺滅處理 1 小時後、殺滅處理 20 小時後、殺滅處理 5 天後的 3 樣本分別測定。此一結果，經殺滅處理之樣本皆未發現一定閾值以上的波形，可判別未經殺滅處理而存在微生物之樣本與經殺滅處理而不存在微生物之

樣本。

[實施例 3]

【0058】

比較在該光電倍增管 (PMT) 14 與 CPU 基板 23 之間，裝設濾波機構前與裝設後其取得電壓的波形。

圖 12 為裝設濾波機構前之取得電壓的波形。圖 12A 所示之取得電壓的波形，混雜有：擾動（背景成分約 0.9V 波形）、可確認為超過閾值之活的微生物之明確的峰、以及未超過閾值之不明的峰 3 種。此外，圖 12B 所示之取得電壓的波形，混雜有：擾動（背景成分約 1.4V 波形）、以及可確認為超過閾值之活的微生物之明確的峰 2 種。進一步，圖 12C 所示之取得電壓的波形，混雜有：擾動（背景成分約 0.4V 波形）、以及未超過閾值之不明的峰 2 種。

【0059】

圖 13 為裝設濾波機構後之取得電壓的波形。圖 13A 所示之取得電壓的波形為，為了去除成為擾動的背景成分，僅裝設高通濾波電路 36 時的波形。與圖 12B 所示之波形比較，則了解將約 1.4V 之背景成分收斂至 0V，去除擾動。

【0060】

圖 13B 之波形為，將圖 13A 所示之以虛線的圓包圍之峰的波形放大時之上升波形。圖 13B 之波形，包夾閾值而重複上下浮動，為測定誤差增大之要因。因而宜以去除此等高頻波形之目的裝設低通濾波電路 37。

【0061】

圖 13C 所示之取得電壓的波形為，為了施行擾動的去與高頻波形的去除，而裝設將高通濾波電路 36 與低通濾波電路 37 結合的帶通濾波器 38 時之波形。與圖 13A 之波形比較，則去除高頻雜訊而波形變得平滑。

【0062】

圖 13D 之波形為，將圖 13C 所示之以虛線的圓包圍之峰的波形放大時之上升波形。圖 13D 之波形，消除如圖 13B 之鋸齒狀波形而變得平滑，亦無包夾閾值而重複上下浮動之情形。藉此，使測定誤差極小，藉而可精度良好地測定。

## 【0063】

如同以上地依本實施形態，則於試樣容器 5 添加試樣與螢光染色試劑後，以攪拌混合機構 7 施行試樣溶液的攪拌・混合，其次，攪拌該試樣溶液並使激發光入射至該試樣容器之被照射面，進一步，以光接收機構接收微生物的螢光發光，故若與未加攪拌而靜置量測之方法比較，則在極短時間微生物明亮地發光，可簡便並短時間地量測壓艙水中之微生物的量。而可使裝置小型化，製造成本變得低價。

此外，電氣訊號被導入控制機構前，因以濾波機構將擾動過濾，故可明確地區別和微生物的螢光發光之光接收量相對應的電氣訊號與擾動，可不產生微生物量的測定誤差，亦不產生測定值差異的問題地，穩定測定。

[產業上利用性]

## 【0064】

本發明，可適用於供在排出壓艙水時確認是否滿足排出基準所使用的微生物之檢查裝置。

## 【符號說明】

## 【0065】

- 1 檢查裝置
- 2 本體部
- 3 操作部
- 3a 電源鍵
- 3b 測定開始鍵
- 3c 外部輸出鍵
- 3d 設定鍵
- 4 顯示部
- 5 試樣容器
- 6 測定部
- 7 轉子
- 8 保持板
- 8a、8b 保持板

- 9 試樣容器收納部
- 10 LED 光源
- 11 平行光轉換機構
- 12 激發光用帶通濾波器
- 13 光源部
- 14 光電倍增管 (PMT)
- 15 螢光用帶通濾波器
- 16 聚光用透鏡
- 17 狹縫
- 18 繼光鏡
- 19 光接收部
- 20 筐體
- 21 AC 電源
- 22 二次電池
- 23 CPU 基板
- 24 AC/DC 轉換器
- 25 RAM
- 26 ROM
- 27 磁力攪拌器
- 28 風扇
- 29 外部輸出端子
- 30 蓋部
- 31 平板
- 32 螺紋孔
- 33 凸透鏡
- 34 濾波機構
- 35 運算放大器
- 36 高通濾波電路
- 37 低通濾波電路
- 38 帶通濾波電路

- C1、C2 電容器
- F 光接收面
- G 被照射面
- OP 運算放大器
- R、R1、R2 電阻
- S 試樣溶液

## 申請專利範圍

1. 一種微生物之檢查裝置，供使用以測定試樣溶液中之微生物量，具備：
  - 攪拌混合機構，具有以透光材質形成之試樣容器，在該試樣容器內施行試樣溶液的攪拌·混合；
  - 激發光源，對該試樣容器照射激發光；
  - 光接收機構，偵測光線而轉換為電氣訊號；以及
  - 控制機構，計算該試樣容器中之試樣所含有的微生物量；該試樣溶液，係於試樣添加將微生物染色之螢光染色試劑而構成；  
該光接收機構，偵測由來自該激發光源之該激發光的照射所產生之來自於該試樣溶液的螢光發光；  
該控制機構，依據來自該光接收機構之電氣訊號檢測發光數，而計算出該試樣容器中之試樣所含有的微生物量。
2. 如申請專利範圍第 1 之微生物之檢查裝置，其中，
  - 在該光接收機構與該控制機構之間設有濾波機構；
  - 該濾波機構，將來自該光接收機構之電氣訊號中的低頻成分之雜訊及高頻成分之雜訊加以過濾。
3. 如申請專利範圍第 2 項之微生物之檢查裝置，其中，  
該濾波機構為連結高通濾波器與低通濾波器之帶通濾波器。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物之檢查裝置，其中，
  - 該激發光源係配置成直交於該試樣容器而照射激發光；
  - 該光接收機構係配置為以與該激發光源之激發光直交的角度接收該螢光發光。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物之檢查裝置，其係在該光接收機構與該試樣容器之間，設置狹縫構件而構成。
6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物之檢查裝置，其係在該激發光源與該試樣容器之間，設置將來自該激發光源的光線轉換為平行光之平行光轉換機構。
7. 如申請專利範圍第 6 項之微生物之檢查裝置，其中，  
該平行光轉換機構係於平板穿設螺紋孔而形成。
8. 如申請專利範圍第 6 項之微生物之檢查裝置，其中，

該平行光轉換機構，係以凸透鏡形成。

9. 一種微生物之檢查方法，用以測定試樣溶液中之微生物量，包含如下步驟：

攪拌混合步驟，於試樣容器內施行對試樣添加將微生物染色之螢光染色試劑的試樣溶液之攪拌·混合；

激發步驟，對該試樣容器照射激發光；

光接收步驟，偵測該激發光的照射所產生之來自該試樣容器的螢光發光，將其轉換為電氣訊號；以及

微生物數推定步驟，自以該光接收步驟轉換出的電氣訊號檢測發光數，計算出該試樣容器中之試樣所含有的微生物量。

10. 如申請專利範圍第 9 項之微生物之檢查方法，其中，

在該光接收步驟與該微生物數推定步驟之間，

具備濾波步驟，將以該光接收步驟轉換出的電氣訊號中的低頻成分之雜訊及高頻成分之雜訊加以過濾。

圖式

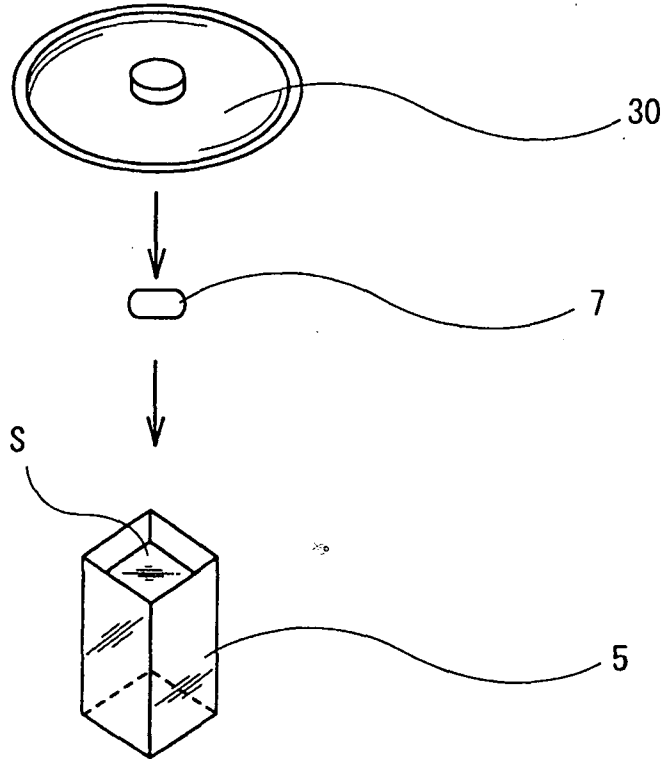
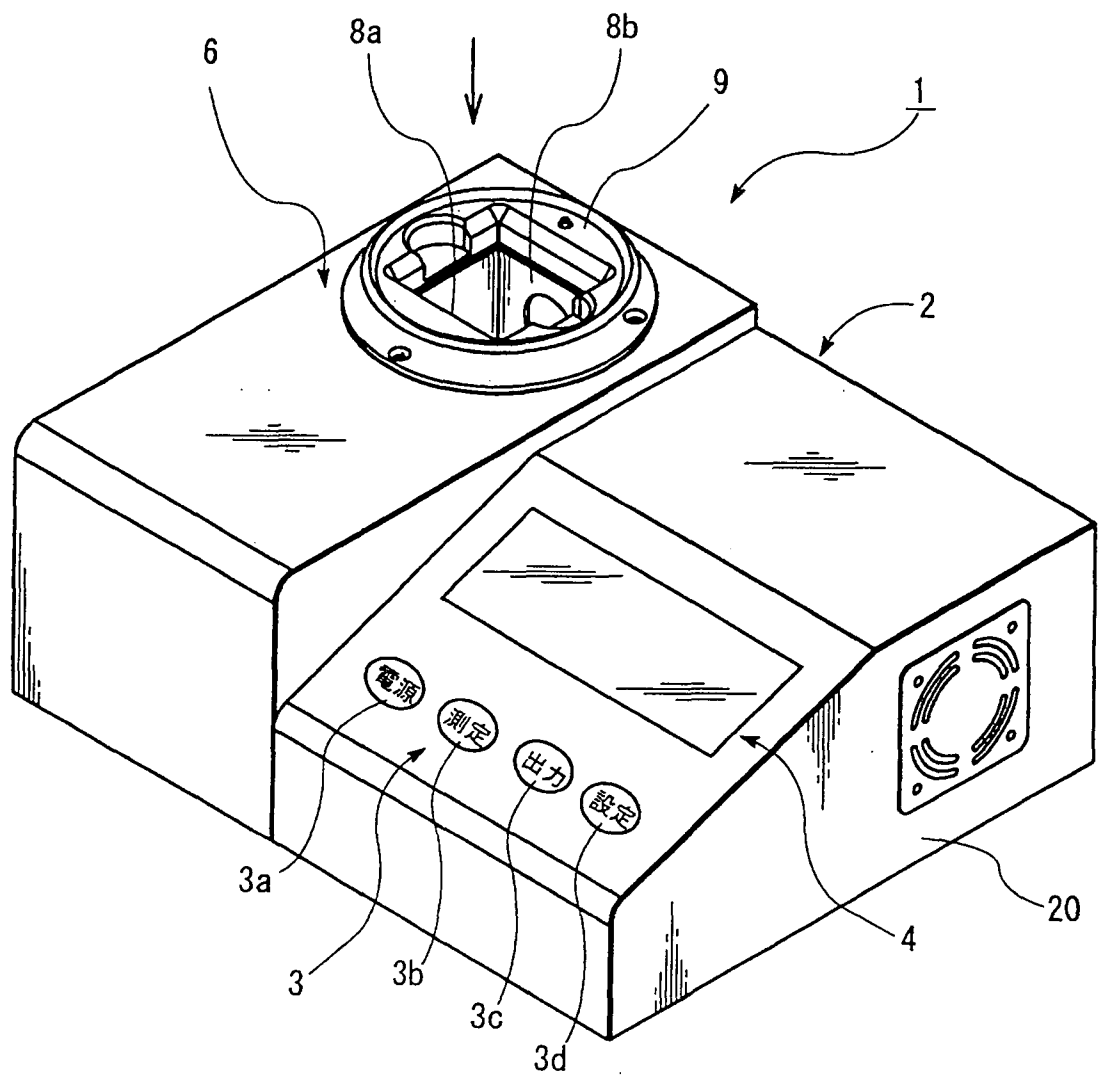


圖 1



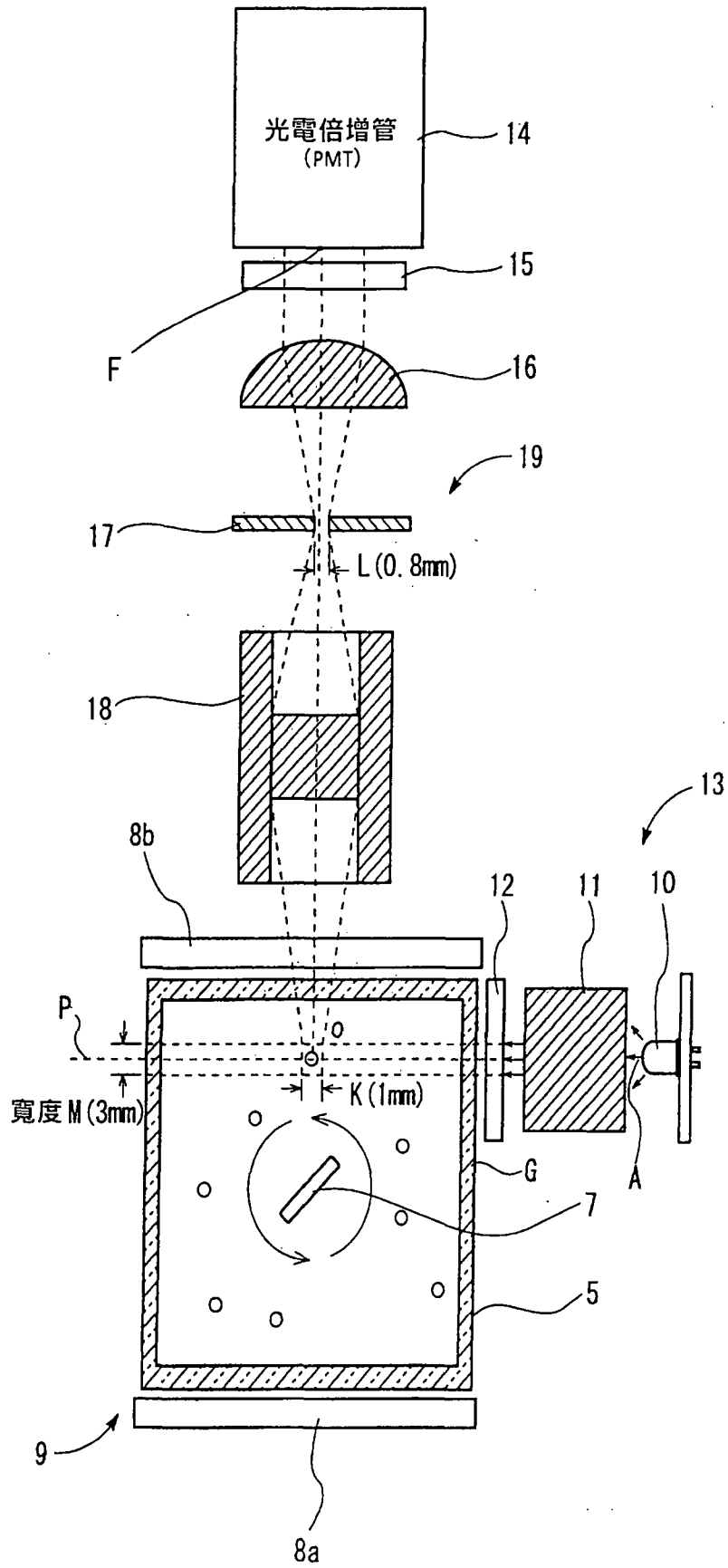


圖 2



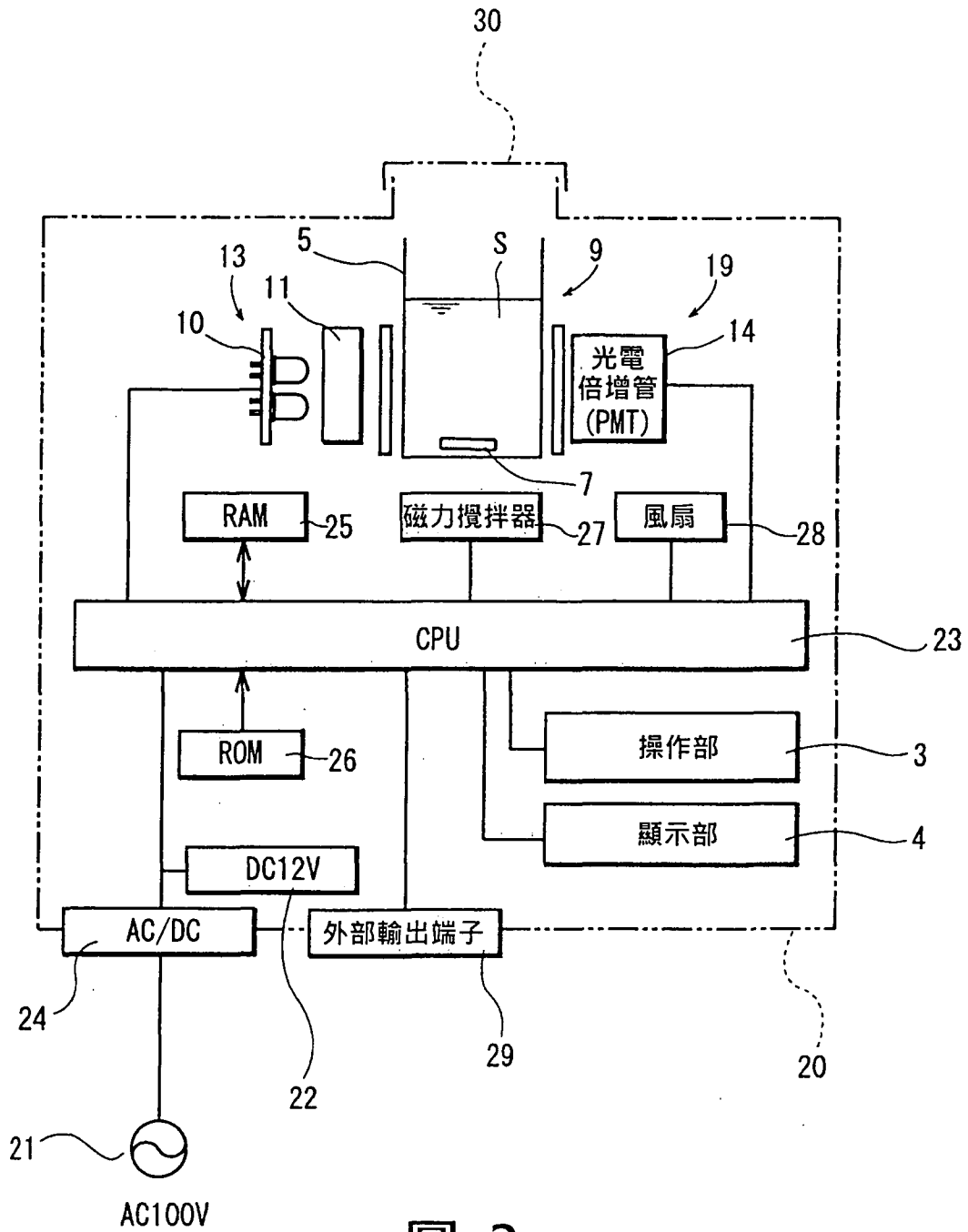


圖 3

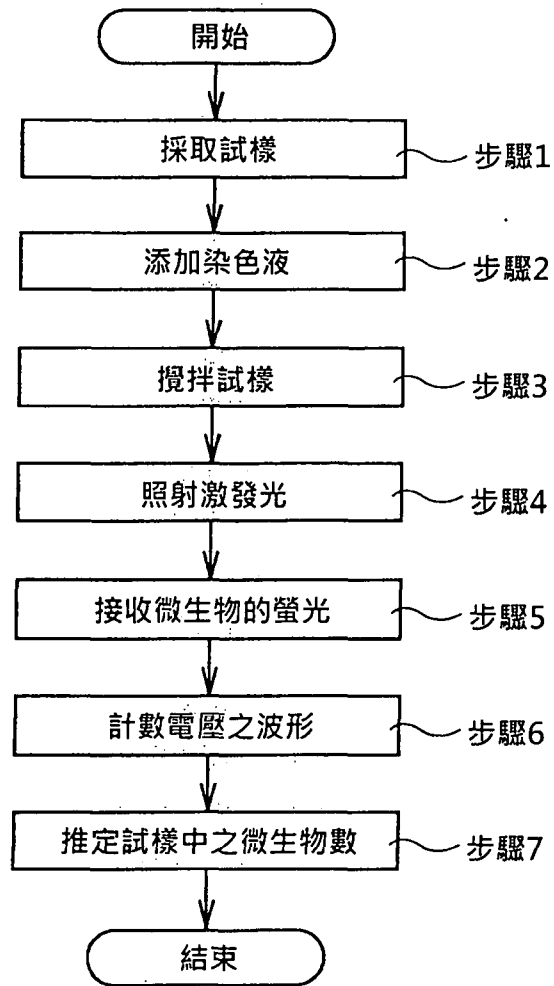


圖 4

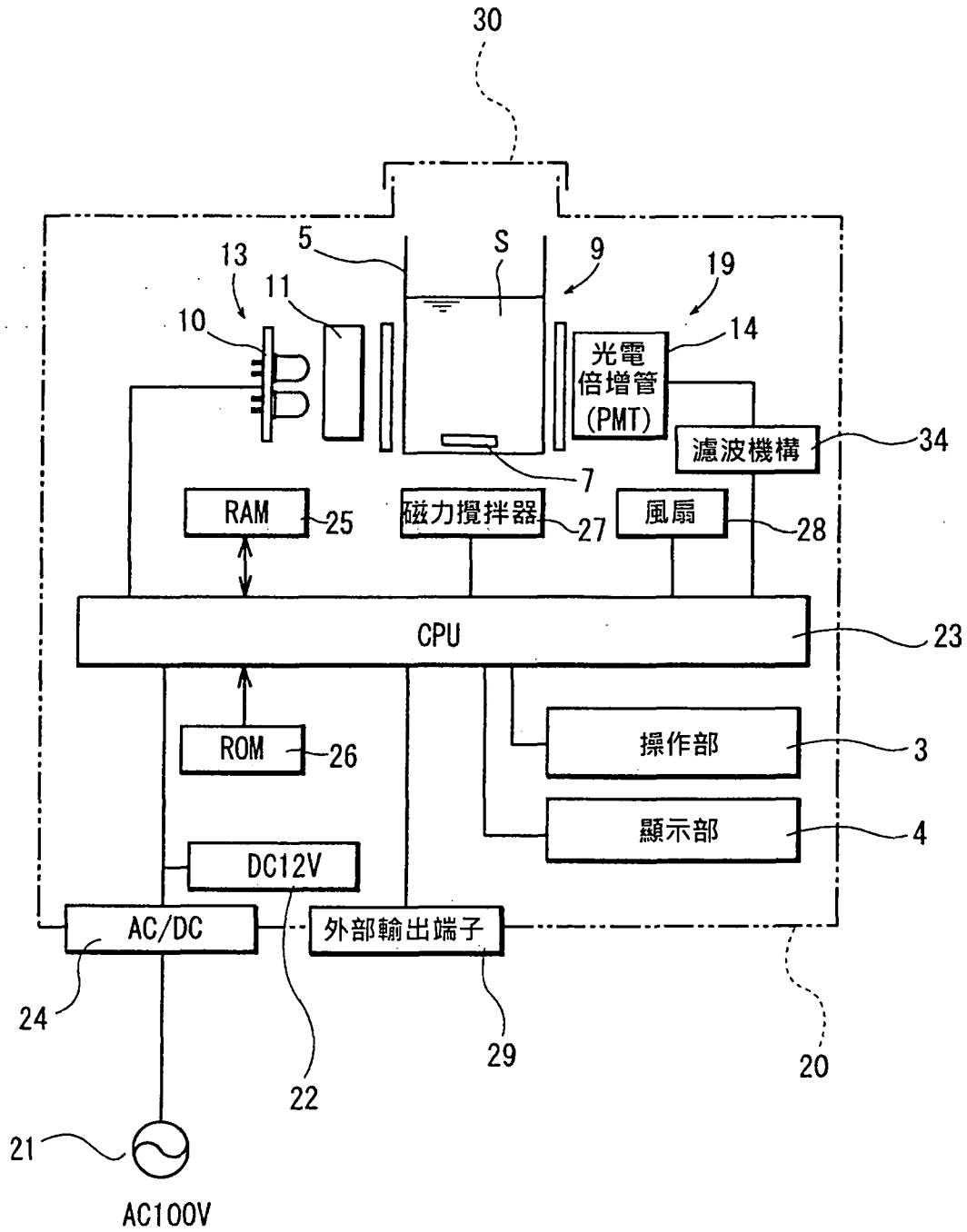


圖 5

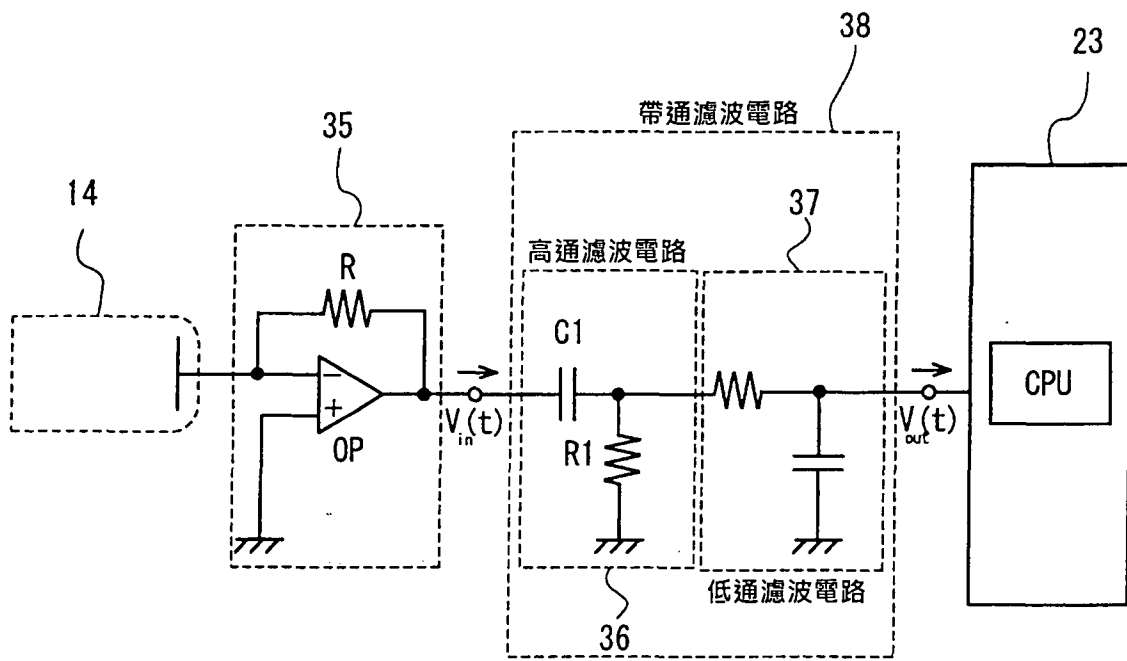


圖 6

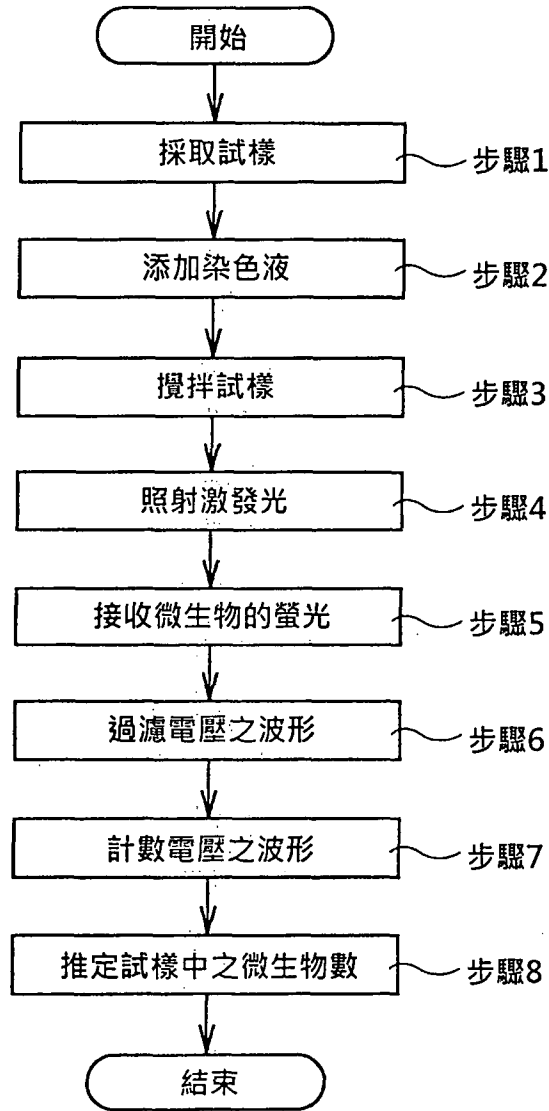


圖 7

圖 8A

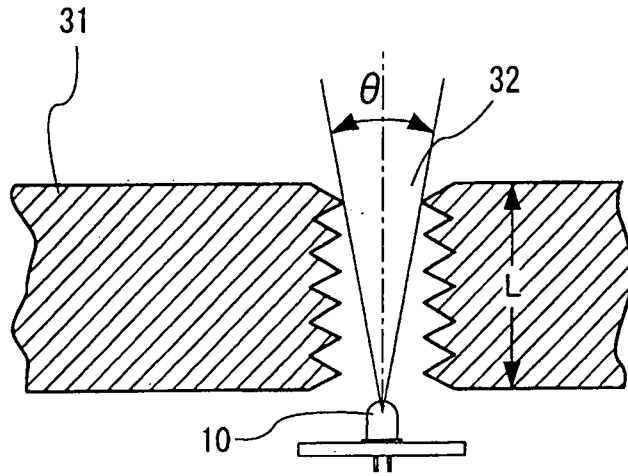
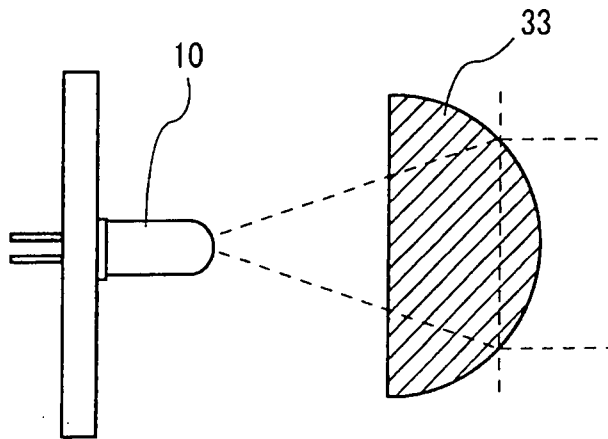


圖 8B



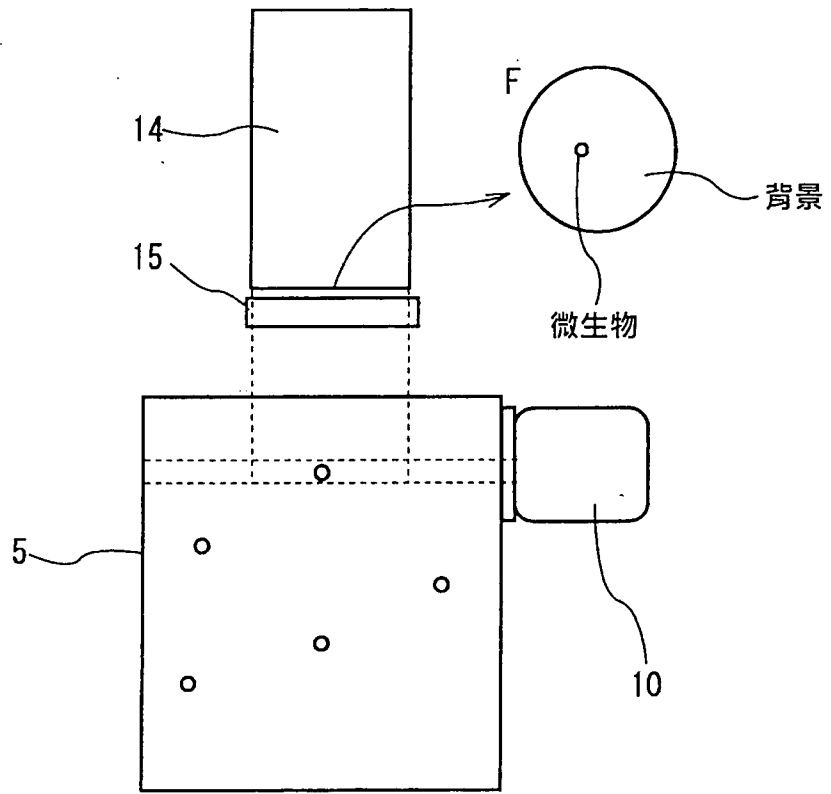


圖 9A  
不具狹縫

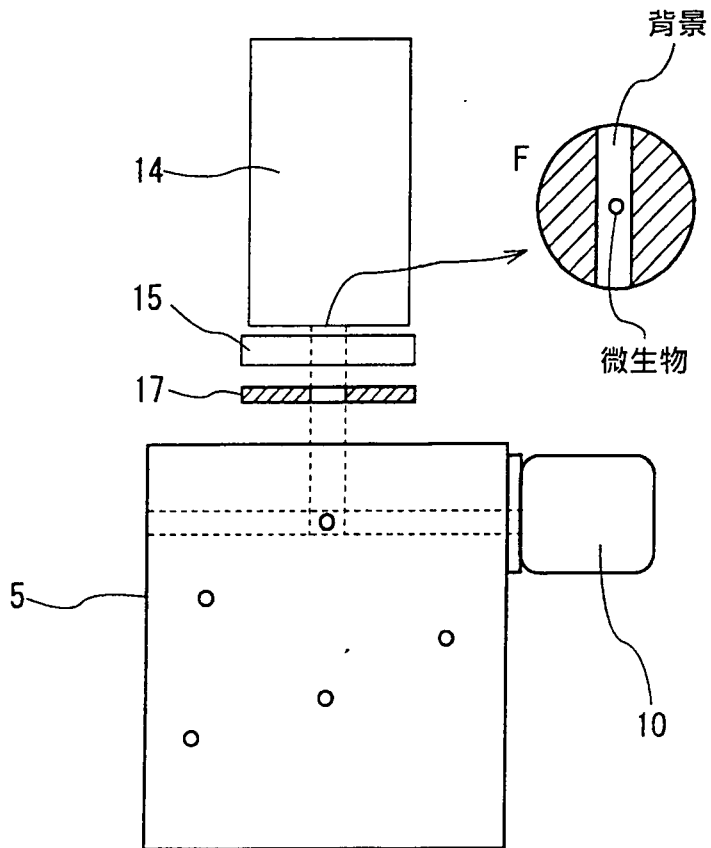


圖 9B  
具有狹縫

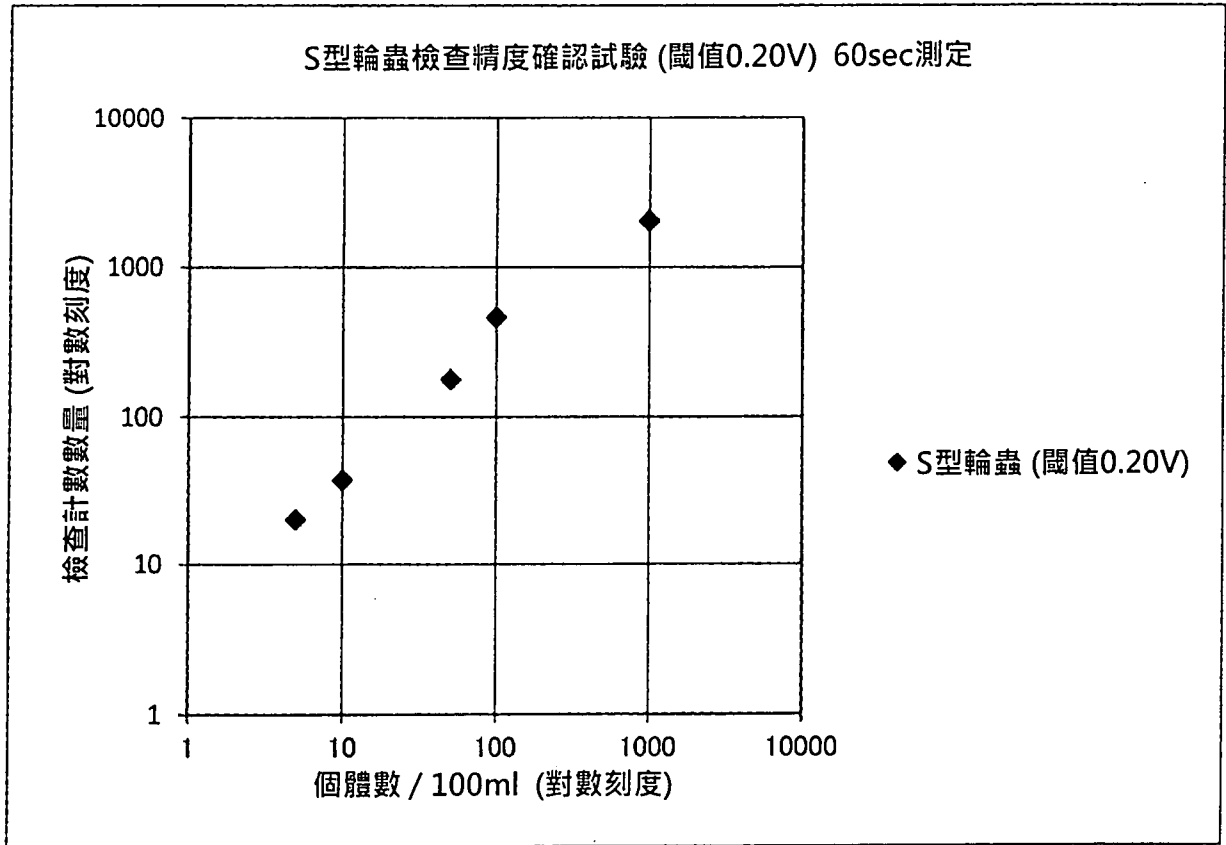


圖 10A

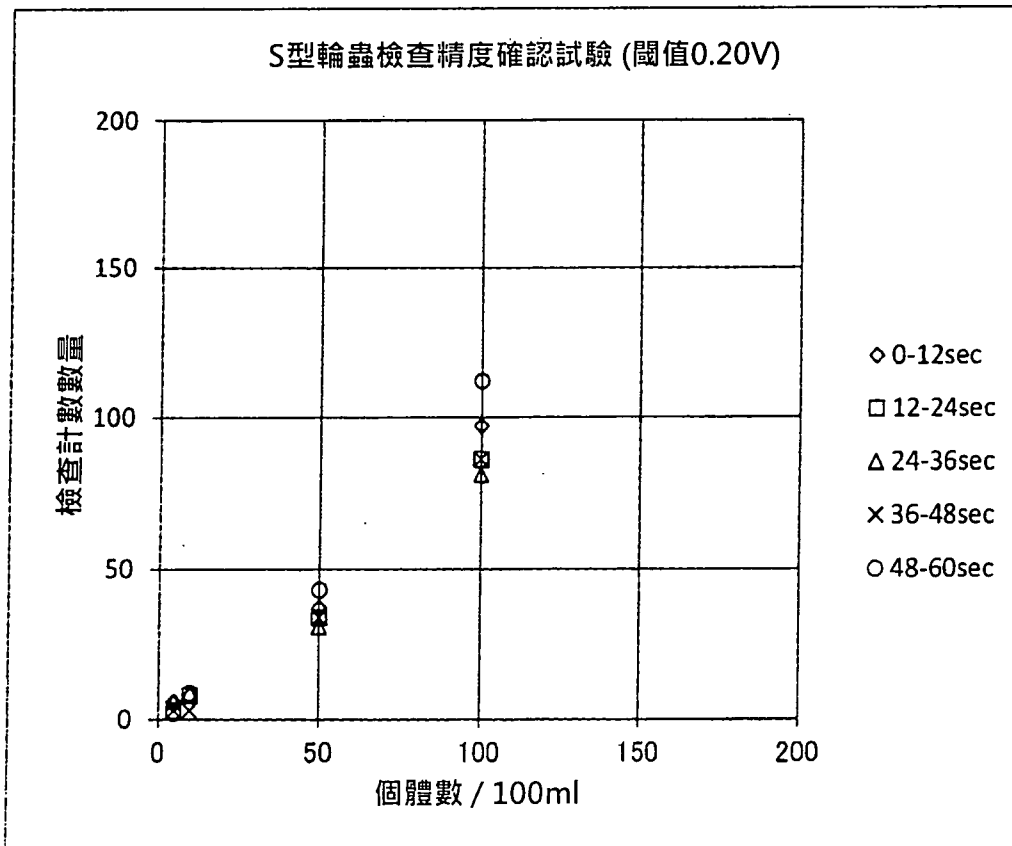


圖 10B

【塊體式狹縫型】LIVE/DEAD TEST

※ 攪拌器 約360rpm, 控制電壓0.680V, 染色時間30分

圖 11A

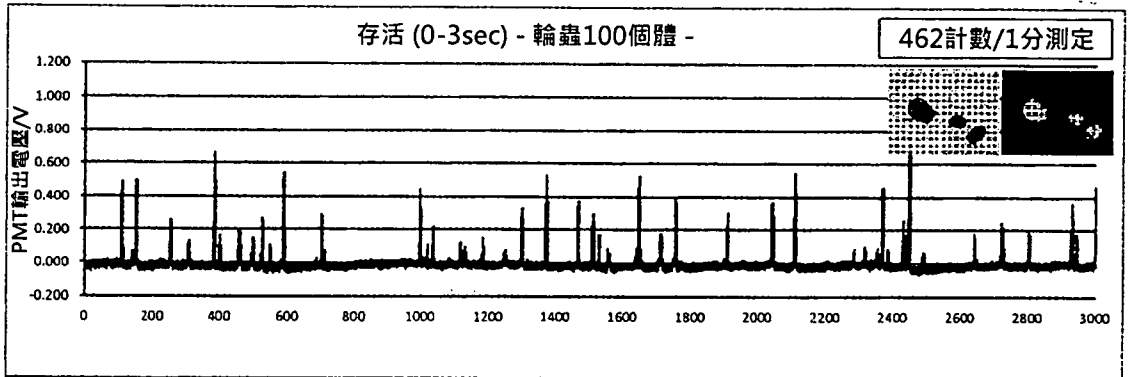


圖 11B

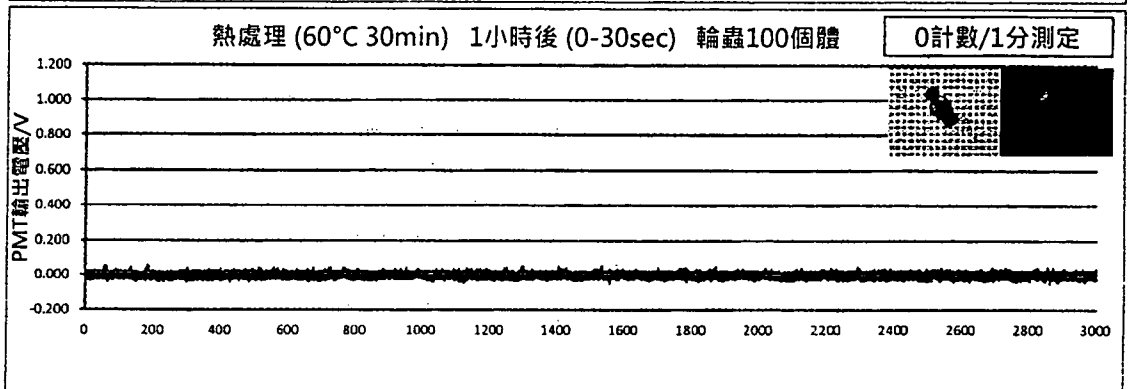


圖 11C

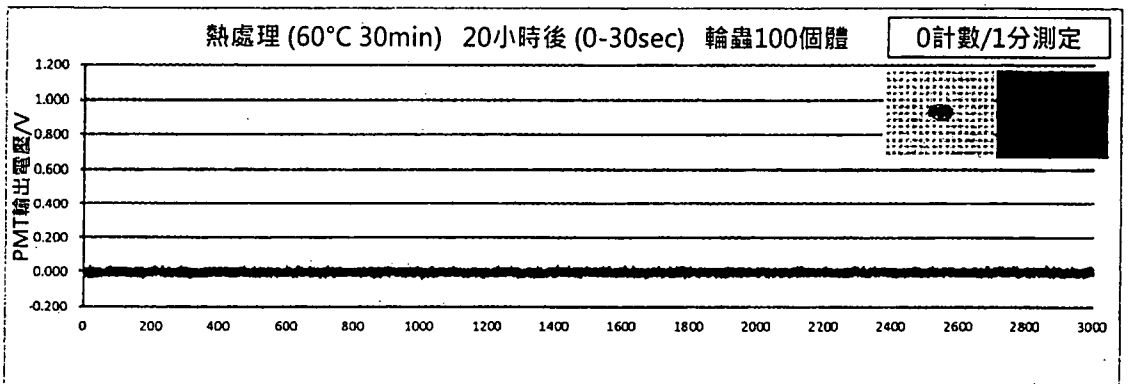


圖 11D

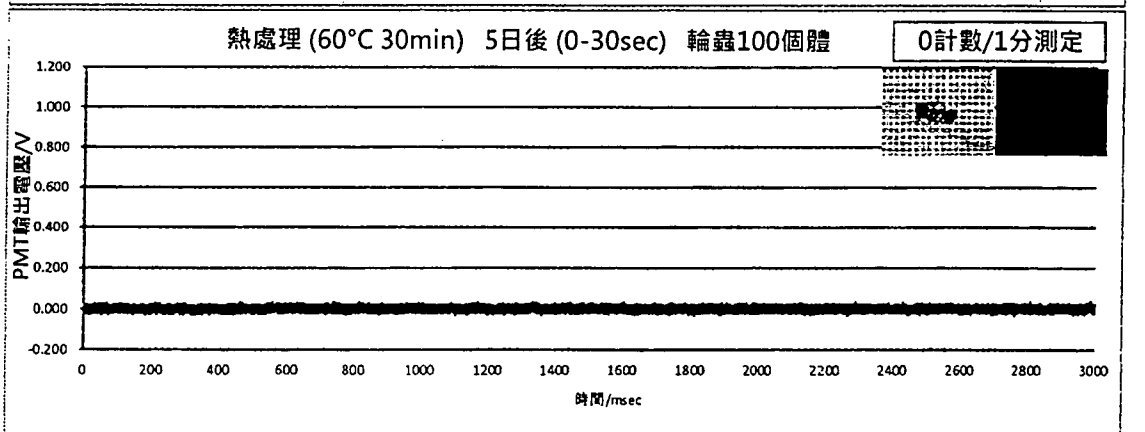


圖 12A

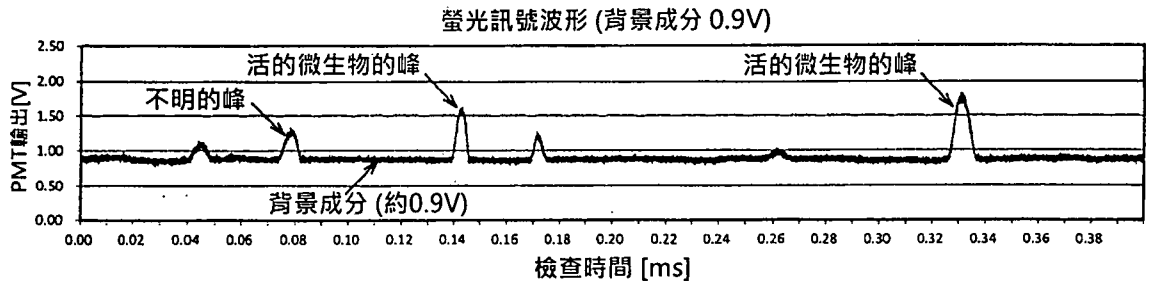


圖 12B

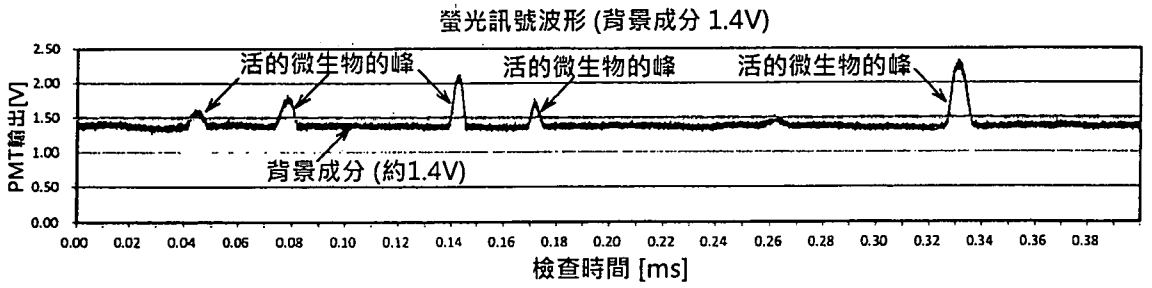


圖 12C

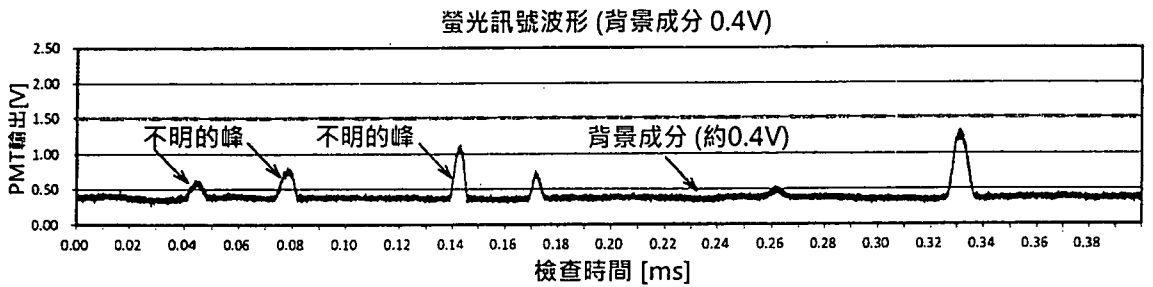


圖 13A

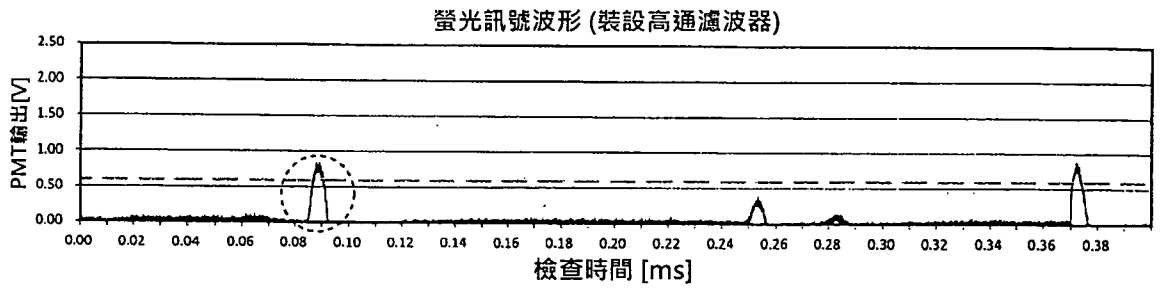


圖 13B

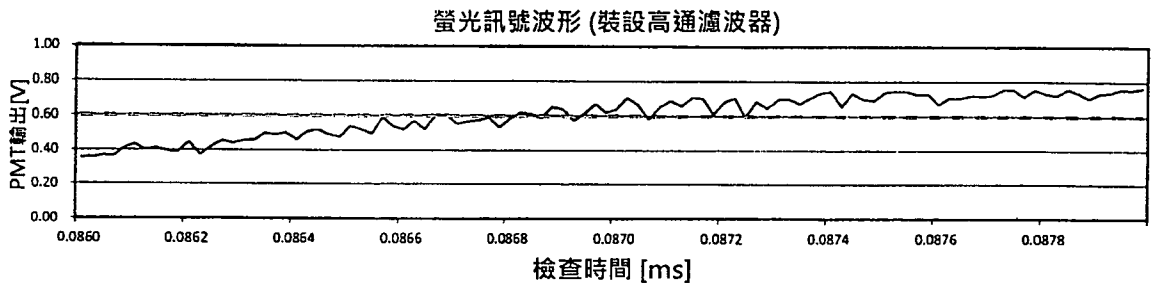


圖 13C

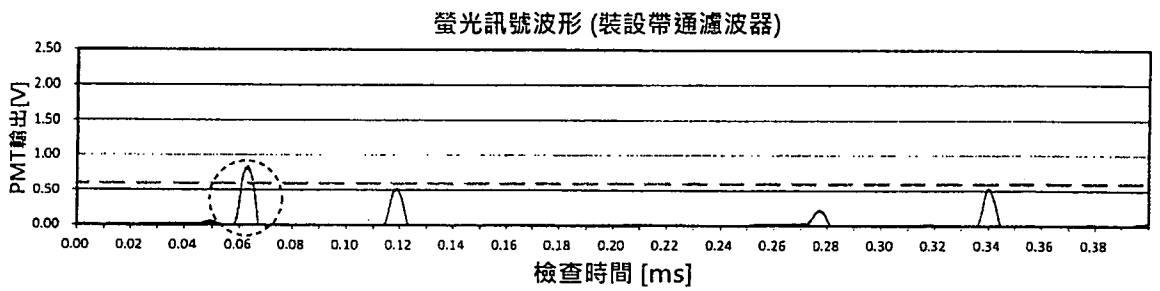


圖 13D

