

# 石英晶體微天平感測系統的牛乳微生物快速檢測<sup>(1)</sup>

李素珍<sup>(2) (4)</sup> 張谷昇<sup>(3)</sup> 張菊犁<sup>(2)</sup> 林金鳳<sup>(2)</sup>

收件日期：96年8月30日；接受日期：97年2月5日

## 摘要

本試驗為獲得快速且簡便的微生物檢驗系統，將一對電極串接於石英晶體振盪電路的回授路徑，形成一串聯式壓電石英晶體感測系統，利用微生物繁殖所致電容之變化來改變振盪頻率，以 LabView<sup>®</sup> 圖形介面軟體撰寫振盪頻率量測程式。以 *Escherichia coli* 為檢測對象，結果：可檢測 *E. coli* 菌數之範圍為  $7.0 \times 10^7$  至  $7.0 \times 10^1$  CFU/mL，檢測時間約需 1 至 17 小時，菌數愈高時所須檢測時間愈短 ( $r = -0.988$ )。與傳統法檢測 *E. coli* 菌數相關高 ( $y = -0.2723x + 6.4783$ ,  $R^2 = 0.9633$ )，且檢測時間縮短相當多。可繼續修改此感測微生物系統，以擴充其量測能力，供為其它菌種定量分析，並提升檢測靈敏度。

關鍵詞：牛乳、石英晶體微天平、大腸桿菌、快速檢測。

## 緒言

食品病原菌的檢測對食品衛生安全非常重要，傳統方法花費時間長缺時效性。因此，有必要進行快速方法檢測。許多方法已被開發出來，如 ATP 法 (Niza *et al.*, 2000)、直接螢光過濾法 (Rosmini *et al.*, 2004)、電化學法 (Felice *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004) 等。ATP 法及直接螢光過濾法雖然快速，但是操作繁複。電化學法為最早期應用電學的方法，可於 24 小時內測得微生物 (Silley and Forsythe, 1996; Qu *et al.*, 1998; Wawerla *et al.*, 1999)，故被廣泛應用，然而仍有些缺失，譬如，診測電極之極化，僅適用於低離子濃度之培養基且設備昂貴等 (Deak and Beuchat, 1993; Laureyn *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002)。有些新技術可達靈敏度要求，但是檢驗時間較長，如 PCR 法，可以放大少量的遺傳物質，進而測定菌數，但操作時間近數小時，且需專門技術人員 (Jianghong *et al.*, 1996; Berrettoni *et al.*, 2004)。

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1417號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 元培科技大學。

(4) 通訊作者，E-mail：sjlee@mail.tlri.gov.tw。

依 95 年 11 月 24 日衛署食字第 0930410787 號令發布，衛署食字第 0950409498 號令修正之鮮乳衛生標準，大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 需陰性。因生乳之污染程度可能影響加工後成品殘留大腸桿菌之數目，故其檢測非常重要。*E. coli* 之菌數為乳品是否加工處理得當之指標，也是乳品使用期限 (shelf-life) 之重要指標。然而傳統之檢測方法，不僅操作過程繁雜，又須花費相當時間約 4 日以上，時效上往往不能符合需求，因此，有必要提出一快速及簡便的檢測方法，以導電度變化檢測微生物菌數的方法已有儀器上市，如 Malthus 及 Bactometer，但因受限其系統設備昂貴，而且只適用於低離子濃度之培養基。石英晶體微量天平 (quartz crystal microbalance, QCM) 因具有高靈敏度、低成本且石英晶體於振盪中能量損失低的優點，再輔以訊號轉換介面就可以組成一感測裝置，因此廣泛被應用於微量物質的檢測。當施加一機械應力於石英晶體時，會使石英晶體相對產生一電位差，電位差與施加之應力呈正比，稱為壓電效應 (piezoelectric effect) (黃，2000)。QCM 裝置常被用來精密測量各種氣體含量 (朱，2002) 或進行免疫檢測 (熊，1997) 等，因其振頻高，故可提升檢測之敏感度 (Dickert *et al.*, 1998)。然而此元件與液體接觸時有嚴重傳播損失，將無法有效使用於生物檢測，若將 QCM 串聯一對電極，利用電極阻抗變化來檢測生物反應，應可克服上述問題，由於其振頻相當穩定，將有潛力發展成為一個穩定的生物檢測系統 (Qu, 1998)。因此，基於以上論點，本試驗擬建構串聯式壓電石英晶體微量天平感測系統，進行微生物檢測。

## 材料與方法

### I. 材料

#### (i) 串聯式壓電石英晶體微量天平感測系統構築之材料

石英晶體：AT-cut 10 MHz；電極：銀電極雙面覆蓋、直徑 0.44 公分；溫度計、恆溫培養箱、電源供應器、頻率計數器、鉑絲。

#### (ii) 鮮乳購自市售 300 mL 裝之 Tetra Pak 鮮乳。大腸桿菌 (*Escherichia coli*) (ATCC 15489) 購自食品工業研究所，以 Chromocult 培養基 (Difco, USA) 37 °C 隔夜培養。

### II. 試驗方法

#### (i) 串聯式壓電石英晶體微天平感測系統之構築

以一對電極串接於一 10 MHz 石英晶體振盪電路的回授路徑，利用回授路徑阻抗 (阻抗為導電度之倒數) 變化來控制振盪器之振頻，將導電度訊號轉換成振頻訊號，並以 LabView® (AT-MIO-16E, National Instruments, Austin, Texas, USA) 圖形介面軟體撰寫振盪頻率之量測程式，透過頻率計數器判讀，以電腦全程記錄圖形及各項數據。

#### (ii) 串聯式壓電石英晶體微天平感測系統之穩定性測試：以剛切割之石英晶體於 35°C 恆溫環境下，每 30 分鐘自動紀錄一次頻率數據，連續紀錄 24 hr。

#### (iii) 串聯式壓電石英晶體微天平感測系統之再現性測試：於 35°C 恆溫環境下，以同一石英晶片測試濃度 $1.0 \times 10^3$ CFU/mL 之 *E. coli*，連續測試 10 次，自動紀錄頻率數據。

#### (iv) 微生物檢測

市售鮮乳添加不同濃度菌數之 *E. coli*，使最初 *E. coli* 菌數介於 Log 2 至 Log 8 之間。

##### (a) 建立不同濃度 *E. coli* 菌數於串聯式壓電石英晶體微天平感測系統之頻率變化。

##### (b) 依中國國家標準法 (CNS, 2000) 進行傳統法及串聯式壓電石英晶體微天平感測系統同時檢測 *E. coli* 菌數，並比較兩者相關。

#### (v) 統計方法：SAS (1985) 建立迴歸線，統計兩者相關。

## 結果與討論

### I. 串聯式壓電石英晶體微天平感測系統之構築及測試

本研究利用一對電極串接於一 10 MHz 石英晶體架構微生物感測系統，如示意圖（圖 1）。石英本身具有反壓電效應的特性，當在石英晶體表面施加電場時，石英晶體便會因此而振盪，而振盪的頻率會隨著吸附在石英晶體表面的質量多寡而改變，頻率的改變與吸附的質量成正比，吸附的質量愈多，頻率下降也愈多（黃，2000）。將此石英晶體微天平感測系統置 35 °C 恆溫箱內，微生物繁殖所致電極間之阻抗變化轉換成振頻訊號（Gebbert *et al.*, 1992；Berggren *et al.*, 1998），並以 LabView<sup>®</sup> 圖形介面軟體撰寫振盪頻率之量測程式，可即時監控微生物生長狀況，並透過頻率計數器判讀，用來診測微生物之菌數，以電腦全程記錄圖形及各項數據，其作業模式如圖 2。

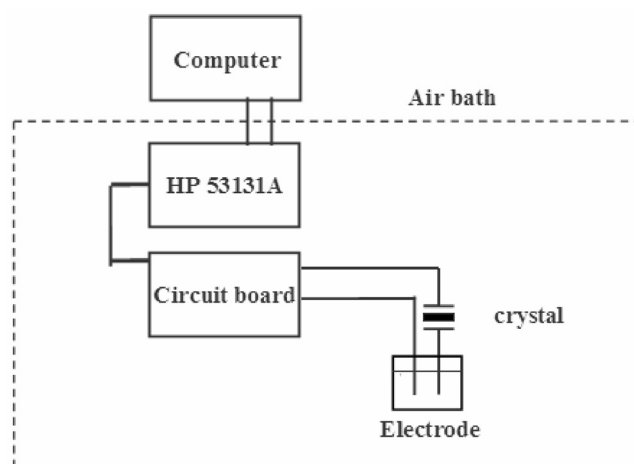


圖 1. 串聯式壓電石英晶體微天平感測系統示意圖。

Fig. 1. Diagram of microorganism examination system with a series electrode piezoelectric quartz crystal microbalance sensor.

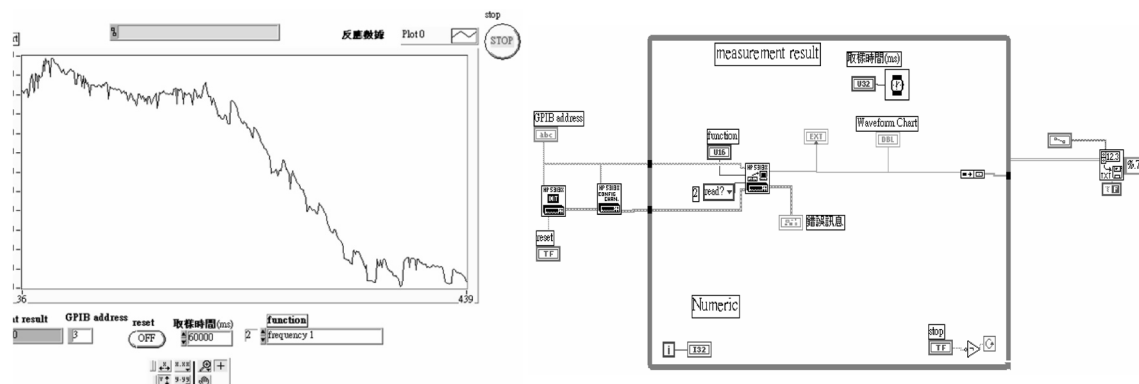


圖 2. 以 LabView<sup>®</sup> 圖形介面軟體撰寫之振盪頻率量測程式(左圖為結果顯示面版，右圖為程式部分)。

Fig. 2. LabView<sup>®</sup> graphic interfaced software was used as a measuring program to help infrastructure this microorganism examination system. (Left figure is the results shown on screen; right figure shows the codes).

系統建構完成，首先測試其穩定性，試驗對象 *E. coli* 的培養溫度為 35°C (CNS, 2000)，故於 35 °C 恆溫環境下測試，其方法為將剛切割完畢之石英晶體裝置於系統中，待頻率穩定後，每 30 分鐘自動紀錄一次頻率數據，連續紀錄 24 hr。結果系統於 35°C 恆溫環境下 24 hr 之穩定度為  $\pm 2$  Hz/hr。

系統再現性測試，於 35°C 恆溫環境下以同一石英晶體測試濃度  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL 之 *E. coli*，連續測試 10 次，頻率平均為 8,001,136 Hz，相對標準偏差為 3.50 %。

## II. 微生物檢測

應用串聯式壓電石英晶體微天平感測系統進行大腸桿菌 (ATCC 15489) 之檢測，將不同濃度 *E. coli* 接種至鮮牛乳中，使最初 *E. coli* 菌數介於 Log 2 至 Log 8 之間。鮮牛乳之蛋白質會被 *E. coli* 分解成帶電荷之小分子，當微生物繁殖至對數期時，培養基中的離子濃度變化相當顯著，記錄頻率數據及離子濃度迅速增加所需要的時間，稱為檢測時間 (detection time)。試驗結果：檢測範圍為  $7.0 \times 10^7$  至  $7.0 \times 10^1$  CFU/mL，檢測時間與鮮乳中 *E. coli* 菌數成反比關係 ( $r = -0.988$ )，菌數愈高時所需檢測時間愈短，菌數  $7.0 \times 10^1$  CFU/mL 時對應之檢測時間約 17 小時，而  $7.0 \times 10^7$  CFU/mL 時僅須約 1 小時，且菌數愈高時檢出頻率數據愈低 (圖4)；此感測系統與傳統法檢測 *E. coli* 菌數比對，迴歸式  $y = -0.2723x + 6.4783$ ， $R^2 = 0.9633$  (圖5)。顯示：此感測系統法與傳統法檢測 *E. coli* 菌數相關高，且檢測 *E. coli* 菌數的時間與傳統法需 4 日以上比較，時間縮短相當多。另與張 (1997) 之類似設計，檢測對象也是 *E. coli* (ATCC 25922) 比較，所得之檢測範圍相近 (為  $2.4 \times 10^7$  至  $2.4 \times 10^1$  CFU/mL)，最低值對應之檢測時間相近，約為 1.6 小時，而最高值對應之檢測時間則較長 (僅約 8.2 小時)。

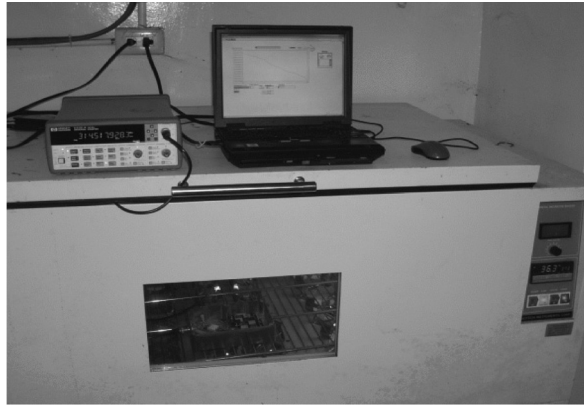


圖 3. 串聯式壓電石英晶體微量天平感測系統作業圖。

Fig. 3. Series electrode piezoelectric quartz crystal microbalance sensor in rapid determination of microorganism.

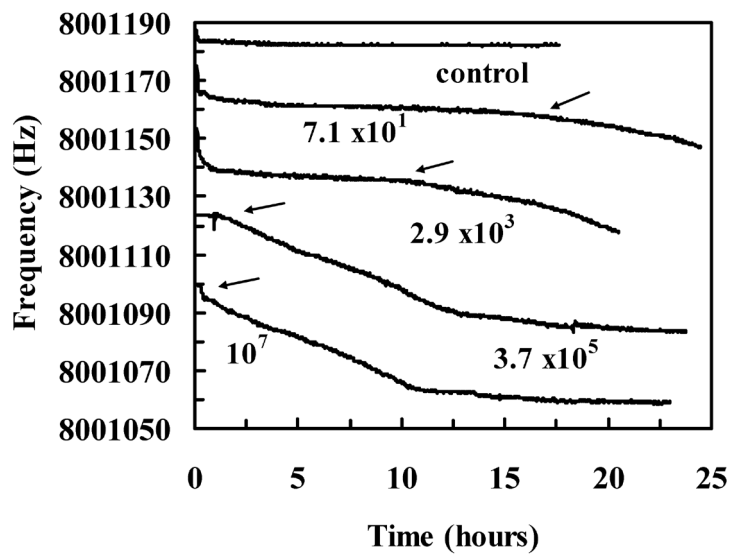


圖 4. *E. coli* 濃度對串聯式壓電石英晶體微量天平感測系統之應答曲線。

Fig. 4. The detection time and frequency distribution of the content of *E. coli* under series electrode piezoelectric quartz crystal microbalance sensor.

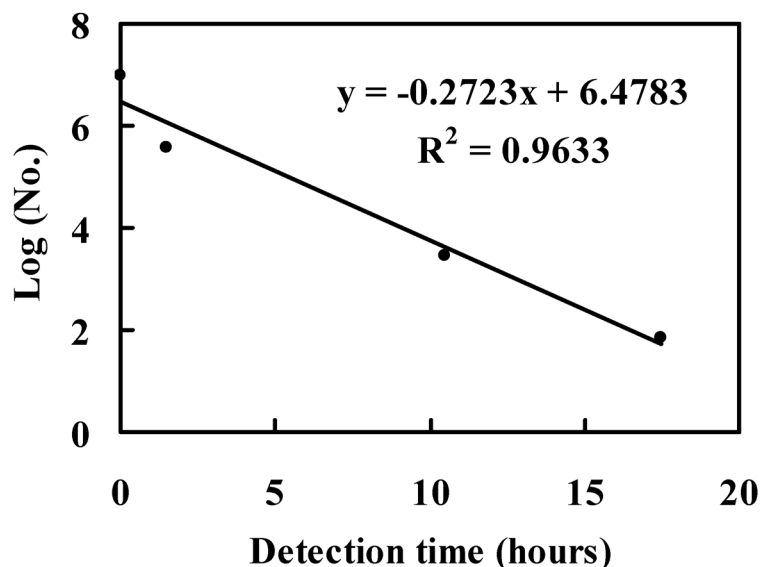


圖 5. 串聯式壓電石英晶體微量天平感測器與傳統檢驗法檢測 *E. coli* 菌數之比對。

Fig. 5. Comparison between using series electrode piezoelectric quartz crystal microbalance sensor and traditional counting method for detecting the content of *E. coli*.

乳品之 *E. coli* 菌數為乳品是否加工處理得當之指標，也是乳品品質及使用期限的重要指標。然而傳統之檢測方法，不僅操作過程繁雜，而且須花費相當時間進行培養，時效上往往不能符合需求。國內曾引進以導電度變化檢測微生物菌數的儀器，如 Malthus 及 Bactometer（目前已停用），因其系統設備昂貴，且僅能使用其開發的低離子濃度之培養基為其缺點。本試驗所架構的微生物感測系統，成本不高，初步試驗可檢測 *E. coli* 之菌數，其檢測時間與導電度檢測儀 Malthus 相同，即菌數愈高者，所需檢測時間愈短，菌數愈低者則相反。本試驗目前最低可檢測 *E. coli* 之菌數為  $7.0 \times 10^1$  CFU/mL。擬進一步測試此感測微生物系統，以擴充其量測能力，供為其它菌種定量分析，並提升檢測靈敏度。

## 結論與建議

本試驗所架構的串聯式壓電石英晶體微天平感測微生物系統，初步試驗可檢測 *E. coli* 之菌數，檢測範圍為  $7.0 \times 10^7$  至  $7.0 \times 10^1$  CFU/mL，檢測時間約需 1 至 17 小時，菌數愈高時所須檢測時間愈短。與傳統法檢測 *E. coli* 菌數相關高，且檢測 *E. coli* 時間與傳統需 4 日以上比較，時間縮短相當多。擬進一步測試此感測微生物系統，以擴充其量測能力，供為其它菌種定量分析，並提升檢測靈敏度。

## 參考文獻

- 朱延和。2002。石英晶體微量天平法分子辨識之應用。第八屆化學感測科技研討會。國立雲林科技大學，雲林。
- 食品微生物檢驗-大腸桿菌檢驗。2000。中國國家標準總號CNS 10951、類號N 6192。經濟部標準檢驗局。
- 張炳華。1997。串聯式壓電晶體感測系統的微生物快速檢測。國立成功大學醫學工程研究所碩士論文，台南市。
- 黃麒豪。2000。石英晶體微量天平之有機薄膜氣體感測之應用。國立台灣科技大學碩士論文，台北市。
- 熊頌聲。1997。石英晶體微量天平於免疫檢測應用上之研究。國立成功大學碩士論文，台南市。
- Berggren, C., B. Bjarnasson and G. Johansson. 1998. An immunological interleukine-6 capacitive biosensor using perturbation with potentiostatic step. *Biosens. Bioelectron.* 13:1061-1068.
- Berrettoni, M., D. Tonelli, P. Conti, R. Marassi and M. Trevisani. 2004. Electrochemical sensor for indirect detection of bacterial population. *Sens. Actuat. B* 102:331-335.
- Deak, T. and L. R. Beuchat. 1993. Comparison of conduct metric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices. *J. Appl. Bacteriol.* 75:546-550.
- Dickert, F. L., P. Forth, W. E. Bulst, G. Fischerauer and U. Knauer. 1998. SAW devices-sensitivity enhancement in going from 80 MHz to 1 GHz. *Sens. Act.* B46:120-125.
- Gebbert, A., M. Alvarez-Icaza, W. Stocklein and R. D. Schmid. 1992. Real-Time monitoring of immunochemical interactions with a tantalum capacitance flow-through cell. *Anal. Chem.* 64:997-1003.
- Felice, C. J., R. E. Madrid, J. M. Olivera, V. I. Rotger and M. E. Valentinuzzi. 1999. Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *J. Microbial. Meth.* 35:37-42.
- Jianghong, M., Z. Shaohua, P. Doyle Michael, E. Mitchell Sharon and S. Kresovich. 1996. Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157: H7. *Int. J. Food Microbial.* 32:103-113.
- Laureyn, W., D. Nelis, P. Van Gerwen, K. Baert, L. Hermans, R. Magnee, J. J. Pireaux and G. Maes. 2000. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. *Sens. Actuat. B* 68:360-370.
- Niza-Ribeiro, J., A. C. Louza, P. Santos and M. Lima. 2000. Monitoring the microbiological quality of raw milk through the use of an ATP bioluminescence method. *Food Control* 11:209-216.
- Qu, X., L. Bao, X. Su and W. Wei. 1998. A new method based on gelation of tachypleus amebocyte lysate for detection of *Escherichia coliform* using a series piezoelectric quartz crystal sensor. *Anal. Chim. Acta* 374:47-52.
- Rosmini, M. R., M. L. Signorini, R. Schneider and J. C. Bonazza. 2004. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerophilic aerobic bacteria in raw milk. *Food Control* 15:39-44.
- SAS. 1985. Users Guide: Statistics. SAS Inst., Carry, NC.
- Silley, P. and S. Forsythe. 1996. Impedance microbiology-a rapid change for microbiologists. *J. Appl. Bacteriol.* 80:233-243.
- Wawerla, M., A. Stolle, B. Schalch and H. Eisgruber. 1999. Impedance microbiology : applications in food hygiene. *J. Food Prot.* 62:1488-1496.
- Yang, L., Y. Li, C. L. Griffis and M. G. Johnson. 2004. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor

- for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. Biosens. Bioelectron. 19:1139-1147.
- Zhang, S., W. Wei, J. Zhang, Y. Mao and S. Liu. 2002. Effect of static magnetic fields on growth of *Escherichia coli* and relative response model of series piezoelectric quartz crystal. Analyst 127:373-377.

# Development and application of quartz crystal microbalance sensor for rapid determination of cow milk microorganisms<sup>(1)</sup>

Sue-Jan Lee<sup>(2)(4)</sup> Ku-Shang Chang<sup>(3)</sup> Chu-Li Chang<sup>(2)</sup>  
and King-Feng Lin<sup>(2)</sup>

Received : Aug. 30, 2007 ; Accepted : Feb. 5, 2008

## Abstract

The purpose of this experiment was to obtain a convenient and rapid system for determination of microorganisms in milk. We put a pair of electrode and a quartz crystal into series connection to develop a high sensitive conductive device. Under certain circumstances, the characteristic output frequency depended on the conductance between the electrodes. The growth of microorganisms would alter electric capacity to change the frequency. LabView<sup>®</sup> graphic interfaced software was used as a measuring program to help infrastructure this microorganism examination system. *Escherichia coli* was the object of this examination. The results showed that the detection time was 1 to 17 hrs with respect to  $7.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^1$  CFU/mL with the correlation coefficient  $r = -0.988$ . There was close correlation between our home made series electrode piezoelectric quartz crystal microbalance sensor system and the traditional method to examine the content of *E. coli* ( $y = -0.2723x + 6.4783$ ,  $R^2 = 0.9633$ ). The detection time of content of *E. coli* was shorter than the traditional method. The working range and the sensitivity of our sensor system will be continuously improved to meet the other analytical demands.

Key words : Cow milk, Quartz crystal microbalance, *Escherichia coli*, Rapid determination.

---

(1) Contribution No. 1417 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Hsinchu 300, Taiwan, R.O.C.

(3) Yuanpei University of Technology, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: sjlee@mail.tlri.gov.tw.

