

以電導法檢測旗魚肉中之生菌數及大腸桿菌群

戴金華 張長泉

食品工業發展研究所

摘 要

本研究探討電導法(conductimetric method)應用於旗魚生魚片中生菌數和大腸桿菌群(coliforms)快速檢測之可行性。應用Malthus 2000 (Malthus Instruments Limited, Crawley, England)測得之電導檢測時間(detection time)和生菌數及大腸桿菌群數目之對數值相關性良好,其線性迴歸係數分別為 -0.87 及 -0.92 。電導法具有快速及自動化之優點,可以做為旗魚生魚片中生菌數及大腸桿菌群快速檢測之用。

前 言

魚肉在處理過程中所污染的細菌,是決定其品質的主要關鍵⁽¹⁾。生魚片為部分國人所喜歡,常由旗魚、鮪魚或潮鯛等分切而成,不經加熱處理即食用,故其衛生狀況相當重要。在食品衛生上,生菌數及大腸桿菌群是食品衛生重要的指標菌,以傳統方法檢測分別需要二天及四天的時間,若有快速的檢驗方法,也許可以在較短時間內知道生魚片中上述兩類細菌之污染狀況。

近20年來,微生物快速及自動化檢驗的理念及產品相繼問世,克服了一些傳統方法所存在的缺點,如人力的花費和分析時間太長等⁽²⁾。一些自動化的方法包括:螺旋接種儀(Spiral System Instruments, Inc., Bethesda, MD, USA)^(3,4)、ATP測定法^(5,6)、螢光顯微鏡法⁽⁷⁾及電化學法⁽⁸⁾等。

電導法(conductimetric method)之原理是微生物在培養基中生長時,可將其中較大分子的營養成分代謝成帶電荷較多的小分子,而增加了培養基中之導電度(conductivity)。當培養基中之微生物數量達到 10^6 — 10^7 CFU/ml時,其導電度的改變速率將加快(連續三次測定之結果,每次導電度增加1 microsiemen或以上)。從開始培養到導電度發生急劇變化所需的時間(小時),稱為檢測時間(detection time; DT)。檢測時間與樣品中存在的菌數有相關性,即菌數愈高,檢測時間愈短;反之,則愈長

(8—10)。

電導法在食品微生物檢測上的應用有殺菌後污染的監測⁽¹¹⁾、保存期限的預測⁽¹²⁾及微生物生理機制⁽¹³⁾等。檢測對象則包括生菌數^(10,11,14)、腸內科細菌(*Enterobacteriaceae*)⁽¹⁵⁾、酵母菌⁽¹⁶⁾、乳酸菌⁽¹⁷⁾、沙門氏菌^(18,19)及李斯特菌(*Listeria spp.*)⁽²⁰⁾。在魚肉的檢測上則局限於一些可生成硫化氫(H_2S)之腐敗菌^(14,21)和低溫菌^(14,22)及原料品質或產品之架售期的研究^(12,23)。本研究乃在評估應用電導法於旗魚生魚片中生菌數及大腸桿菌群快速測定的可行性。

材料與方法

一、培養基

測定生菌數之培養基SPYE broth購自Malthus公司(Malthus Instruments Limited, Crawley, England)。平板計數洋菜(plate count agar; PCA)購自Oxoid公司(Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England),為生菌數計數之培養基。Coliform broth為使用電導法測定大腸桿菌群時之培養基,購自Malthus公司。Lauryl sulfate tyryptose (LST) broth及Brilliant green lactose bile (BGLB) broth為Difco公司(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)產品,作為傳統大腸桿菌群最確數(most probable number; MPN)檢測之培養液。monensin

為Sigma公司(St. Louis, MO, USA)的產品,加在培養基內可抑制革蘭氏陽性菌生長。

二、樣品的製備

以具濾膜(filter)的無菌袋(Stomacher 400 bag, Seward, London, England)稱取25公克購自市場之旗魚生魚片,加入225 ml 0.1%蛋白胨水(peptone water)後,以鐵胃(Stomacher 400, Seward, London, England)拍打兩分鐘,取出1 ml樣品液,加入9 ml 0.1%蛋白胨水中,進行10倍系列稀釋,再依傳統法分析生菌數及大腸桿菌群,並以電導測定法進行分析。由於部分生魚片之大腸桿菌群數目較少,不足以建立完整之檢量線(應涵蓋3至4個對數值),故需將部分生魚片樣品置於35°C增菌(abuse)5小時,再均質及做10倍系列稀釋,以建立檢量線。

三、生菌數之電導法測定

各取1 ml 10倍系列稀釋樣品液,加入含2 ml SPYE broth培養液之樣品槽(cell)中。放入Malthus 2000微生物檢測系統(Malthus Instruments Limited, Crawley, England)中,於35°C下進行檢測。每隔6分鐘,儀器會對樣品槽中培養基所產生的導電度(microsiemen, μ S)變化做偵測與分析。由開始培養至導電度發生加速改變(連續三次測定之結果,每次導電度增加1 μ S或以上)的時間(小時),稱之為檢測時間(DT),此時間會由儀器的軟體自動找出。

四、大腸桿菌群之電導法測定

為了得到較佳之電導曲線(即具有平穩的基線,大的斜率變化及高的電導值),在Coliform broth中分別加入brilliant green(終濃度為6.7 mg/l),或在加入brilliant green(6.7 mg/l)後再加入洋菜(agar,終濃度為0.1%),或加入monensin⁽²⁴⁾(終濃度為50 mg/l)等三種處理來進行實驗。各取1 ml 10倍系列稀釋後之樣品液,加入含5 ml 前述三種培養液之樣品槽中。將樣品槽放入Malthus微生物檢測系統中,於35°C下進行電導改變之偵測。

五、電導檢量線之建立

此方法乃利用Malthus 2000對微生物在培養基中生長所引起的導電度變化,進行連續性的偵測,而測出樣品之檢測時間(detection time),在此時連續三次導電度之增加超過一閾值(1 μ S)。此外,經由傳統方法可求得樣品之生菌數及大腸桿菌群數目。由不同的菌數及其相對應之檢測時間,可畫

出菌數對數值與檢測時間之迴歸曲線。檢量線建立後,可依檢測時間來估算不同樣品中生菌數或大腸桿菌群數目。

結果與討論

一、生菌數測定

應用導電度改變之原理,以Malthus 2000檢測64個旗魚樣品生菌數的檢測時間;另外,依照傳統方法測生菌數,將所得之菌數對數值與檢測時間進行迴歸,可得一次線性迴歸直線圖(圖一)。此直線之線性迴歸係數(linear correlation coefficient)為-0.87,其檢測時間(DT)與生菌數對數值之一次方程式為 $DT = 10.976 - 1.443 \log CFU/g$ 。檢量線建立後,待測樣品可以由檢測時間,依據上述方程式求得每克中之生菌數。

Ogden⁽¹⁴⁾及 Gibson 等人⁽²²⁾曾分別以Brain Heart Infusion及nutrient broth, seawater broth, trimethylamine oxide (TMAO) medium等培養液在20°C之下利用電導法檢測魚肉中之生菌數(total viable count),所得菌數與檢測時間相關係數介於

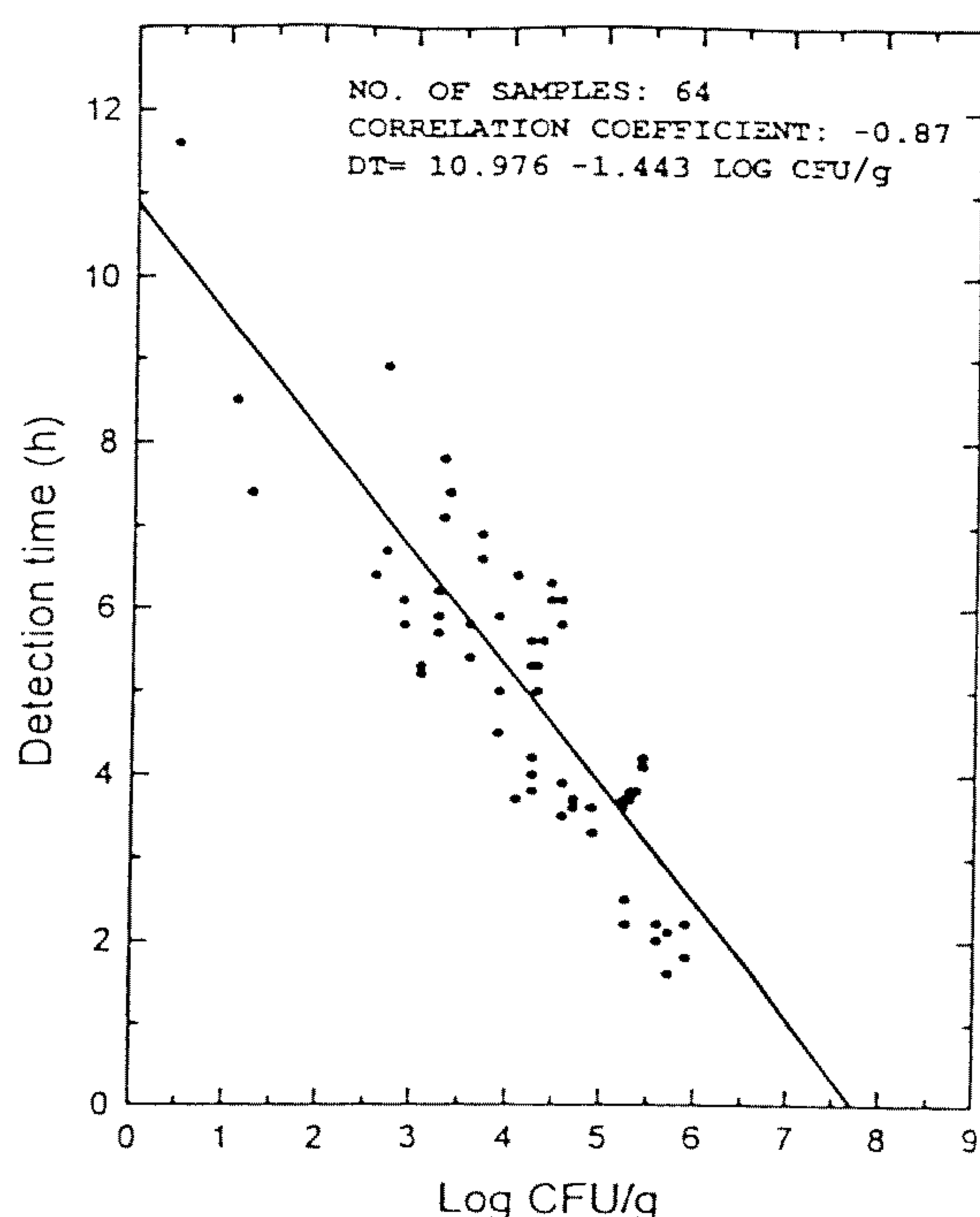


Figure 1. Linear correlation of conductance detection time and logarithm of aerobic plate count of swordfish fillet.

-0.85至-0.89,本研究結果與其相似。但在食品衛生法規上所定義之生菌數,指的是中溫好氣菌(mesophilic aerobic bacteria),乃是在中溫(30~37°C)好氣培養狀態下所測得之菌數;故仍以本研究中之條件較適宜於衛生檢驗之用。

實驗所得菌數與檢測時間相關係數低於-0.90,推測其原因可能是接種至培養液之微生物可能以單一菌體或菌之團塊(clumps)存在,細菌不管是單獨存在或形成團塊,其生長代謝物均會引起培養液中導電度之改變;而在平板培養時,則單一菌體或團塊在平板上皆形成單一菌落(colony forming unit),造成平板菌落計數上之誤差,導致菌數與檢測時間相關係數較低⁽²²⁾。另一方面電導的改變是由微生物分解培養基中基質之結果,反應了這些微生物之總代謝活性(total metabolic activity),由於不同微生物之代謝活性有很大不同,故電導檢測時間與平板法測定所得之菌數,有時不容易有高的相關係數⁽⁸⁾。

二、大腸桿菌群測定

檢測時若以Coliform broth(其中含brilliant green 6.7 mg/l)為培養液,所出現之電導變化曲線有漂浮(drift)現象(圖二A曲線),加入0.1% agar可避免此現象之發生(圖二B曲線)。但在Coliform broth中加入monensin(50 mg/l)時亦有良好之效果(圖二C曲線)。為避免操作時使用洋菜所造成之

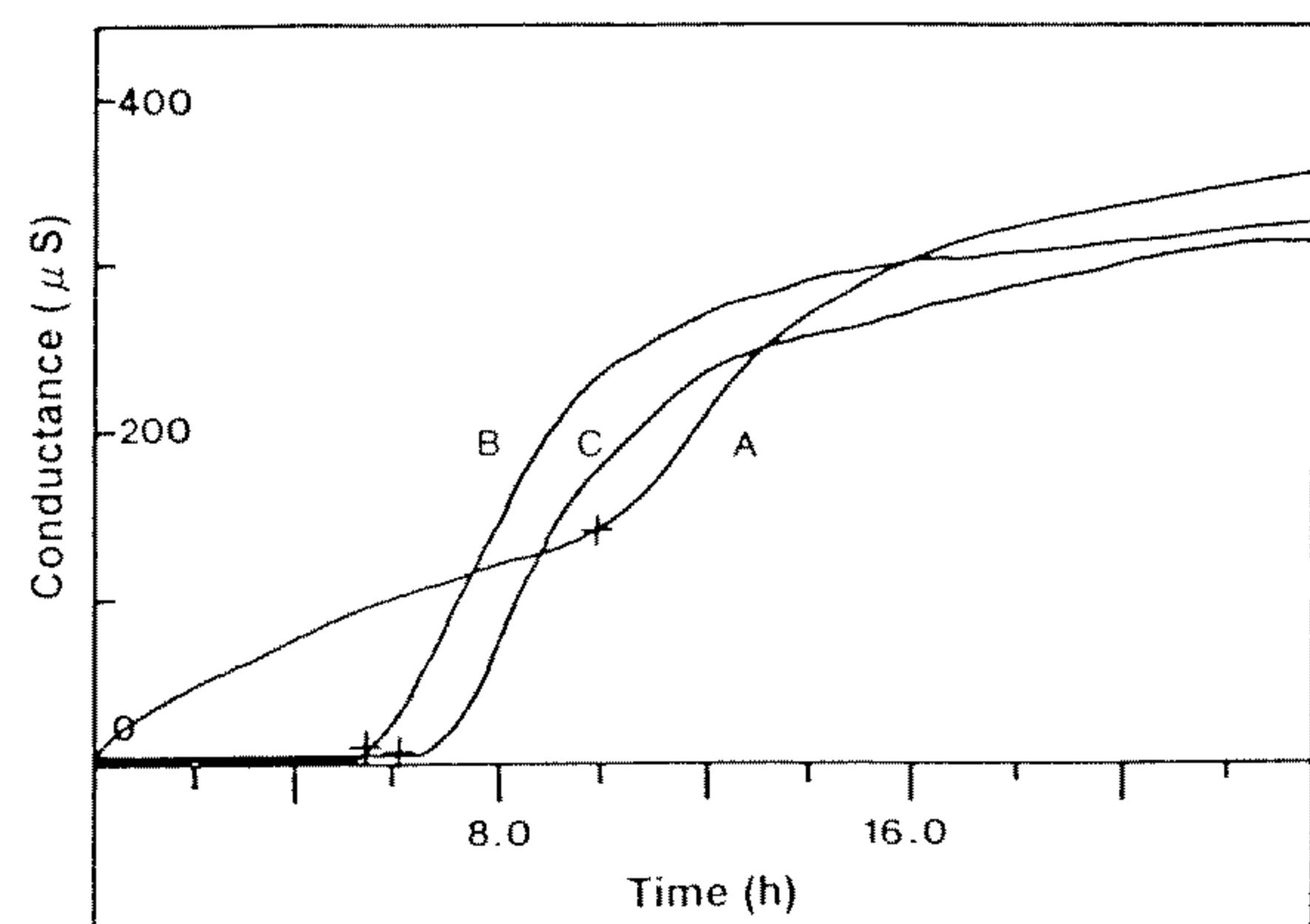


Figure 2. The drift of the conductance curves using Coliform broth supplemented with brilliant green (6.7 mg/l) (curve A) or with brilliant green (6.7 mg/l) and 0.1% agar (curve B) or with monensin (50 mg/l) (curve C) for the determination of coliforms in swordfish fillet.

不便,採用monensin為抑菌劑較適宜。此外,與Gibson等人⁽²²⁾所採用的Modified Reasoner's medium及MacConkey medium檢測大腸桿菌群做比較,本實驗所用的Coliform broth可得到較短之檢測時間,故可以在較短時間內完成分析,且重複間之差異較小。利用電導法估測微生物的含量時,培養基的選擇很重要,因為導電度的改變反應了細菌與營養成分交互作用之結果,好的培養基應具有平穩的底線(baseline)、本身具有較高的電阻(即較低的導電度)、導電度之改變速率快(即斜率大)和較大的高峰值(peak value)。與前人之研究^(14,22)比較,本研究中所用的Coliform broth添加monensin確實具有較佳之效果。Petzel及Hartman⁽²⁴⁾將monensin(終濃度為10 mg/l)加入培養基中,發現可完全抑制*Bacillus subtilis*等七種不同之革蘭氏陽性菌的生長,而將monensin之終濃度提高至35或50 mg/l對十二種不同之革蘭氏陰性菌卻沒有顯著的影響。

應用導電度之改變,測得71個旗魚生魚片樣品大腸桿菌群之檢測時間;另外,每一樣品依照傳統MPN方法測定大腸桿菌群數目,將所得之菌數對數值與檢測時間進行迴歸,可得一次線性迴歸曲線圖(圖三)。由圖可得知傳統檢測法與電導法兩者所得結果間相關性良好,其相關係數為-0.92,其檢測時間(DT)與大腸桿菌群數目對數值之一次方程式為 $DT = 10.081 - 1.789 \log MPN/g$ 。

三、阻抗或電導檢量線之應用

當樣品中菌數太少時,電導變化之基線(baseline)長而且斜率(slope)小;反之,菌數太多時,電導變化之基線很短,且易有漂浮(drift)的現象,二者均會影響檢測時間判讀之正確性⁽⁸⁾。此時可以人工判讀檢測時間的正確與否並加以修正,以增加結果準確度。

生魚片未經加熱處理即食用,為部分國人喜歡的食品,但其處理過程中易遭受二次污染⁽¹⁾,因此其微生物含量相當重要。以八十一年度衛生署公告之生食用食品類衛生標準,生食用魚介類每公克中生菌數不得超過10萬。在此菌數時,以電導法檢測僅需3.8小時,較傳統方法(二天)可以縮短大量檢測時間。且以電導法所得檢測時間之長短與樣品中微生物含量呈反比關係,也就是說菌數愈高檢測時間愈短,反之則愈長。在此情況下,更容易在短時間內排除微生物含量過高之生魚片樣品。

傳統檢測方法,不論樣品中原來菌數多寡,所需培養時間一定(測定生菌數需2天;大腸桿菌群測

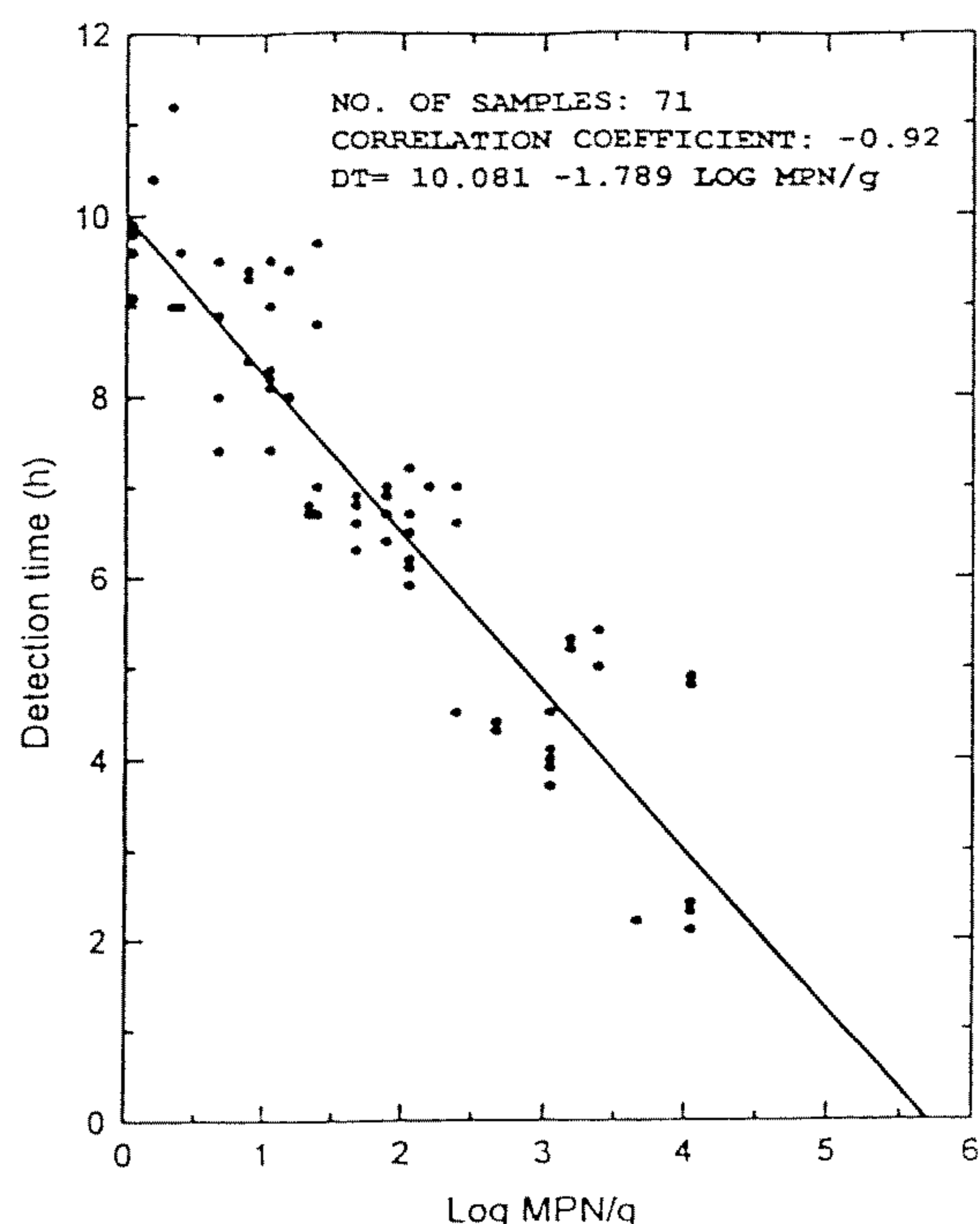


Figure 3. Linear correlation of conductance detection time and logarithm of coliforms in swordfish fillet.

定則需4天)。而電化學法對樣品中菌數高者,所需檢測時間僅需數小時(一般在12小時以內),且具有自動化的優點,又能同時分析多量樣品。因此,電導測定法可以作為旗魚生魚片中生菌數及大腸桿菌群快速檢測之用。

誌 謝

本研究承經濟部(82-EC-2-A-15-0072)之資助,得以完成,特此誌謝。

參考文獻

1. 蔡土及. 1979. 水產細菌學. 農復會特刊. pp.9-10. 臺北.
2. 張長泉. 1992. 總菌數之快速檢測. 食品工業. 24 (11):34-42.
3. Gilchrist, J.E., Donnelly, C.B., Peeler, J.T. and Campbell, J.E. 1977. Collaborative Study Comparing the Spiral Plate and Aerobic Plate Count Methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60:807-812.

4. Marshall, R.T. (ed) 1993. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. pp. 232-237. 16th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
5. Sharpe, A.N., Woodrow, M.N. and Jackson, A.K. 1970. Adenosine-triphosphate (ATP) Levels in Foods Contaminated by Bacteria. J. Appl. Bacteriol. 33:758-767.
6. Webster, J.A.J., Hall, M.S., Rich, C.N., Gilliland, S.E., Ford, S.R. and Leach, F.R. 1988. Improved Sensitivity of the Bioluminescent Determination of Numbers of Bacteria in Milk Samples. J. Food Prot. 51:949-954.
7. Scholefield, J., Manson, R., Johnson, R.J., Scott, R. and Spinell, M. 1981. Bacteriuria Screening by Use of Automated Direct Fluorescence Microscopy. In "Rapid Methods and Automation in Microbiology". pp. 179-183. Tilton, R. C. (ed). American Society for Microbiology. Washington, D.C.
8. Firstenberg-Eden, R. and Eden, G. 1984. Impedance Microbiology. pp. 7-90. John Wiley and Sons Inc., New York.
9. 丁懷謙, 陳輝正, 張長泉. 1993. 以阻抗法檢測豬肉漢堡及其原料中之大腸桿菌群. 食品科學. 20 :348-355.
10. Chen, H.C., Ding, H.C. and Chang, T.C. 1993. Impedance Based Method for the Rapid Enumeration of Total Aerobic Bacterial Load of Pork Hamburger and its Raw Materials. J. Chinese Agri. Chem. Soc. 31:351-356.
11. Visser, I.J.R. and de Groote, J.M.F.H. 1984. The Malthus Microbiological Growth Analyser as an Aid in the Detection of Post-pasteurization Contamination of Pasteurized Milk. Neth. Milk Dairy J. 38:151-156.
12. Gibson, D.M. 1985. Predicting the Shelf-life of Packaged Fish from Conductance Measurements. J. Appl. Bacteriol. 58:465-470.
13. Mackey, B.M. and Derrick, C.M. 1984. Conductance Measurements of the Lag Phase of Injured *Salmonella typhimurium*. J. Appl. Bacteriol. 57:299-308.
14. Ogden, I.D. 1986. Use of Conductance Methods to Predict Bacterial Counts in Fish. J.

- Appl. Bacteriol. 61:263-268.
15. Cousins, D.L. and Marlatt, F. 1990. An Evaluation of a Conductance Method for the Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Milk. J. Food Prot. 53:568-570.
 16. Adams, M.R., Bryan, J.J. and Thurston, P.J. 1989. A Medium Designed for Monitoring Pitching Yeast Contamination in Beer Using a Conductimetric Technique. Lett. Appl. Microbiol. 8:55-58.
 17. Evans, H.A.V. 1985. A Note on the Use of Conductimetry in Brewery Microbiological Control. Food Microbiol. 2:19-22.
 18. Easter, M.C. and Gibson, D.M. 1985. Rapid and Automated Detection of *Salmonella* by Electrical Measurements. J. Hyg. Camb. 94: 245-262.
 19. Smith, P.J., Boardman, A. and Shutt, P.C. 1989. Detection of Salmonellas in Animal Feeds by Electrical Conductance. J. Appl. Bacteriol. 67:575-588.
 20. Bolton, F.J. and Montagu-Pollock, H. 1992. An Automated Method for Screening Environmental Samples for the Presence of *Listeria* spp. Presented at the 1st International Food Technology Exposition and Conference , Hague, Netherlands.
 21. Jorgensen, B.R. and Huss, H.H. 1989. Growth and Activity of *Shewanella putrefaciens* Isolated from Spoiling Fish. Int. J. Food Microbiol. 9:51-62.
 22. Gibson, D.M., Ogden, I.D. and Hobbs, G. 1984. Estimation of the Bacteriological Quality of Fish by Automated Conductance Measurements. Int. J. Food Microbiol. 1:127-134.
 23. Jorgensen, B.R., Gibson, D.M. and Huss, H. H. 1988. Microbiological Quality and Shelf Life Prediction of Chilled Fish. Int. J. Food Microbiol. 6:295-307.
 24. Petzel, J.P. and Hartman, P.A. 1985. Mone-nsin-based Medium for Determination of Total Gram-negative Bacteria and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 925-933.

Determination of Aerobic Plate Count and Coliforms in Raw Swordfish Fillet by Conductimetric Method

JIN-HWA DAI AND TSUNG-CHAIN CHANG

*Food Industry Research and Development Institute,
Hsinchu, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

The feasibility of using a conductimetric method for determination of aerobic plate count and coliforms of swordfish fillet was investigated. Based on the change of conductance in the incubation cells, the relationship between the detection times and total plate count or coliforms was established by the Malthus 2000 (Malthus Instruments Limited, Crawley, England) system. The linear correlation coefficient between the log value of aerobic plate count of swordfish fillet and the detection time was -0.87, while the li-

near correlation coefficient between the log value of most probable number (MPN) of coliforms in the fish and the detection time was -0.92. Conductance measurement has the advantages of rapidity, automation and high capacity for analysis. Therefore, the technique can be used as an alternative method to conventional plate counting and the most probable number method for determination of aerobic plate count and coliforms, respectively, in swordfish fillet.

Key words : Conductimetric method, Swordfish fillet, Aerobic plate count, Coliforms.