

食品微生物之檢驗方法—黴菌及酵母菌數之檢驗

Methods of Test for Food Microbiology-Test of Mold and Yeast Count

1 適用範圍：本方法適用於食品中黴菌及酵母菌活菌數之檢驗。

2 檢驗方法：

2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度約 100 呎燭光；密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣，每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。

2.2 器具及材料：

2.2.1 乾熱滅菌器。

2.2.2 高壓滅菌釜。

2.2.3 攪拌均質器 (Blender) 或鐵胃 (Stomacher)：適用於無菌操作。

2.2.4 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.5 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.6 培養箱。

2.2.7 天平：可稱量到 2,000 g 以上，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g，靈敏度為 1 mg。

2.2.8 pH 測定儀。

2.2.9 菌落計數器：適用於菌落之計算。

2.2.10 旋渦混合器 (Vortex mixer)。

2.2.11 吸管輔助器 (Pipette aid) 或微量分注器。

2.2.12 試管：16x150 mm 試管或其他合適之附蓋試管。

2.2.13 吸管或吸管尖：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 之刻度。

2.2.14 培養皿：已滅菌，內徑約 90 或 100 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。

2.2.15 稀釋用容器：有 450 mL、99 mL、90 mL 標記附蓋（栓）之廣口瓶或無菌袋。

2.2.16 接種針及接種環（直徑約 3 mm）：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線，或無菌可拋棄式接種針（環）。

2.2.17 藥勺、剪刀、小刀、曲玻棒及鑷子：可滅菌。

2.2.18 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 之醋酸纖維濾膜。

2.2.19 試藥：乙醇 (ethanol)、氯化鈉 (NaCl)、磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)、硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、二氯喃 (dichloran)、孟加拉玫瑰紅 (rose bengal)、甘油 (glycerol) 等均採用試藥級。氯四環黴素 (chlorotetracycline)、氯黴素 (chloramphenicol) 用檢定合格並標示力價者。洋菜 (agar)、蛋白胨 (peptone)、葡

葡萄糖 (glucose)、D-葡萄糖 (dextrose)、粉狀麥芽萃取物 (malt extract, powdered) 採用微生物級。

2.2.20 稀釋液：

取蛋白胨 1 g 溶於蒸餾水 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.21 培養基：

2.2.21.1 二氯喃玫瑰紅氯黴素培養基 (Dichloran rose bengal chloramphenicol agar, DRBC)

葡萄糖 (glucose)	10 g
蛋白胨 (peptone)	5 g
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	1 g
硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
5% (w/v) 孟加拉玫瑰紅溶液 (rose bengal)	0.5 mL
0.2% (w/v) 二氯喃乙醇溶液 (0.2% dichloran in ethanol)	1 mL
洋菜 (agar)	15 g

將上述成分溶於蒸餾水 990 mL 加熱溶解後，另稱取氯黴素 0.1 g 溶於蒸餾水 10 mL (註)，合併混勻，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 5.6 ± 0.2 ，待冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ，取培養基 20~25 mL 注入培養皿中。本培養基組成份孟加拉玫瑰紅具光敏感性，製妥後應置於冷暗處備用。

註：抗生素溶液 (Antibiotic solutions) 之配製與使用

A. 氯黴素溶液：取氯黴素 0.1 g 溶於蒸餾水 10 mL 備用。

B. 氯四環黴素溶液：取氯四環黴素 0.5 g 溶於蒸餾水 100 mL，以 $0.45 \mu\text{m}$ 無菌濾膜過濾除菌後，置於能阻光之無菌容器內，冷藏備用。有效期間為一個月，使用時需回復至室溫並以無菌操作取用。

為抑制細菌生長，使用時，添加氯黴素溶液 10 mL 至培養基 990 mL 後，再滅菌，氯黴素的最終濃度為 100 mg/L。

為更有效抑制檢體中細菌的生長，可添加氯黴素溶液 5 mL 至培養基 985 mL 混合並滅菌，待培養基冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 時，加入經無菌濾膜除菌之氯四環黴素溶液 10 mL，抗生素的最終濃度為 100 mg/L。

2.2.21.2 二氯喃甘油培養基 (Dichloran 18% glycerol agar, DG18)

葡萄糖 (glucose)	10 g
蛋白胨 (peptone)	5 g
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	1 g
硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
0.2% (w/v) 二氯喃乙醇溶液 (0.2% dichloran in ethanol)	1 mL

洋菜 (agar) 15 g

將上述成分溶於蒸餾水 800 mL，加熱溶解後，再補充蒸餾水使最後體積為 990 mL，取氯黴素 0.1 g 溶於蒸餾水 10 mL（見 2.2.21.1 註），連同甘油 220 g 合併混勻，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 5.6 ± 0.2 ，水活性為 0.95。當用於塗抹平板培養法時，則滅菌後待冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ，取培養基 20~25 mL 注入培養皿中，備用。用於傾注平板法時，則滅菌後，待冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ，備用。

2.2.21.3 馬鈴薯葡萄糖培養基 (Potato dextrose agar, PDA)

馬鈴薯浸出液 (potato infusion) 200 g

D-葡萄糖 (dextrose) 20 g

洋菜 (agar) 20 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 5.6 ± 0.2 ，待冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ，取培養基 20~25 mL 注入培養皿中，備用。另於加熱溶解後，分取 5~6 mL 至含螺旋蓋之試管，滅菌後作成斜面。此培養基適用於菌株之保存，且應於使用前配製。

馬鈴薯浸出液：取洗淨後不去皮馬鈴薯之切片約 200 g，置蒸餾水 1000 mL 中，煮沸 30 分鐘後以紗布過濾。

2.2.21.4 麥芽培養基 (Malt agar, MA)

粉狀麥芽萃取物 (malt extract, powdered) 20 g

洋菜 (agar) 20 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，待冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ，取培養基 20~25 mL 注入培養皿中，備用。另於加熱溶解後，分取 5~6 mL 至含螺旋蓋之試管，滅菌後作成斜面。

2.3 檢液之調製：

2.3.1 檢體之處理^(註)：

2.3.1.1 固態檢體：以無菌操作方式將檢體切碎，混合均勻後，取 50 g 置入無菌袋，加入稀釋液 450 mL，以鐵胃搓揉 2 分鐘，作成 10 倍稀釋檢液。或加入稀釋液 450 mL，以經滅菌之攪拌均質器攪拌 30~60 秒。

2.3.1.2 液態檢體：可用振搖的方式，充分混合均勻後，即為原液，取 50 mL 置入稀釋液 450 mL 中，作成 10 倍稀釋檢液。

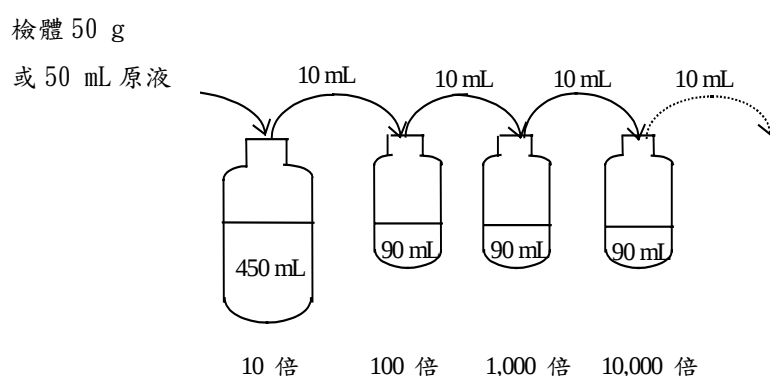
2.3.1.3 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等，以無菌操作方式將檢體適當混合後，取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1 節之操作。

2.3.1.4 冷凍檢體：需解凍者，如冷凍魚（畜）肉、蔬果、水餃等，宜置冷藏溫度下解凍（置於 2~5℃，18 小時以內）。俟檢體解凍後，再以無菌操作方式予以適當切碎並混合均勻。取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1 節之操作。不需解凍者，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等製品，應儘速以無菌操作方式將檢體分割成適當小塊。取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1 節之操作。

註：1.檢體總量不足 50 g (mL) 時，依可採得之檢體量在 25~50 g (mL) 的範圍內，添加適量之稀釋液作成 10 倍稀釋檢液。

2.處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量之已滅菌乳化劑（如 1% Tween 80），充分振搖，使之乳化。

2.3.2 檢液之調製：分別使用無菌吸管，自 10 倍稀釋檢液依序作成一系列適當之 100、1,000、10,000 倍等稀釋檢液，稀釋倍數視需要而定。其稀釋方法如下圖所示。



2.4 培養：

2.4.1 塗抹平板法（Spread-plate method）：

將各稀釋倍數之檢液及原液充分振搖均勻後，以無菌操作方式分取 0.1 mL 注入一個已製備好之培養基平板上迅速以無菌之曲玻棒塗將接源塗抹散佈，每一稀釋檢液需重複接種三皿。塗抹平板法可採用 DRBC 培養基或 DG18 培養基，DRBC 培養基因含二氯喃、孟加拉玫瑰紅，能有效減緩生長快速黴菌之生長，而有利其他酵母菌及黴菌之檢出，適用於塗佈型（spreader）黴菌（如毛黴及根黴）之檢驗，故需同時計數酵母菌及黴菌時，應使用 DRBC 培養基。當檢體水活性小於 0.95 時，DG18 培養基更為適用。

2.4.2 傾注平板法（Pour-plate method）：

將各稀釋倍數之檢液及原液充分振搖均勻後，以無菌操作分取 1 mL 注入一個培養皿，每一稀釋檢液重複做三皿，於每個培養皿注入已冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 之 DG18 培養基 20~25 mL，溫和地以順時針方向，續以反時針方向水平旋轉，在不沾染培養皿蓋之情況下，混合稀釋檢液與培

養基，從注入稀釋檢液至培養皿到加入培養基應於 1~2 分鐘內完成，時間拉長將導致檢液中成分附著於培養皿底部，而無法使檢液與培養基混合均勻。

2.4.3 採用塗抹平板法或傾注平板法時，自檢液調製至完成塗抹及傾注步驟，應於 20 分鐘內完成。待培養基稍乾（塗抹平板）或凝固（傾注平板）後，置於 25℃ 暗處培養 5 天，無菌落出現者需繼續培養 48 小時，培養時勿倒置培養皿及重疊超過 3 個以上，培養期間不可移動以防孢子散落。

2.4.4 為品管計，應鑑定稀釋液及培養基是否污染，取兩個培養皿，以稀釋液作檢液，採取上述相同之步驟製作一皿，另一皿不加檢液僅以培養基作為空白試驗，並依 2.4.3 節相同條件培養，結果應不得檢出黴菌與酵母菌。

2.4.5 為鑑別菌種，可將分離出菌株培養在 PDA 及 MA 培養基上。

2.5 計數：

2.5.1 選取含 10~150 個菌落之培養皿來計數。生長菌落以酵母菌者為主，一個培養皿生長約 150 個菌落尚屬可計數範圍；生長菌落以黴菌為主者，則視種類而定，可計數範圍將較低；檢體含菌量低，其菌落數在 10 個以下時，仍要計數。

2.5.2 當各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數檢液之培養皿菌落數為 10~150 個，則以該稀釋倍數之三個培養皿之菌落數平均值乘其稀釋倍數，即得其菌落數，當兩種稀釋倍數檢液之培養皿菌落數均為 10~150 個時，則依下列公式計算之。

$$\begin{aligned} & \text{菌數 (CFU/g 或 CFU/mL)} \\ &= \frac{[(Aa + Ab + Ac) \times A + (Ba + Bb + Bc) \times B]}{3} \div 2 \end{aligned}$$

A、B：稀釋倍數。

Aa、Ab、Ac：A 稀釋倍數各培養皿內之菌落數。

Ba、Bb、Bc：B 稀釋倍數各培養皿內之菌落數。

2.5.3 菌數之表示：黴菌及酵母菌數之單位為 CFU/g 或 CFU/mL，菌落數則取二位有效數字，應將菌落數平均值第三位數字四捨六入（如 456 以 460 計），菌落數平均值第三位數字為 5，而第二位數字為偶數，則捨去 5（如 145 以 140 計），第二位數字為奇數，則進位（如 155 以 160 計）。各稀釋倍數均無菌落生長者，則菌數應為小於 1 乘以最低稀釋倍數，並註明該菌數為估計值。