

食品中微生物之檢驗方法- 腸桿菌科(Enterobacteriaceae)之檢驗

食品藥物管理署研究檢驗組二科
葉民煉
107.09.19

藥求安全，食在安心



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

1

大綱

- 食品中腸桿菌科之衛生標準(草案)
- 腸桿菌科之簡介
 - 腸桿菌科之特性及菌屬
- 食品中腸桿菌科之檢驗方法
 - 稀釋液、培養基及試劑之配製
 - 腸桿菌科之檢驗流程說明

2



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

預定訂定「食品中微生物衛生標準」草案(107.06.11)

衛授食字第1071300279號

衛生福利部 公告

發文日期：中華民國107年6月11日
發文字號：衛授食字第1071300279號
附件：「食品中微生物衛生標準」草案總說明及逐條說明(共4頁) (14)



主旨：預告訂定「食品中微生物衛生標準」草案。
依據：行政程序法第一百五十四條第一項。
公告事項：
一、訂定機關：衛生福利部。
二、訂定依據：食品安全衛生管理法第十七條。
三、「食品中微生物衛生標準」草案總說明及逐條說明如附件。本業另載於行政院公報資訊網、本部網站「衛生福利法規檢索系統」下「法規草案」網頁、本部食品藥物管理署網站「公告資訊」下「本署公告」網頁及國家發展委員會「公共政策網路參與平臺-眾開講」網頁(<https://join.gov.tw/policies/>)。
四、對於公告內容有任何意見或修正建議者，可於本公告刊登公報之隔日起60日內，至前揭「衛生福利法規檢索系統」或「公共政策網路參與平臺-眾開講」網頁陳述意見或洽詢；
(一)承辦單位：衛生福利部食品藥物管理署



衛生福利部食品藥物管理署新聞稿

日期	107.6.11	單位	食品組	編號	
標題	預告訂定「食品中微生物衛生標準」草案				

衛生福利部(下稱衛福部)為整合有關食品微生物之相關標準，經參考國際管理趨勢、風險評估及國內需求，重新評估並提出「食品中微生物衛生標準」之草案，將自即日起展開60天之評論期，蒐集各界意見。

本草案研訂重點，除整合各項食品衛生標準中有關微生物之管理規範外，亦針對食品分類進行調整，以使管理之範疇更為明確。本次修正新增部分指標性病原菌(如：沙門氏菌)、擴大腸門菌之監測對象為腸桿菌科(Enterobacteriaceae)，取代部分傳統之衛生指標菌(如：大腸桿菌群)，以使相關例行性衛生監測結果更具風險代表性；另外，並參考國際管理趨勢，改以微生物採樣計畫(sampling plan)要求，提高採樣數，以使相關監測結果更具統計代表性。

針對微生物採樣計畫之要求，係繼民國103年研修「嬰兒食品類衛生及殘留農藥安全容許量標準」後再次提出，考量與過去相關抽樣監測之模式有大幅度之調整，且針對特殊個案之採樣方式宜有更為完善之配套措施，故本次同時提出「食品中微生物採樣計畫及原則指引」之草案，以提供實務採樣執行層面之參考。

考量該標準將大幅調整採樣方式、採樣數量及管理模式，相關實驗室、資訊系統之架接及有關抽驗辦法均需配套調整，爰本標準預定將延長後銜期。

3

食品中腸桿菌科之衛生標準(草案)107.06.11

食品品項	採樣計畫		限量	
	n	c	m	M
乳及乳製品類之鮮乳、調味乳、乳飲品、乳粉、調製乳粉、乳清粉(供食品加工原料)、發酵乳、煉乳(1.1~1.4)	5	0	10 CFU/mL(g)	
嬰兒食品類之嬰兒配方食品、較大嬰兒配方輔助食品、特殊醫療用途嬰兒配方食品(2.1,2.2,2.3)	10	0	10 CFU/g(mL)	
飲料類	4.2 含碳酸之飲料(如：汽水、可樂及其他添加碳酸之含糖飲料)	5	0	陰性
	4.3 還原果蔬汁、果蔬汁飲料、果漿(蜜)及其他類似製品(4.7品項及罐頭飲料除外)	5	0	陰性
	4.4 食品原料(咖啡、可可、茶或以穀物、豆類等)萃取而得之飲料(4.7品項及罐頭飲料除外)	5	0	陰性
	4.6 發酵果蔬汁(飲料)、添加乳酸調味之酸性飲料、添加發酵液(含活性益生菌)之飲料(4.7品項除外)	5	0	陰性
	4.7 即時調製、未經殺菌處理，且架售期少於24小時之飲料(4.5品項除外)	5	2	10 CFU/mL 100 CFU/mL
冷凍食品及冰類之食用冰塊、冷凍即食食品(冰品、冷凍水果)、冷凍熟製品(不包括水產品)(5.2,5.3)	5	0	10 CFU/g(mL)	

◎4.5食品品項：未經商業殺菌之鮮榨果蔬汁、添加少於50%乳品且未經商業殺菌之含乳鮮榨果蔬汁

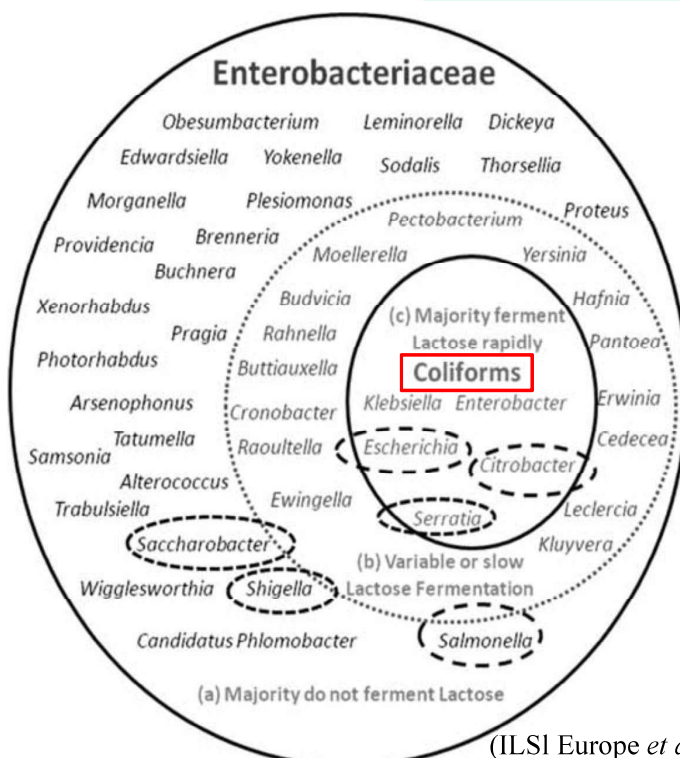
4

腸桿菌科(Enterobacteriaceae)之特性

- Gram negative, non-sporing straight rods(typically 1~5µm in length)
- Facultatively anaerobic and grow well at 37°C(some species grow better at 25~30°C)
- Lack of cytochrome C oxidase(differentiate them from other closely related bacteria)
- Acid is produced during the fermentation of D-glucose and other carbohydrates
- Catalase positive
- The ability to reduce nitrate to nitrite
- Motile by means of peritrichous flagella except *Tatumella*, *Shigella* and *Klebsiella* species which are non-motile
- Grow well on peptone and meat extract media
- Some strains grow on D-glucose as the sole source of carbon and energy, but other strains require vitamins and or amino acids

(ILSI Europe, 2011; Public Health England, 2015)

腸桿菌科(Enterobacteriaceae)之特性



(ILSI Europe *et al.*, 2011)

- **Enterobacteria** are responsible for a variety of human illnesses, including urinary tract infections and gastroenteritis by fecal-oral transmission.

(Baylis *et al.*, 2011)

- The presence of **Enterobacteriaceae** generally indicates problems with food processing hygiene, such as inadequate heat treatments or post-processing contamination from raw materials or the environment.

(Owen *et al.*, 2010)

腸桿菌科(Enterobacteriaceae)之特性

- 存在於人類和動物的腸道、土壤、水中，易造成食物腐敗，如：水果、蔬菜、肉、禽肉、雞蛋、牛奶及乳製品、魚類及其他水產品等。
- 大部分不引起疾病，但在宿主抵抗力低、菌群大量孳生或菌群失調情況下，細菌會伺機侵犯，引起腹瀉、尿道感染，甚至敗血症。

(ILSI Europe, 2011; Public Health England, 2015)

腸桿菌科(Enterobacteriaceae)之菌屬

- 53 genera (and over 170 named species)
- 26 genera are known to be associated with infections in humans
- Nomenclature: biochemical and antigenic characteristics
new technologies such as DNA hybridisation

菌 屬 種 類					
<i>Arsenophonus</i>	<i>Cosenzaea</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Morganella</i>	<i>Providencia</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Biostraticola</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Dickeya</i>	<i>Khuyvera</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Raoultella</i>	<i>Thorsellia</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Leclercia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Saccharobacter</i>	<i>Trabulsiella</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Leminorella</i>	<i>Phaseolibacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Wigglesworthia</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Levinea</i>	<i>Photorhabdus</i>	<i>Samsonia</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Calymmatobacterium</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Lonsdallea</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Mangrovibacter</i>	<i>Pragia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Yokenella</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Gibbsiella</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Shimwellia</i>	

(Public Health England, 2015)

食品中腸桿菌科之檢驗方法

107.8.1 衛福部預告訂定(衛授食字第1071901433號)

衛生福利部 公告

發文日期：中華民國107年8月1日
發文字號：衛授食字第1071901433號
附件：檢驗方法草案1份

主旨：預告訂定「食品微生物之檢驗方法—腸桿菌科之檢驗」草案。

依據：行政程序法第一百五十四條第一項。

公告事項：

- 一、訂定機關：衛生福利部。
- 二、訂定依據：食品安全衛生管理法第三十八條。
- 三、「食品微生物之檢驗方法—腸桿菌科之檢驗」草案內容如附件。本案另載於行政院公報資訊網、本部網站「衛生福利法規檢索系統」下「法規草案」網頁、本部食品藥物管理署網站「公告資訊」下「本署公告」網頁及國家發展委員會「公共政策網路參與平臺—眾開講」網頁(https://join.gov.tw/policies/)。
- 四、對於公告內容有任何意見或修正建議者，可於本公告刊登公報之隔日起六十日內，至前揭「衛生福利法規檢索系統」或「公共政策網路參與平臺—眾開講」網頁陳述意見或洽詢。

衛生福利部食品藥物管理署
FDA Food and Drug Administration

公告資訊 機關介紹 業務專區 法規資訊 便民服務 出版品 政府資訊公開 個人化服務

請輸入關鍵字 站內 站外 搜尋 進階搜尋
熱門關鍵字：食品添加物 營養標示 非登不可 基因改造

公告資訊

本署公告

本署新聞

本署徵才

維護公告

活動訊息

預告法規沿革區

食藥關切專區

食藥風險廣告區

請選擇年份：全部 區域檢索：食品微生物之檢驗方法-類 搜尋

序號	標題	發布日期
1	預告訂定「食品微生物之檢驗方法—腸桿菌科之檢驗」草案。	2018-08-01

共1筆資料，第1/1頁 到第 頁 GO

http://www.fda.gov.tw/TC/news.aspx?cid=3&key=%e9%a3%9f%e5%93%81%e5%be%ae%e7%94%9f%e7%89%a9%e4%b9%8b%e6%aa%a2%e9%a9%97%e6%96%b9%e6%b3%95%ef%bc%8d%e8%85%b8%e6%a1%bf%e8%8f%8c

9

食品中腸桿菌科之檢驗方法

參考文獻(ISO 21528-2)

INTERNATIONAL STANDARD

ISO 21528-2

2004.08年版

First edition
2004.08.15

生化試驗之葡萄糖發酵試驗(Glucose fermentation test)
1.培養基：Glucose agar→Glucose OF medium
2.葡萄糖氧化發酵培養基(Glucose OF medium)：
接種後再加入礦物油，以覆蓋其表面

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae —
Part 2:
Colony-count method

Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae —
Partie 2: Méthode par comptage des colonies

INTERNATIONAL STANDARD

ISO 21528-2

2017.06年版

Second edition
2017-06

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae —
Part 2:
Colony-count technique

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae —
Partie 2: Technique par comptage des colonies

10

腸桿菌科之稀釋液、培養基及試劑

- 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)
- 膽鹽葡萄糖瓊脂培養基
(Violet red bile glucose agar, VRBGA)
- 營養培養基(Nutrient agar, NA)
- 葡萄糖氧化發酵培養基(Glucose OF medium)
- 氧化酶試驗試劑(Oxidase test reagent)

蛋白胨緩衝液(Buffered Peptone Water, BPW)

組成分	克數	功能
蛋白胨(peptone)	10 g	復甦微生物
氯化鈉(sodium chloride)	5 g	維持滲透壓
磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9 g	緩衝pH
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.5 g	緩衝pH
➤ 溶於蒸餾水，使成為1,000 mL，分裝於容器中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0±0.2。		

1. Dissolve the components in the water, by heating if necessary.
2. Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 7.0 ± 0.2 at 25°C.
3. Dispense the medium into sterile flasks or tubes of suitable capacity to obtain the portions necessary for the test. Sterilize for 15 min in the autoclave set at 121°C.

膽鹽葡萄糖瓊脂培養基(VRBGA)

組成分	克數	功能
動物組織酵素水解物(enzymatic digest of animal tissues)	7 g	提供微生物生長所需之維生素、胺基酸及含氮化合物等
酵母萃取物(yeast extract)	3 g	提供微生物生長所需之維生素
膽鹽(bile salts)	1.5 g	抑制革蘭氏陽性菌
葡萄糖(glucose)	10 g	提供碳源
氯化鈉(sodium chloride)	5 g	維持滲透壓
中性紅(neutral red)	0.03 g	pH指示劑
結晶紫(crystal violet)	0.002 g	抑制革蘭氏陽性菌
洋菜(agar)	15 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	

➤ 加熱溶解後，分裝於三角瓶，**加熱使其沸騰 1 分鐘**，最終pH值為7.4±0.2，並且冷卻至47~50℃待培養使用。
 ➤ 注意事項：**勿高壓滅菌**，並於製備**4小時**之內使用完畢。

營養培養基(Nutrient agar, NA)

Non-selective agar medium

組成分	克數	功能
肉抽出物(meat extract)	3 g	提供微生物生長所需之維生素、胺基酸及含氮化合物等
動物組織酵素水解物 (enzymatic digest of animal tissues)	5 g	提供微生物生長所需之維生素、胺基酸及含氮化合物
氯化鈉(sodium chloride)	5 g	維持滲透壓
洋菜(agar)	15 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	

➤ 加熱溶解後，分裝於三角瓶，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.0±0.2。分裝於培養皿，每一培養皿倒入15~18 mL，做成平板培養基，使用前培養基**表面應保持乾燥**。

葡萄糖氧化發酵培養基(Glucose OF medium)

組成分	克數	功能
酪蛋白酵素水解物 (enzymatic digest of casein)	2 g	提供微生物生長所需之維生素、 胺基酸及含氮化合物等
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	0.3 g	緩衝pH
葡萄糖(glucose)	10 g	提供碳源
氯化鈉(sodium chloride)	5 g	維持滲透壓
溴瑞香草酚藍(bromothymol blue)	0.08 g	pH 指示劑
洋菜(agar)	3.5 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	
➤ 加熱溶解後，分裝10 mL於試管，以121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為6.8±0.2。		

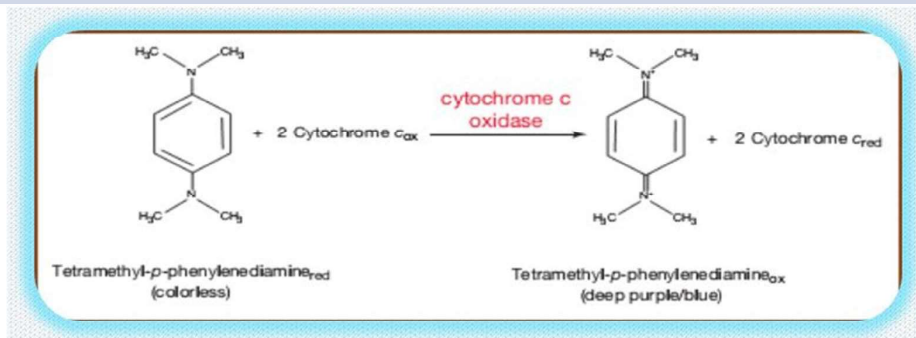
葡萄糖氧化發酵培養基(Glucose OF medium)

Preparation

1. Dissolve the components or the dehydrated complete medium in the water, by heating if necessary.
2. Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 6.8 ± 0.2 at 25 °C.
3. Dispense the culture medium in tubes of appropriate capacity (e.g. 10 ml of culture medium for tubes of 16 mm × 160 mm).
4. Sterilize for 15 min in an autoclave set at 121°C. Leave the tubes in vertical position.
5. Just before use, heat the medium in boiling water or flowing steam for 15 min to remove oxygen, then cool rapidly to the incubation temperature.

氧化酶試驗試劑(Oxidase test reagent)

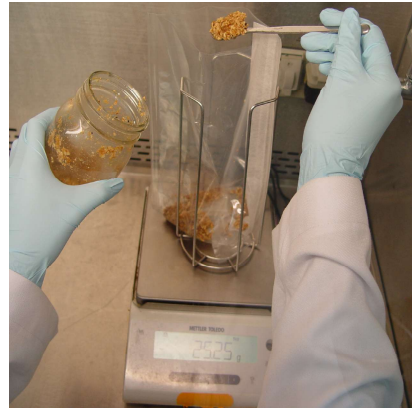
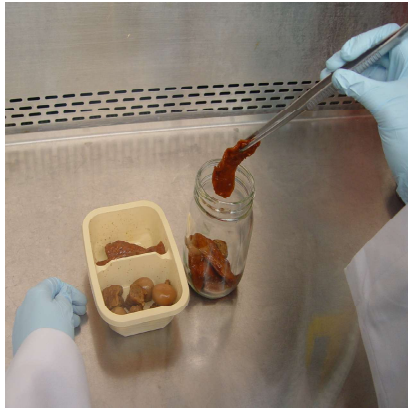
組成分	克數
四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, TMPD)	1 g
蒸餾水	100 mL
➤ 貯存於褐色試藥瓶，置於冰箱中備用，使用期限以不超過一星期為宜(現配最佳)。	



腸桿菌科之檢驗流程-平板計數法



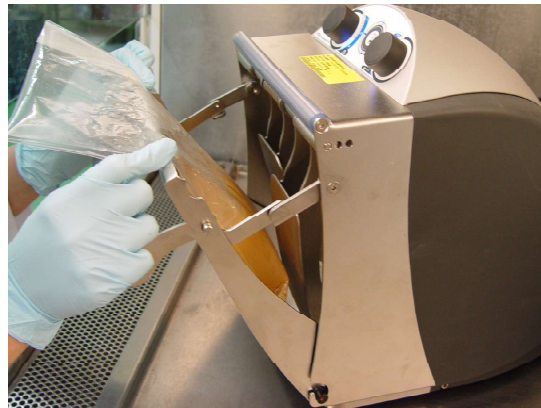
食品檢體均質



樣品置入無菌均質瓶 → 攪拌均質機
均質檢體 → 秤取50g檢體

19

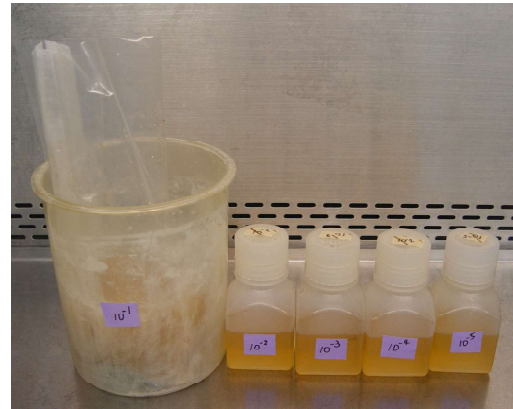
製備稀釋檢液(I)：10倍稀釋檢液



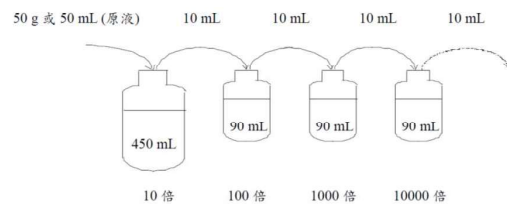
加入BPW緩衝液450 mL → 鐵胃均質機混合均勻
作成10倍稀釋檢液

20

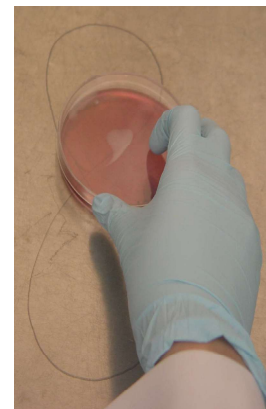
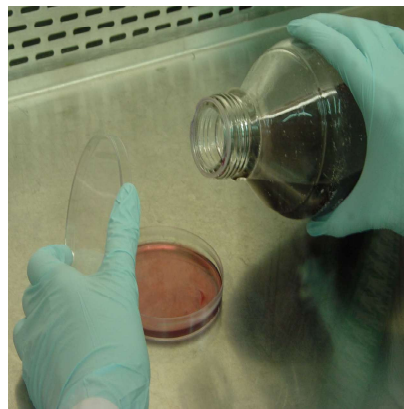
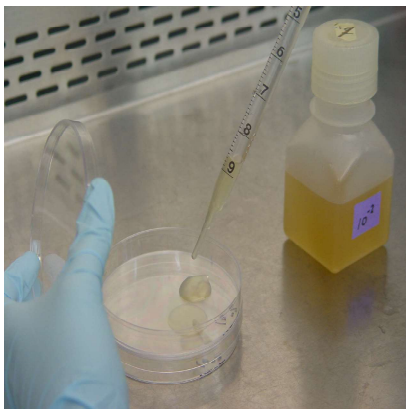
製備稀釋檢液(II)：系列稀釋檢液



製備系列稀釋檢液
(10 mL+90 mL)



分離培養(I)-雙層混稀平板計數法



吸取各稀釋檢液1 mL
分注於9 cm之培養皿

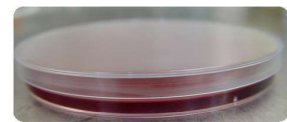


加入15 mL VRBGA(第1層)
，**混合均勻**，待培養基凝固

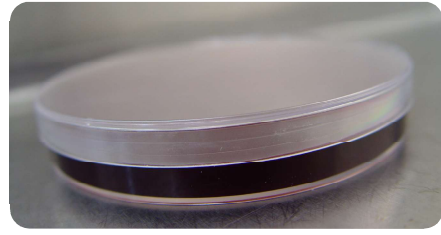
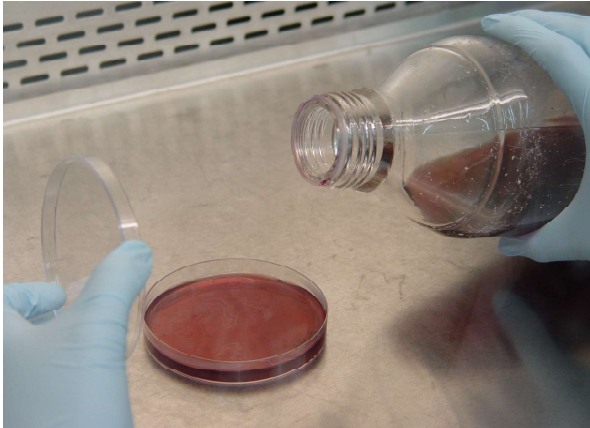
注意事項：

※吸取稀釋檢液至Pour plate之時間，勿超過15分鐘！

※檢液與培養基應**混合均勻**(8字手法)，勿搖溢！



分離培養(Ⅱ)-雙層混稀平板計數法



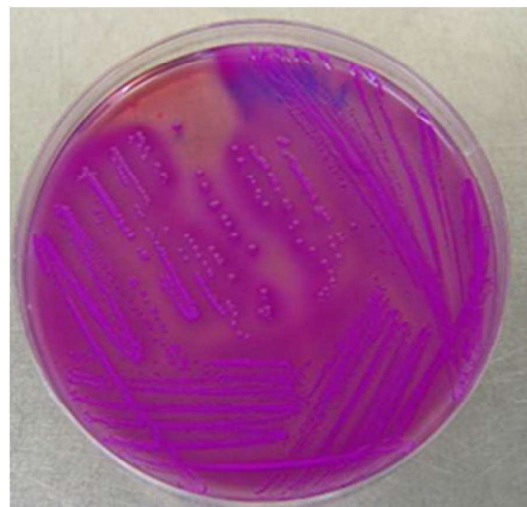
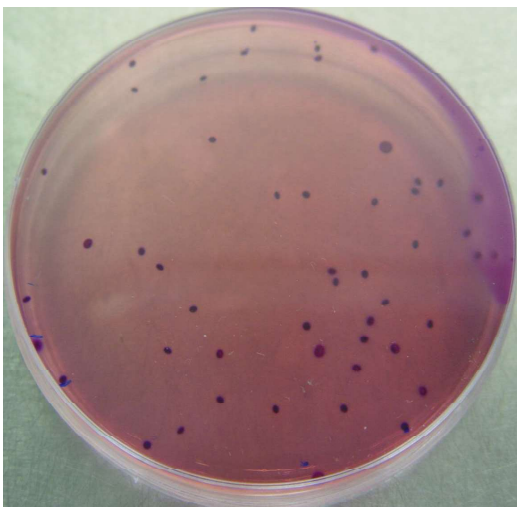
加入5~10 mL VRBGA(第二層)，覆蓋均勻一層，待培養基凝固，倒置於37°C，培養24±2小時

※雙層混稀培養目的：

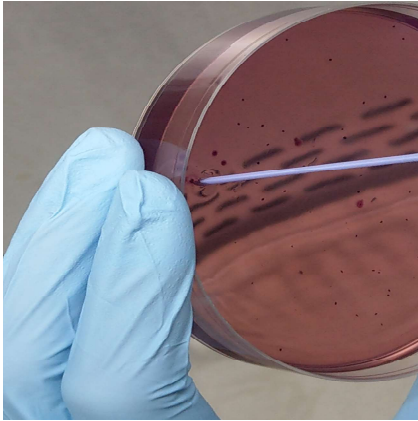
防止**擴散生長**(spreading growth)及**半厭氧狀況**(semi-anaerobic conditions)

VRGB培養基可疑菌株之分離純化

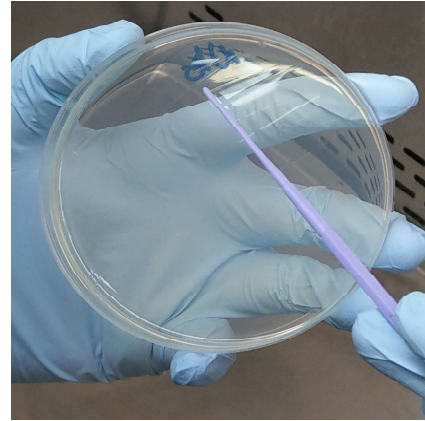
※腸桿菌科菌落形態為**紫紅色**(粉紅色至紅色或紫色)且有或無沉澱環



VRGB培養基可疑菌株之分離純化



選取含**15~150**個可疑菌落之VRBGA，
每片穿刺鉤取至少**5**個可疑菌落



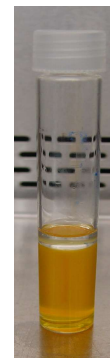
分別劃線於NA平板培養基，
倒置於37°C，培養24±2小時

25

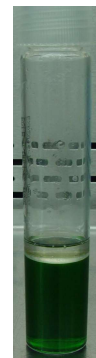
生化試驗-葡萄糖發酵試驗(Glucose fermentation test)

※腸桿菌科之判定-葡萄糖發酵試驗(正反應)

- 鉤取NA平板培養基之單一菌落，**穿刺**於**葡萄糖氧化發酵培養基**，再徐徐加入已滅菌(121°C, 30min)之礦物油至高度1公分，於37°C培養24±2小時。
- 培養基顏色：正反應為**黃色**，否則為負反應(**綠色**)，腸桿菌科應為正反應。



正反應



負反應

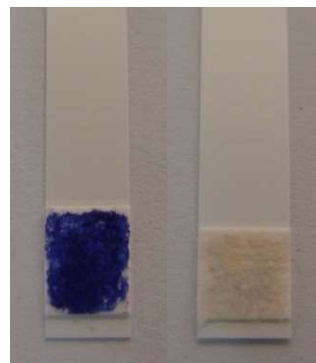
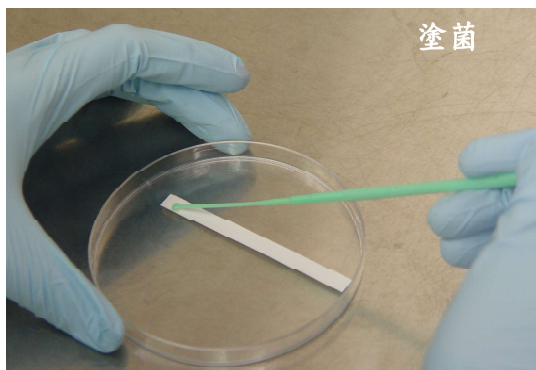
26

生化試驗-氧化酶試驗

※腸桿菌科之判定-氧化酶試驗(負反應)

- 鉤取NA平板培養基之單一菌落，塗抹於氧化酶試紙。
- 試紙顏色：10~15 秒後變為**深藍紫色**者為正反應，否則為負反應(**無色**)，腸桿菌科為**負反應**。

※使用無菌鉗接種環或玻璃棒(勿使用鎳鉻製品，以避免偽陽性)



正反應

負反應

腸桿菌科之判定

- 腸桿菌科菌陽性，應符合下表所列之結果。

試 驗	正 反 應 (+)	負 反 應 (-)	腸桿菌科之反應
葡萄糖發酵試驗	黃色	綠色	+
氧化酶試驗	深藍紫色	無色	-

腸桿菌科之計數(R值)

選取每片含15~150個菌落之同一稀釋倍數之所有平板計數可疑菌落，每片鉤取可疑菌落至少5個進行試驗，判定並計算可疑菌落中含有腸桿菌科之比率(R值)，再以公式計算檢體中腸桿菌科之菌數。

①

稀釋倍數	10		
VRBGA平板編號	#1	#2	總和
N ₁	4	3	7
N ₀	5	5	10
R值	$= \frac{(4+3)}{(5+5)} = \frac{7}{10} = 0.7$		

$$\text{比率(R值)} = \frac{N_1}{N_0}$$

N₁：經試驗後判定為腸桿菌科之菌落數

N₀：進行試驗之可疑菌落數

②

稀釋倍數	10		100		總和
VRBGA平板編號	#1	#2	#1	#2	
N ₀	5	5	5	5	20
N ₁	4	3	3	2	12
R值	$= \frac{(4+3+3+2)}{(5+5+5+5)} = \frac{12}{20} = 0.6$				

腸桿菌科之計數(僅有1種稀釋倍數)

各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數平板之菌落數為15~150時，應計數該稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和並依下列公式計算。

腸桿菌科菌數(CFU/g或CFU/mL)

$$= (\Sigma a) \times \frac{A}{V_A} \times R$$

Σa：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

V_A：A稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

A：稀釋倍數

R：比率

◎計算菌數法則：

1.有效數字為兩位

2.第三位數字四捨六入，偶成雙

(當第三位數字為五時，遇第二位數字為奇數時進位，偶數時捨去)

2.6.2.計數			
A(稀釋倍數)	10		
VRBGA平板編號	#1	#2	總和
Σa(可疑菌落數總和)	140	150	290
V _A (檢液總體積)	1	1	2
每片鉤取可疑菌落	5	5	10
判定為腸桿菌科陽性者	4	3	7
R值(比率)	$= \frac{(4+3)}{(5+5)} = \frac{7}{10} = 0.7$		
腸桿菌科菌數	計算值	$= (140+150) \times \frac{10}{2} \times 0.7$ =1015	
	表示值 (2位有效數字)	1.0×10³(CFU/g或mL)	

腸桿菌科之計數(2種稀釋倍數)

當有兩種稀釋倍數平板之菌落數在15~150之間時，先個別計算各稀釋倍數之腸桿菌科菌數，再取其平均值，依下列公式計算。

腸桿菌科菌數(CFU/g或CFU/mL)

$$= \left[(\Sigma a) \times \frac{A}{V_A} + (\Sigma b) \times \frac{B}{V_B} \right] \times \frac{R}{2}$$

Σa ：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

Σb ：B稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

V_A ：A稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

V_B ：B稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

A、B：稀釋倍數

R：比率

2.6.3.計數						
稀釋檢液倍數	A稀釋倍數(10^1)			B稀釋倍數(10^2)		
稀釋倍數(A、B)	10			100		
VRBGA平板編號	#1	#2	總和	#1	#2	總和
可疑菌落數總和(Σa 或 Σb)	140	150	290	17	17	34
檢液總體積(V_A 或 V_B)	1	1	2	1	1	2
每片鉤取可疑菌落	5	5	10	5	5	10
判定為腸桿菌科陽性者	4	3	7	3	2	5
R值(比率)	$= \frac{(4+3+3+2)}{(5+5+5+5)} = \frac{12}{20} = 0.6$					
腸桿菌科菌數	計算值	$= \left[(140+150) \times \frac{10}{2} + (17+17) \times \frac{100}{2} \right] \times \frac{0.6}{2}$				
	表示值 (2位有效數字)	≈ 945 9.4×10^2 (CFU/g或mL)				

Thanks for Your Attention