

微生物基礎檢驗方法與基準

學名藥協會

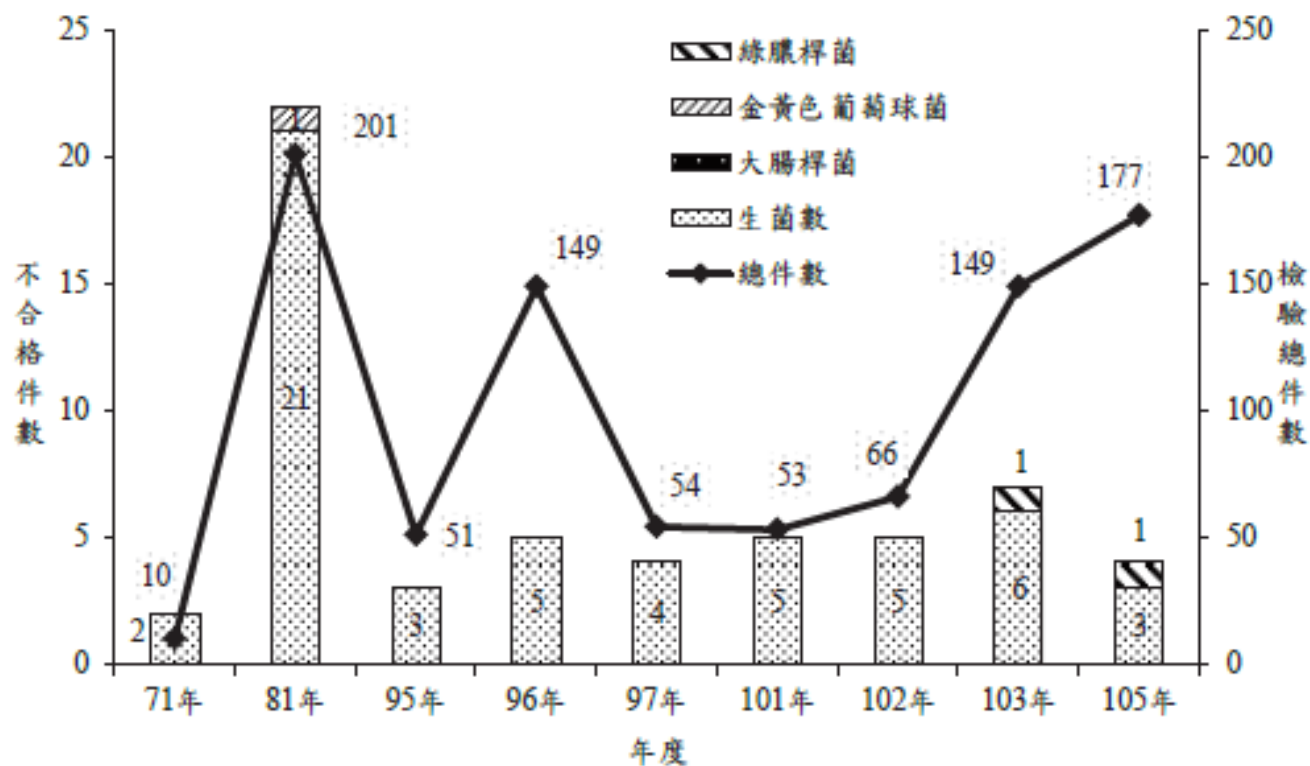
溫國慶

110年11月4, 8, 12日

內容

- 序言
- 化粧品微生物限量基準與檢驗
- 微生物限量與檢驗
- 有關微生物檢驗快篩片
- 結語

序言

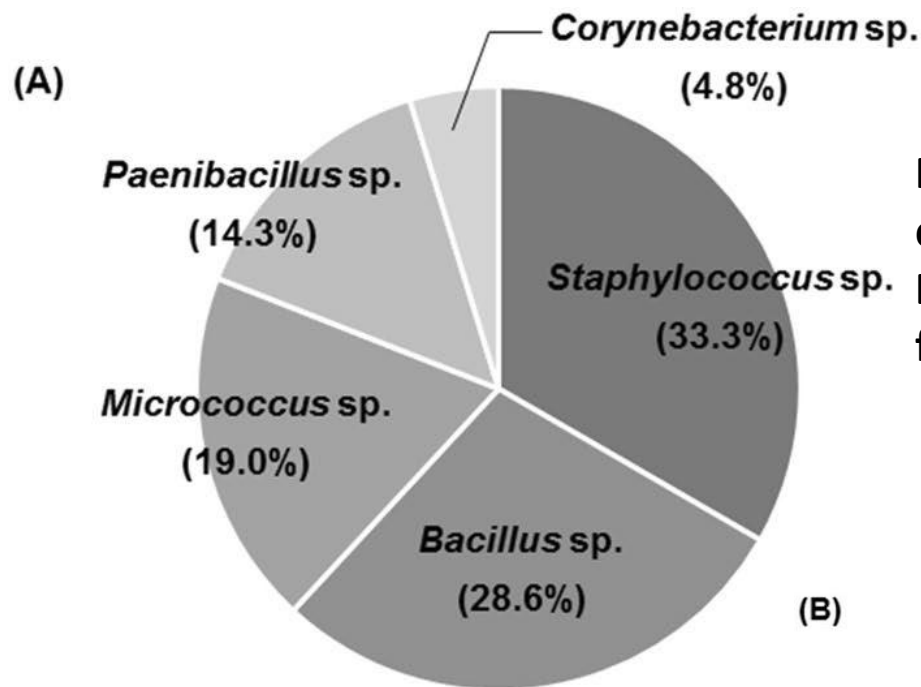


圖一、歷年市售化粧品微生物試驗結果比較

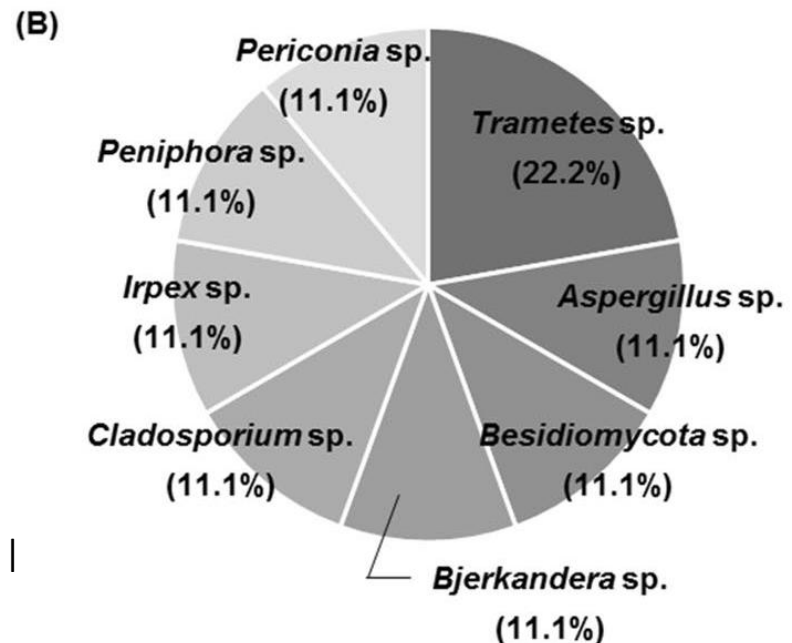
食品藥物研究年報 8: 149-155 2017

Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005–2018

- In the years 2005–2018, 104 reports on microbiologically contaminated cosmetics were identified. Twenty of them were products for children.
- The majority of the products (65.38%) were produced in Rapex member states.
- In most cases, contamination was caused by **Gram-negative bacteria (59.62%)**, mostly *Pseudomonas spp.* (35.58%) and *Enterobacter spp.* (11.54%).
- [Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology Volume 33, Issue 11](#) p. 2151-2157



Risk factors influencing contamination of customized cosmetics made on-the-spot: Evidence from the national pilot project for public health



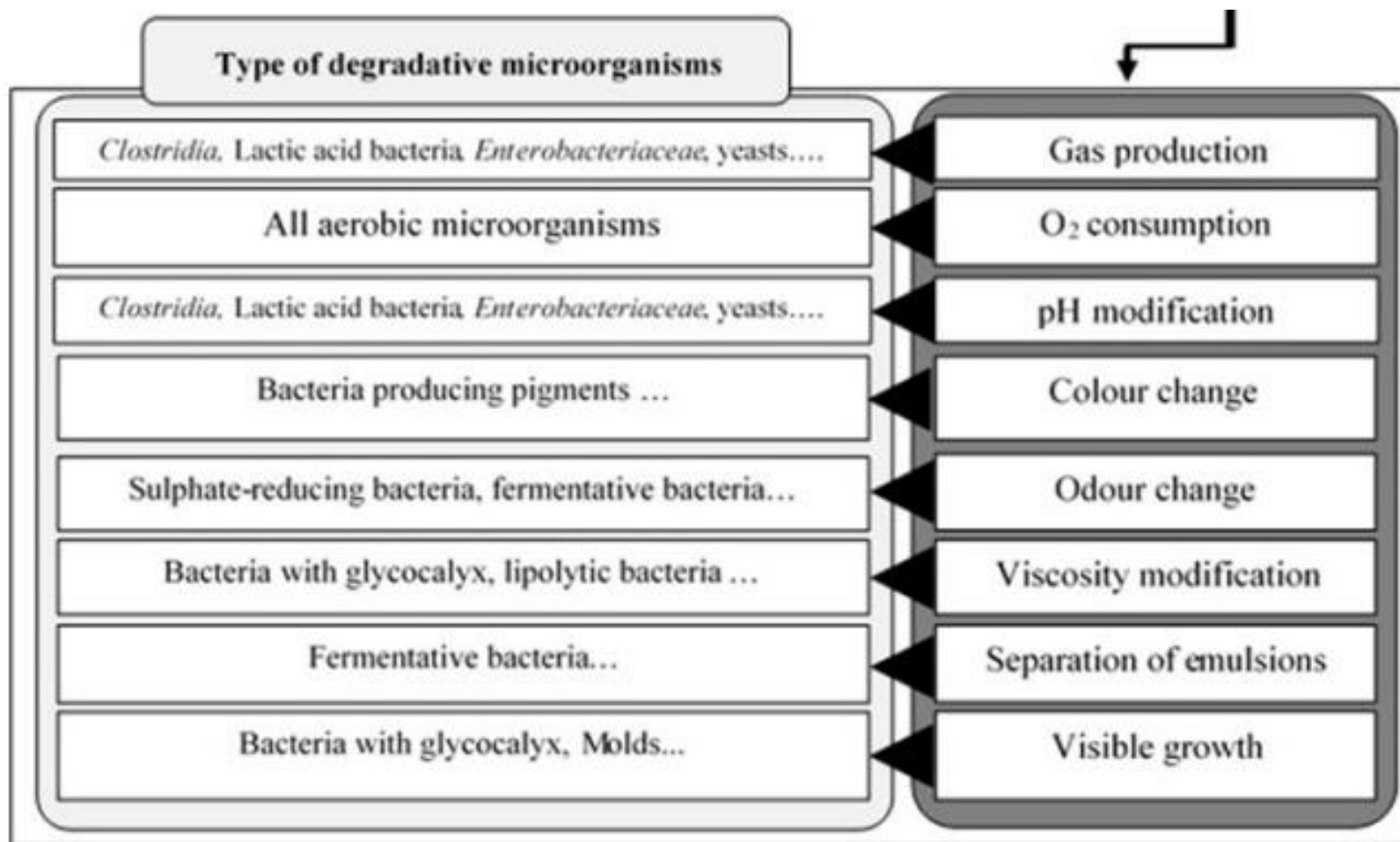


Fig. Causes and consequences of microorganisms contamination in cosmetics

檢測前準備事項

◆ 檢測前準備

- － 培養基製備
- － 培養基效能性測試
- － 標準菌株及保存

◆ 檢測流程

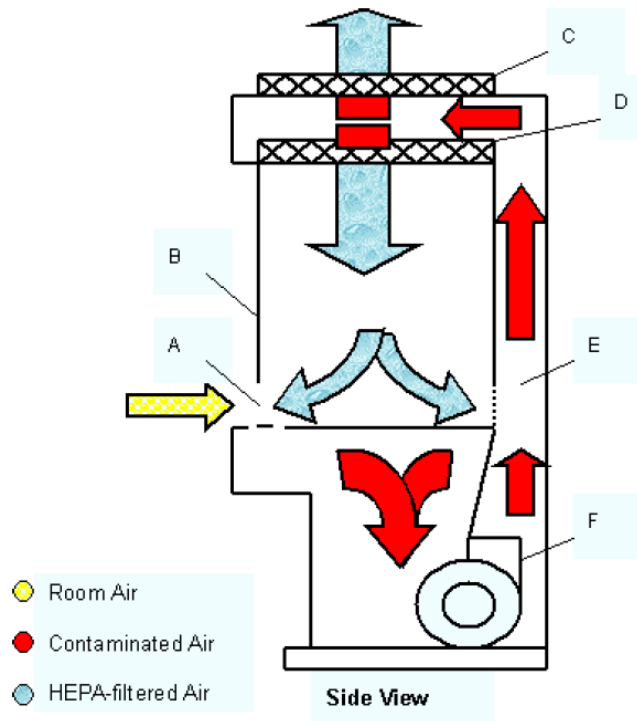
- － 取樣
- － 稀釋及增菌
- － 培養
- － 結果觀察

檢測前準備事項

◆ 設備

- 天平
- 無菌操作台 (Laminar Flow), 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
- 高壓滅菌釜 (Autoclave)
- 培養箱 (Incubator)
- pH 測定儀
- ◆ 培養基配製
- 配製後應標示：
培養基名稱、批次號碼、製備日期及有效期限
- 滅菌條件：一般為 121°C 15 mins 或依藥典之規定

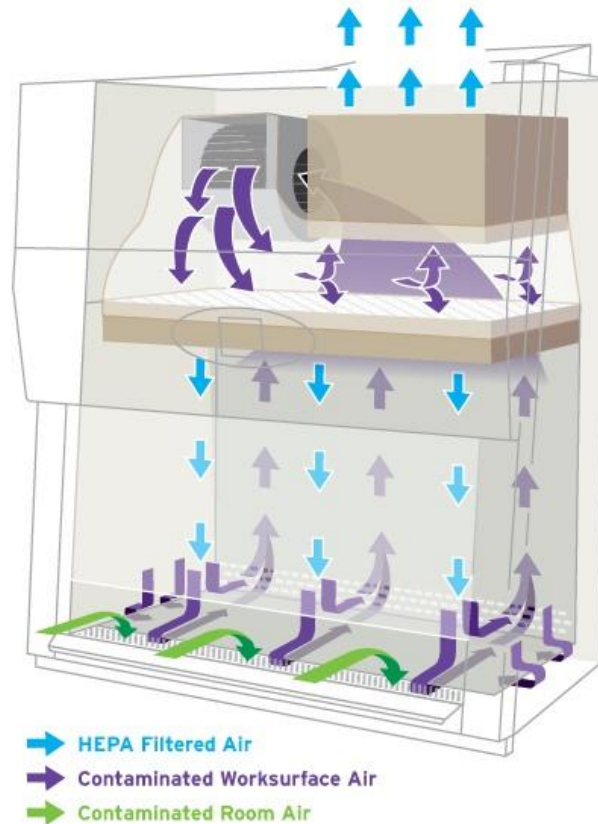
Class II / A1 BSC



- A. 視窗開口
- B. 視窗
- C. 排氣HEPA FILTER
- D. 供氣HEPA FILTER
(Supply HEPA filter)
- E. 後氣室(Rear plenum)
- F. 風機

Class II, Type A2

Air In-flow 70% Recirculated vs. 30% Exhausted



檢測前準備事項

- ◆ 培養基效能試驗 (Growth Promotion Test)
- ◆ 稀釋液之配製
- ◆ 使用器具之滅菌

各種微生物培養基及條件

菌種	培養基	培養條件
好氣性生菌數	• Modified Lethen agar (MLA)	30 ± 2 ° C, 48 hr
金黃色葡萄球菌	• Baird-Parker agar (BP)	35 ° C, 48 hr
大腸桿菌	• MacConkey agar • Levine's eosin methylene blue agar (L-EMB)	35 ° C, 24 hr 35 ° C, 24 hr
綠膿桿菌	• MacConkey agar • Cetrimide agar	35 ° C, 24 hr 35 ° C, 24 hr
白色念珠菌	• Sabouraud dextrose agar (SDA)	32.5 ± 2.5 ° C, 48-72 hr

★固體培養基再融化不超過1次，以免影響其效能

★融化的培養基儲存不應超過 8 小時

培養基效能測試 (Growth Promotion of the Media)

◆ 無菌性試驗

於30~ 35°C 恆溫培養箱中培養18 ~24小時，觀察是否有菌落生長

◆ 有效性試驗

- MLA

致病原性三株菌任選1~2株 接種量 <100 cfu 30~ 35°C 培養18 ~24小時 觀察是否能長菌

- SDA

Candida albicans 接種量 <100 cfu 20~ 25°C, 2 ~3 天 觀察是否能長菌

— 選擇性培養基

以相對應之菌株接種，接種量 <100 cfu 30~ 35°C 培養18 ~24小時 觀察是否能長菌

★ *Candida albicans* (ATCC10231 ; BCRC21538)

微生物限量試驗標準菌株

藥典建議之品管標準菌株名稱	ATCC 編號	BCRC 編號
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	BCRC 11634
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	BCRC 12154
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	BCRC 11633

ATCC: American Type Culture Collection

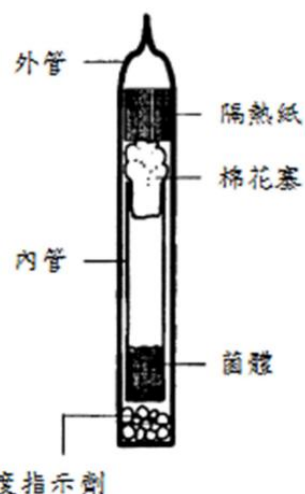
BCRC: Bioresource Collection and Research Center

菌種活化製備

- 選擇正確菌種，並確認菌種身份
- 依據生產廠商說明書活化菌種
- 不要重覆從菌種包裝瓶中移取菌種或重新冷凍菌種
- 繼代次數(每接種一次即為一代)
- 所有接觸菌種(液)之器具皆須經高溫高壓滅菌處理

菌瓶開封及菌株活化

菌瓶雙層管結構



3. 以鑷子取出隔熱紙及內管



4. 以鑷子取出內管之棉花塞



1. 加熱外管頂端（菌體處不可過熱）



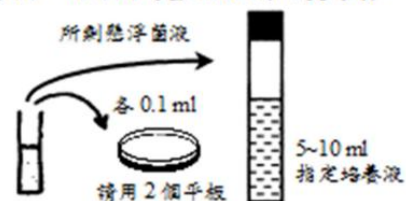
5. 滴加 0.3~0.5 ml 指定培養液於內管中，使菌體溶解成懸浮菌液



2. 立即滴加無菌水，並以鑷子敲破玻璃外管



6. 取出 0.1 ml 懸浮菌液培養於指定平板培養基，所剩懸浮菌液加入原指定培養液，兩者同時置於指定溫度培養



※ 菌瓶開封及菌株活化之所有操作過程均需“無菌操作”

菌種之保存 (Maintenance of Stock Culture)

- ◆ 繼代培養 (適當培養基於 4°C)
- ◆ 冷凍保存 (一) ($-20 \sim -30^{\circ}\text{C}$) 約半年
- ◆ 冷凍保存 (二) ($-40 \sim -90^{\circ}\text{C}$) 數年
- ◆ 冷凍保存 (三) 液態氮 (-180°C 以下) (可長期保存)
- ◆ 冷凍乾燥法 (可長期保存)

冷凍保存 ($-40 \sim -90^{\circ}\text{C}$)

- ◆ 器具:無菌吸管、無菌菌種保存瓶及菌種盒
- ◆ 材料:菌株、細菌培養液、20%無菌甘油溶液
- ◆ 方法:取菌液與20%無菌甘油溶液以1:1比例置於菌種保存瓶內均勻混合後放入菌種盒
置 4°C 冰箱 2 小時 $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ 2 小時
 $\rightarrow$ 再置 $-40^{\circ}\text{C} \sim -90^{\circ}\text{C}$ 保存

微生物限量檢測流程

◆ 好氧性總生菌數

取樣 → 稀釋 → 培養皿製備 → 培養 → 結果計算

◆ 特殊致病原菌

取樣 → 增菌培養 → 特殊培養基篩選 → 再確認
培養基篩選 → 結果觀察及判定

- 化粧品微生物限量基準與檢驗

- 化粧品原料檢驗可參考檢驗方法或參考中華藥典方法

- 化粧品原料微生物限量請衡量產品自訂或參考原廠COA規格

食藥署110.3.2 衛授食字第1101600919號草案公告
111.1.1 生效

修正規定			
編號	產品類型	生菌數	其他規定
1	嬰兒用、眼部周圍用及使用於接觸黏膜部位之化粧品	100 CFU/g 或 CFU/mL 以下	不得檢出大腸桿菌(<i>Escherichia coli</i>)、綠膿桿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)、金黃色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)或 <u>白色念珠菌</u> (<i>Candida albicans</i>)等。
2	其他類化粧品	1000 CFU/g 或 CFU/mL 以下	

Scheme for Enumeration, Isolation, and Identification of Cosmetic Microbes

- Sample preparation.
- Dilute prepared samples in MLB.
- Spread duplicate 0.1 ml samples on..

(a)	(b)	(c)	(d)
MLA 48h, 30°C	PDA (or MEA) with chlortetracycline 7 days, 30°C	BP (or VJ) agar 48h, 35°C (optional)	Anaerobic agar MLA 2-4 days, 35°C

- Enrich MLB dilutions for 7 days, at 30°C. Purify growth only if no colonies on MLA.
- Count colonies and subculture different colony types on MLA and MacConkey agar (and BP or VJ agars if used in c, above). For fungal isolates, **see** text.
- Determine Gram reaction, cell shape, and catalase production of purified isolates.
- Proceed with identification of bacterial isolates as described in text, or use identification kits.

- **好氣性生菌數之檢驗**
(Test of Aerobic Plate Count)

- 檢液之調製
- 確認容器無破損 振搖均勻 70%乙醇溶液消毒
液態檢體

↓ 精確稱取檢體1 mL →滅菌試管

↓ MLB 9 mL混勻

↓ 10倍稀釋檢液

固態與粉末檢體

↓ 精確稱取檢體1 g →滅菌試管

↓ Tween 80 1 mL (121°C滅菌15分鐘)

↓ MLB 8 mL混勻

↓ 10倍稀釋檢液

面霜及油脂類檢體

- ↓ 精確稱取檢體1 g →滅菌試管
- ↓ Tween 80 1 mL (121°C滅菌15分鐘)
- ↓ 無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL 混勻
- ↓ 10倍稀釋檢液

噴霧劑

- ↓ 噴嘴消毒
- ↓ 噴出部分檢體丟棄
- ↓ 再將檢體噴灑於稀釋瓶中
- ↓ 精確稱取檢體1 g →滅菌試管
- ↓ MLB 9 mL混勻
- ↓ 10倍稀釋檢液

無水材料類檢體

- ↓ 參照固態與粉末檢體或面霜及油脂類檢體

改良式 Letheen 培養液 (Modified Letheen broth, MLB)

項次	配方	添加量
1	Letheen 培養液 (Letheen broth)	25.7 g
2	胰化酪蛋白朊 (Trypticase peptone)	5 g
3	硫蛋白朊 (Thiotone peptone)	10 g
4	酵母抽出物 (Yeast extract)	2 g
5	亞硫酸氫鈉 (NaHSO_3)	0.1 g
6	蒸餾水	1000 mL

Letheen 培養液 (Letheen broth)

項次	配方	添加量
1	Meat Peptone	10.0 g
2	Beef Extract	5.0 g
3	Polysorbate 80	5.0 g
4	Sodium Chloride	5.0 g
5	Lecithin	0.7 g
6	Demineralized Water	1000 mL

Table — Examples of neutralizers for the antimicrobial activity of preservatives and washing liquids

Preservative	Chemical compounds able to neutralize the antimicrobial activity of preservatives
Phenolic substances: Parabens, phenoxyethanol, phenylethanol, etc. Anilides	Lecithin Polysorbate 80 Fatty alcohol ethylene oxide condensate Non-ionic surfactants
Quaternary ammonium salts Cationic surfactants	Lecithin, saponin, polysorbate 80, sodium dodecylsulphate Fatty alcohol ethylene oxide condensate

表二 各種去除干擾物質之常用中和劑或方法

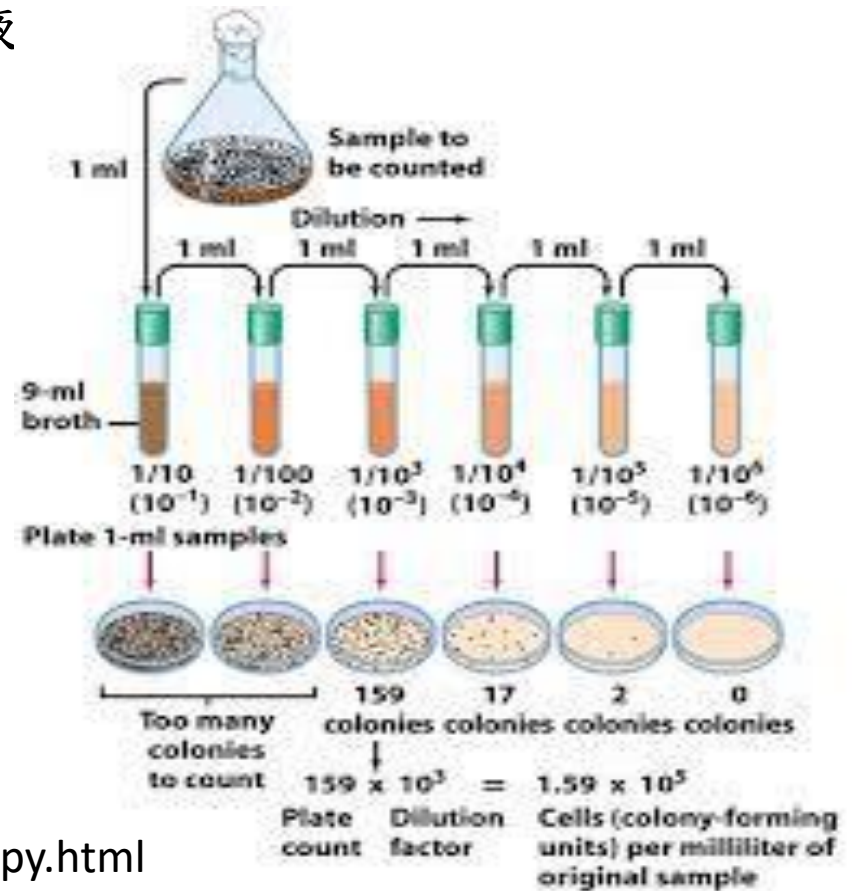
干擾物質	可選用之中和劑或方法
戊二醛 (glutaraldehyde)、汞劑 (mercurials)	亞硫酸氫鈉 (Sodium hydrogen sulfite, Sodium bisulfite)
酚類 (Phenolics)、乙醇 (alcohol)、醛類 (aldehydes)、山梨酸 (sorbate)	將檢品稀釋
醛類 (aldehydes)	甘胺酸 (Glycine)
四級銨化合物 (Quaternary ammonium compounds, QACs)、對羥基苯甲酸酯類 (parahydroxybenzoates, parabens)、二雙胍類 (bis-biguanides)	卵磷脂 (Lecithin)
四級銨化合物、碘 (iodine)、對羥基苯甲酸酯類	油酸聚醇山梨酯 (Polysorbate)
汞劑	硫酸乙醇酸鹽 (Thioglycollate)
汞劑、鹵素 (halogens)、醛類	硫代硫酸鹽 (Thiosulfate)
乙二胺四乙酸 (EDTA, edetate)	鎂或鈣離子 (Mg or Ca ions)

系列稀釋檢液

↓ 取上述10倍稀釋檢液1 mL

↓ 加至MLB 9 mL

↓ 依序作成 $10^2 \sim 10^6$ 系列稀釋檢液



<https://m.yao51.com/jiankangtuku/fnsknmpy.html>

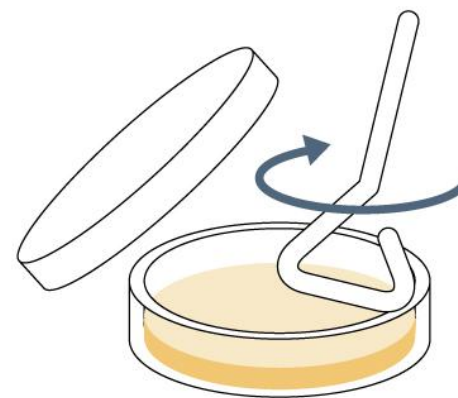
生菌培養

↓各稀釋檢液0.1 mL至MLA，以無菌曲玻棒塗抹，進行二重複

↓取MLB 0.1 mL至MLA，以無菌曲玻棒塗抹(空白對照組，二重複)

↓待檢液被培養基吸收後，將培養基倒置於

↓ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 hr



生菌數之計算

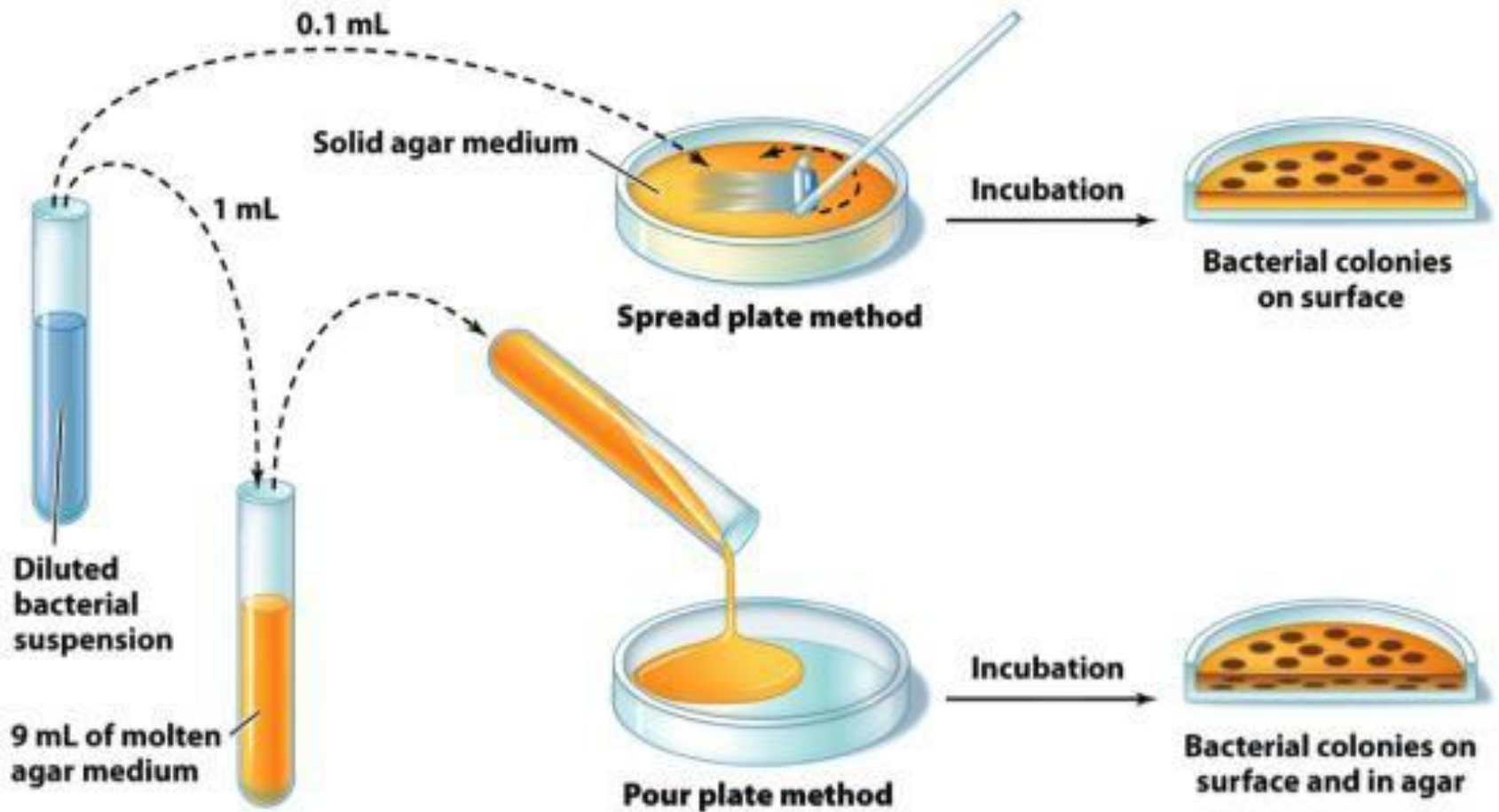
↓選取25～250個菌落之稀釋倍數平板來

↓將該稀釋倍數之兩個平板之菌落數平均值乘其稀釋倍數

↓即得其生菌數，單位為CFU/g或CFU/mL

改良式 Letheen 培養基 (Modified Letheen agar, MLA)

項次	配方	添加量
1	Letheen 洋菜 (Letheen agar)	32 g
2	胰化酪蛋白朊 (Trypticase peptone)	5 g
3	硫蛋白朊 (Thiotone peptone)	10 g
4	酵母抽出物 (Yeast extract)	2 g
5	氯化鈉	5 g
6	亞硫酸氫鈉 (NaHSO_3)	0.1 g
7	洋菜 (Agar)	5 g
8	蒸餾水	1000 mL



<https://m.yao51.com/jiankangtuku/fnsknmpy.html>

菌落計數計 (Colony Counter)



<http://www.suntex.com.tw/en/ProductDetailInfo.php?brand=176&cate=178&pid=194>

總生菌數之結果計算

◆ 案例

10X 培養皿 0 , 0 結果 $< 10 \text{ cfu/g}$

◆ 案例

10X 培養皿 15 , 25 平均20 結果 $< 2000 \text{ cfu/g}$ ($2.0 \times 10^3 \text{ cfu/g}$)

◆ 案例

100X 培養皿 130 , 120 平均 125

1000X 培養皿 38 , 54 平均 46

結果 ($125 \times 1000 + 46 \times 10000$) $\div 2 = 292500$

$2.9 \times 10^5 \text{ cfu/g}$

$$\begin{aligned} \text{總菌落數(CFU/mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取培養皿之檢品實際體積總和}} \\ &= \frac{X+Y}{(0.1/D) + (0.1/D)} \end{aligned}$$

D：選取培養皿之稀釋度

X、Y：D 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

$$\begin{aligned} \text{總菌落數(CFU/mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取培養皿之檢品實際體積總和}} \\ &= \frac{X_1 + Y_1 + X_2 + Y_2}{(0.1/D_1) + (0.1/D_1) + (0.1/D_2) + (0.1/D_2)} \end{aligned}$$

註： D_1 、 D_2 ：選取培養皿之稀釋度

X_1 、 Y_1 ： D_1 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

X_2 、 Y_2 ： D_2 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

- 增菌試驗

經MLA培養，無菌落生長，則需進行本試驗

↓ 取各系列稀釋檢液(MLB)， $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 7天，每天觀察是否有細菌生長

↓ 所有增菌稀釋液取一接種環劃線培養於MLA及McConkey培養基， $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 hr

↓ 進行金黃色葡萄球菌、大腸桿菌及綠膿桿菌之檢測

馬康奇培養基 (MacConkey agar)

項次	配方	添加量
1	聚蛋白朊 (Polypeptone)	3 g
2	蛋白朊 (Peptone)	17 g
3	乳糖 (Lactose)	10 g
4	膽汁鹽 (Bile salts No.3)	1.5 g
5	氯化鈉	5 g
6	中性紅 (Neutral red)	0.03 g
7	結晶紫 (Crystal violet)	0.001 g
8	洋菜 (Agar)	13.5 g
9	蒸餾水	1000 mL

金黃色葡萄球菌之檢驗 (Test of *Staphylococcus aureus*)

鑑別試驗

分離培養

↓ 10倍稀釋檢液於30°C, 48 hr

↓ 取一環耳劃線培養於BP培養基，35°C, 48 hr，

↓ 菌落為圓形，直徑2~3 mm，表面凸起、平滑、具乳酪膠狀，呈灰黑色或黑色，周邊色淡，菌落外圍依序由內而外，有不透明環及透明環環繞

↓ 鉤取可疑菌落劃線培養於MLA，35°C, 18~24 hr

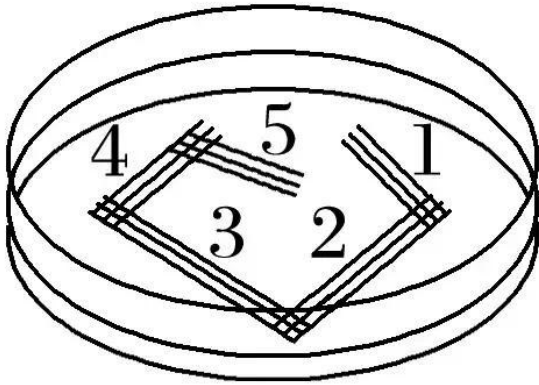
↓ 生化試驗鑑定

巴德派克培養基 (Baird-Parker agar, BP)

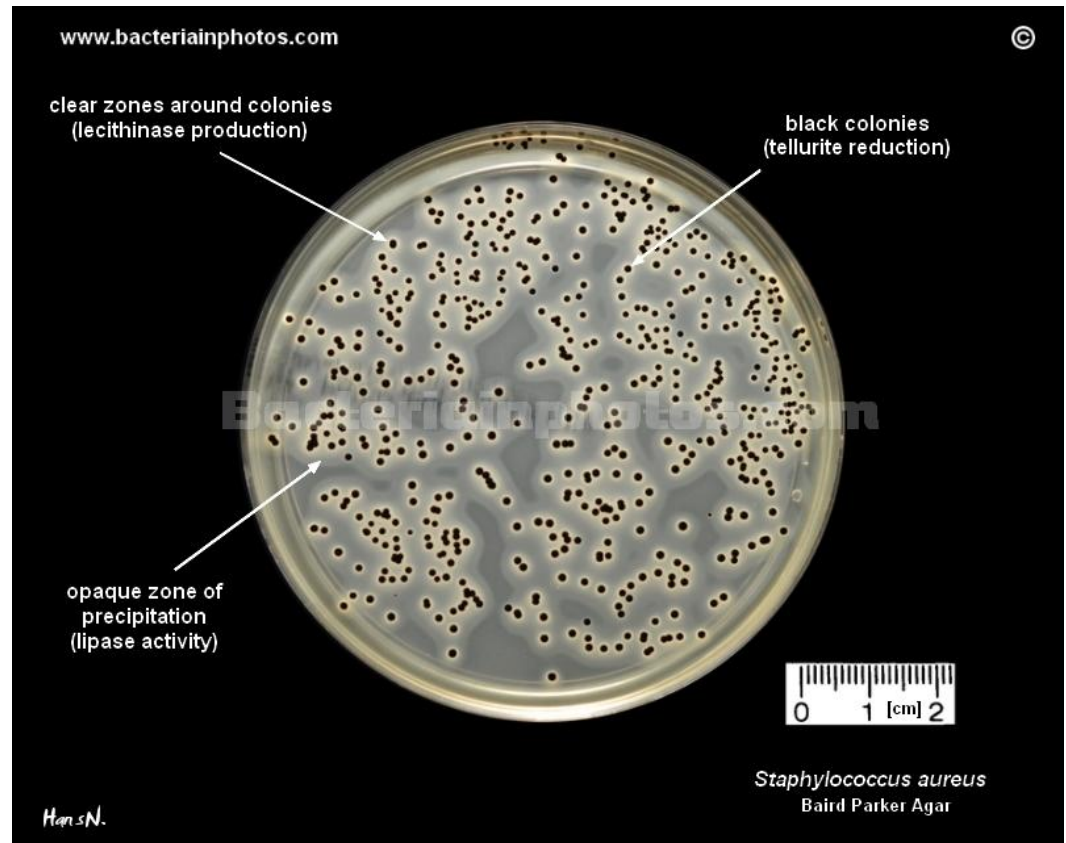
基礎培養基(basal medium)		蛋黃亞碲酸鹽強化培養液 (Egg yolk tellurite enrichment, EYT)	
配方	添加量	配方	添加量
胰化蛋白胨 (tryptone)	10 g	蛋黃: 無菌生理食鹽水	3:7
牛肉抽出物 (beef extract)	5 g	1% 亞碲酸鉀溶液	10 mL
酵母抽出物 (yeast extract)	1 g		
丙酮酸鈉 (sodium pyruvate)	10 g		
甘胺酸 (glycine)	12 g		
氯化鋰 (LiCl · 6H ₂ O)	5 g		
洋菜 (agar)	20 g		
蒸餾水	950 mL		

完全培養基(Complete medium)

基礎培養基: EYT= 95:5



<https://kknews.cc/news/r9k92br.html>



http://www.bacteriainphotos.com/baird_parker_agar.html

生化試驗

1. 革蘭氏染色鏡檢

↓ 鉤取適當菌量，與滴在載玻片上的無菌生理食鹽水混合，製成薄抹片，自然風乾固定

↓ 初染：抹片用哈克氏結晶紫液染1分鐘後，水洗(< 5秒)

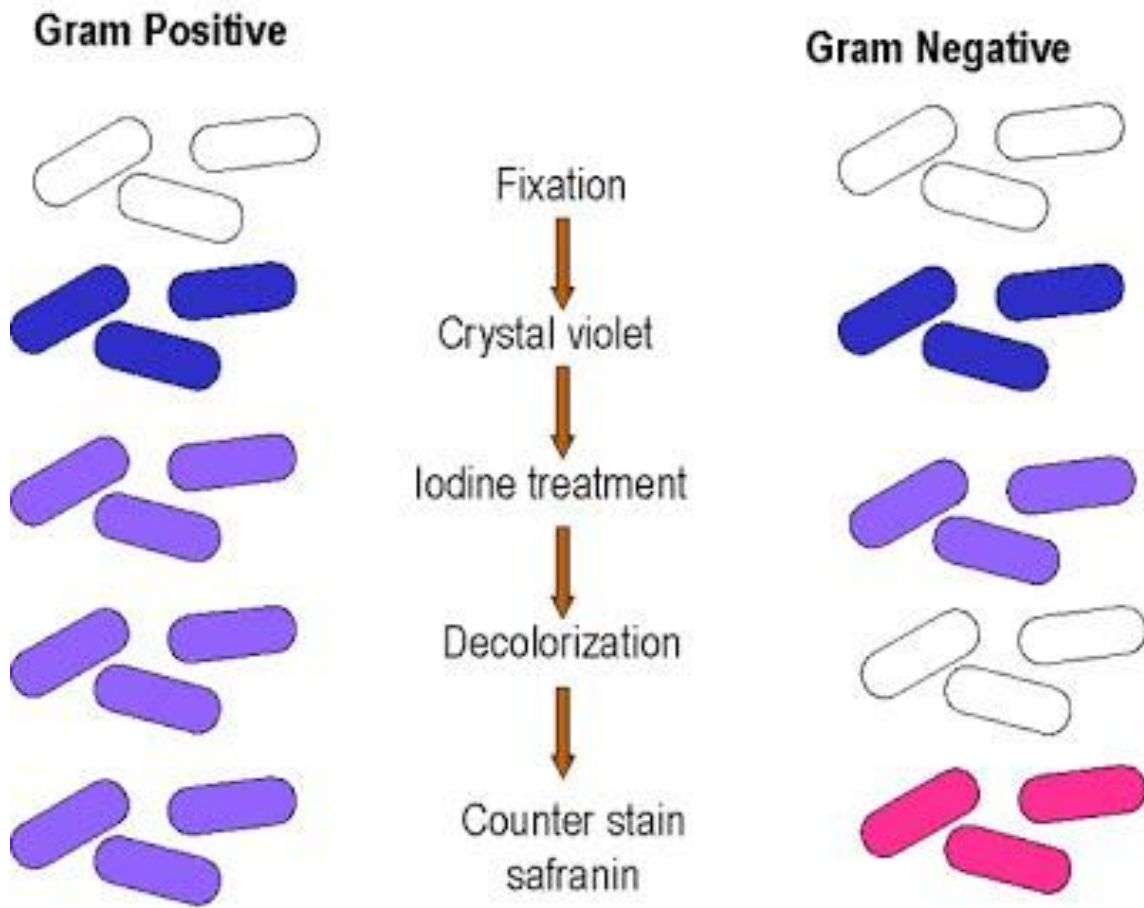
↓ 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。

↓ 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出，再以水洗。

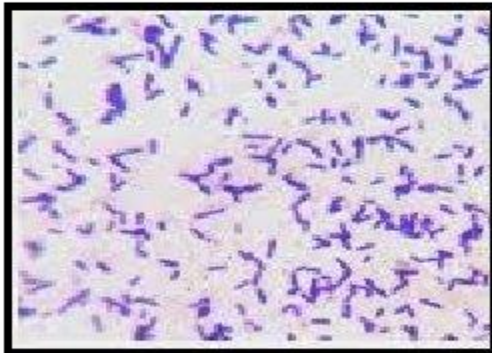
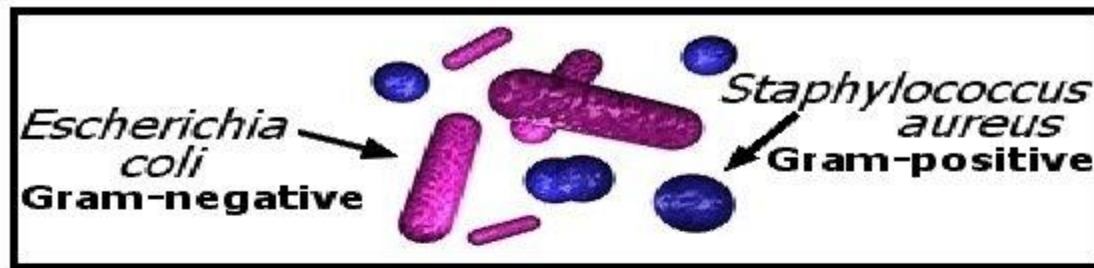
↓ 複染：用複染液複染30秒鐘，水洗。

↓ 然風乾

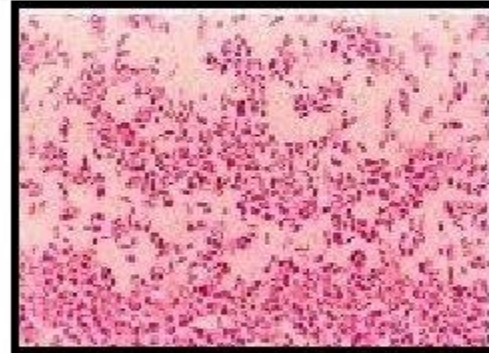
↓ 鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌



<https://slidetodoc.com/medical-microbiology-lab-3-by-assistant-lecturer-zainab/>



Staphylococcus aureus



Escherichia coli

<https://slidetodoc.com/medical-microbiology-lab-3-by-assistant-lecturer-zainab/>

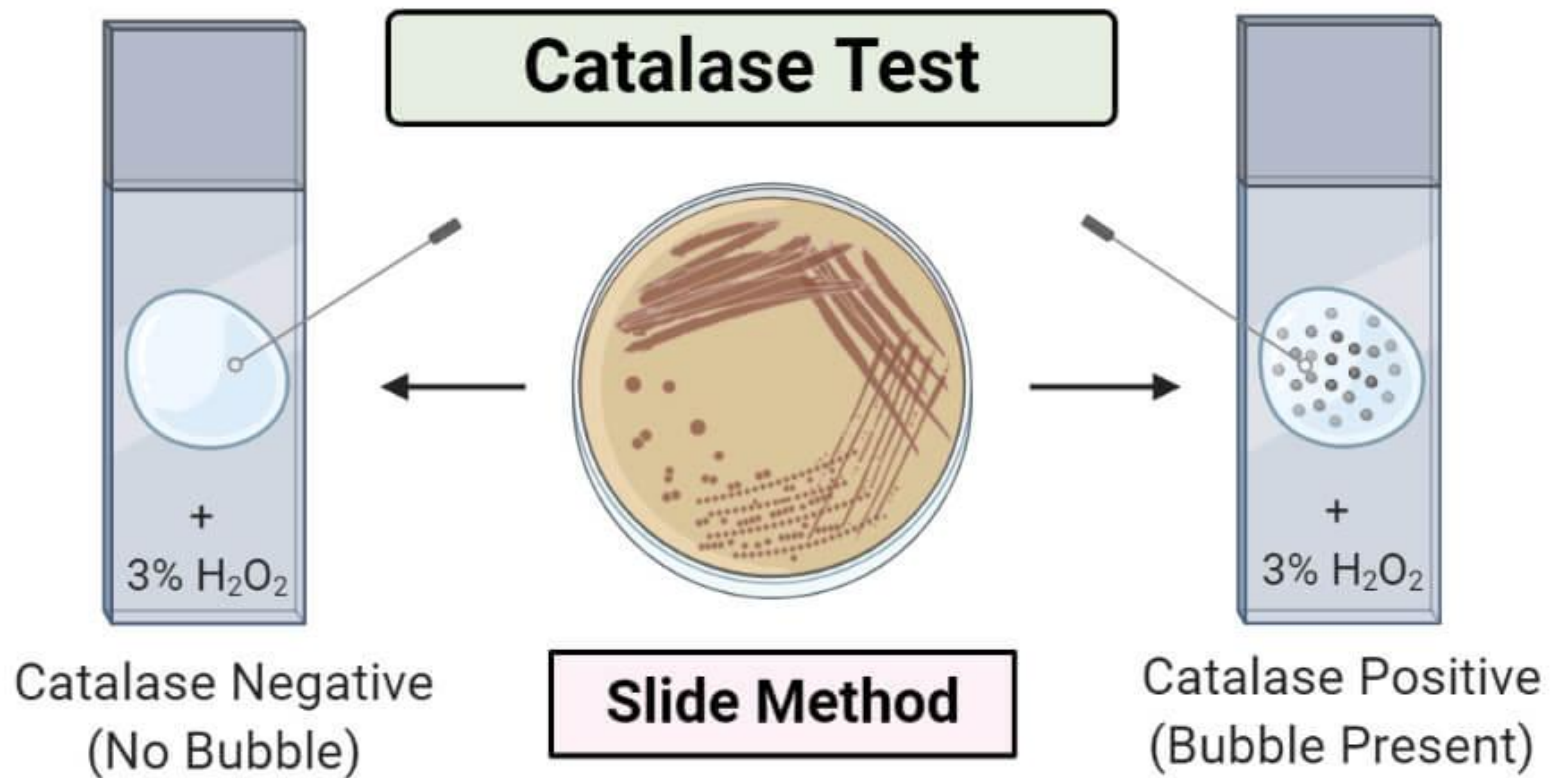
2. 觸酶試驗(Catalase test)：

↓ 自MLA培養基上鉤菌塗抹於載玻片上，

↓ 加3%**過氧化氫**溶液1～2滴，觀察有無氣泡產生。

↓ 產生氣泡者，為正反應；不產生氣泡者，為負反應。

↓ 金黃色葡萄球菌為正反應。



<https://microbenotes.com/catalase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/>

3. 凝固酶試驗(Coagulase test)：

↓自MLA培養基上鉤菌至含BHI培養液0.2 mL之試管中，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 18~24hr，

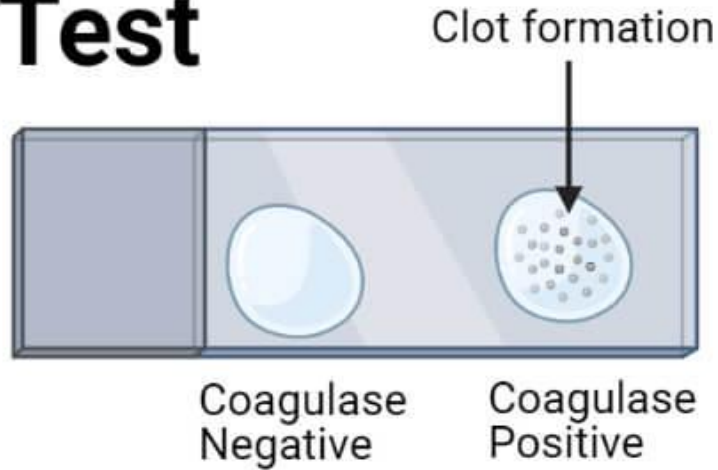
↓加入凝固酶血漿0.5 mL，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 6hr，每隔1小時觀察有無凝塊之形成，

↓若無凝塊形成時，應繼續培養至24hr觀察之，

↓每組檢體應各做一正負對照組作為對照依據，

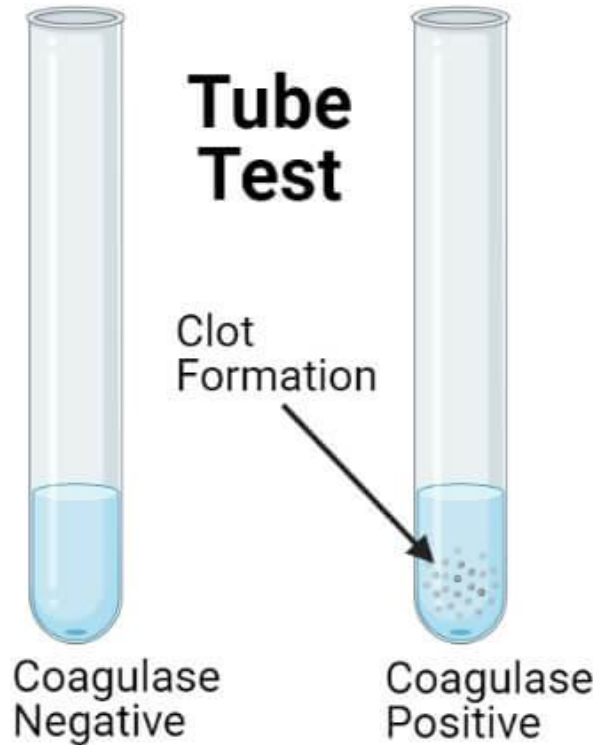
↓金黃色葡萄球菌為正反應。

Coagulase Test



Slide Test

Tube Test



<https://microbenotes.com/coagulase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/>

大腸桿菌之檢驗 (Test of *Escherichia coli*)

鑑別試驗：

↓ 10倍稀釋檢液於30°C, 48 hr，

↓ 以無菌接種環取一環耳劃線培養於馬康奇培養基，
於35°C, 24 hr

↓ 觀察所形成菌落之生長狀態，取馬康奇培養基上紅色或淡粉紅色菌落，

↓ 劃線培養於L-EMB培養基，於35°C, 24 hr。

反射光下有金屬光澤 (Metallic sheen)，於透射光下為藍黑色。

革蘭氏染色鏡檢：Gram (-)

伊紅亞甲藍培養基

(Levine's eosin methylene blue agar, L-EMB)

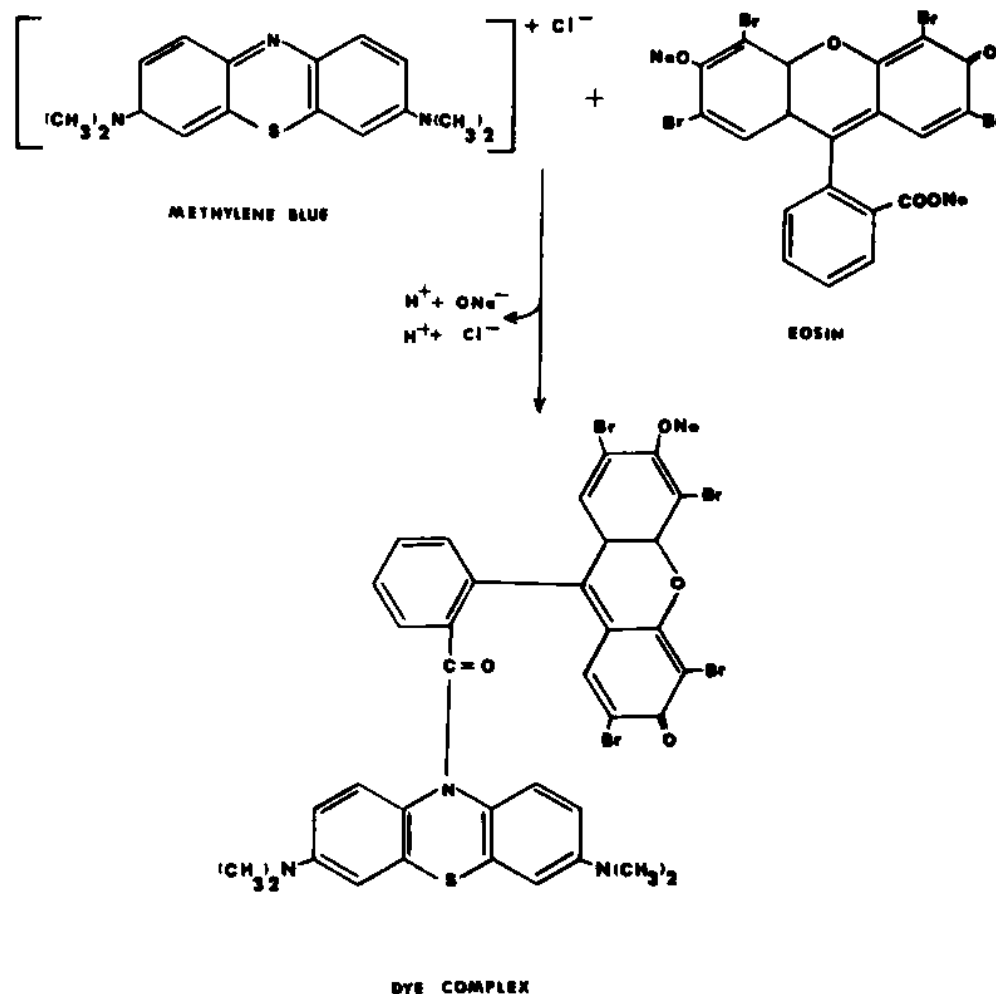
項次	配方	添加量
1	蛋白朊 (Peptone)	10 g
2	乳糖 (Lactose)	10 g
3	磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	2 g
4	洋菜 (Agar)	15 g
5	伊紅 Y (Eosin Y)	0.4 g
6	亞甲藍 (Methylene blue)	0.065 g
7	蒸餾水	1000 mL



https://www.researchgate.net/figure/E-coli-colony-morphology-on-MacConkey-agar-plate-Presumptive-identification-of-E-coli_fig2_319130632



https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211221.pdf

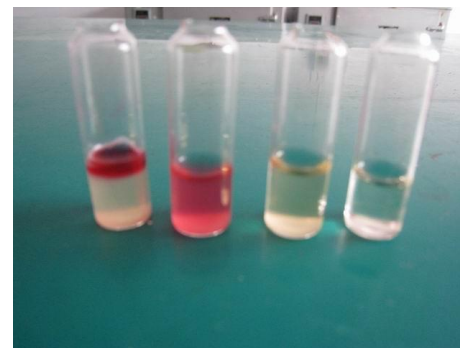


Proposed mechanism of complexing of eosin and methylene blue

Proposed mechanism of complexing of eosin and methylene blue under acidic conditions.

<https://www.semanticscholar.org/paper/Mechanism-of-Action-of-Eosin-Methylene-Blue-Agar-in-Horvath-Ropp/f5ac79d044526184a18106e7040fc03d25ace8a7/figure/2>

大腸桿菌陽性者，應符合下表所列之結果 (IMViC)



試驗或基質	正反應 (+)	負反應 (-)	大腸桿菌之反應
Indole 試驗	紅色	原色	+/-
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
歐普氏試驗	粉紅色	原色	-
檸檬酸鹽利用試驗	混濁狀	澄清	-

綠膿桿菌之檢驗

(Test of *Pseudomonas aeruginosa*)

鑑別試驗：

分離培養：

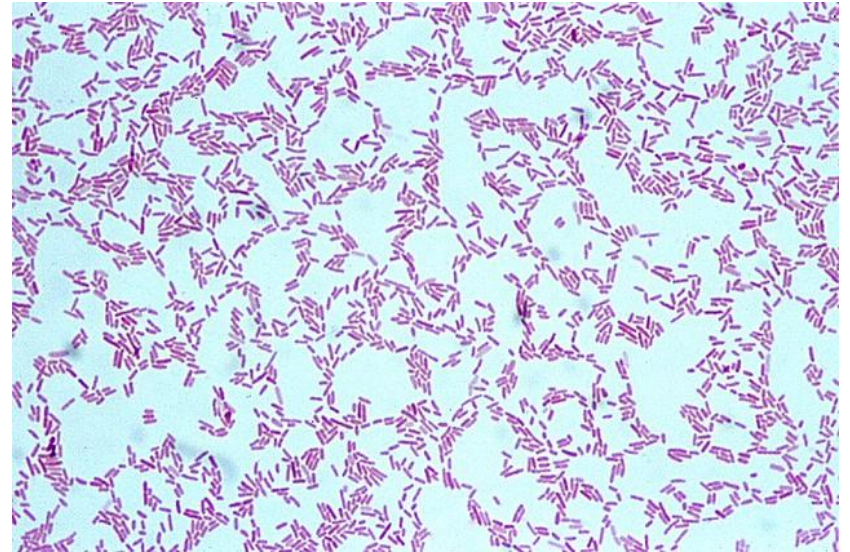
↓ 10倍稀釋檢液於30°C, 48 hr，

↓以無菌接種環取一環耳劃線培養於馬康奇培養基及溴化十六烷基三甲銨培養基上，於35°C, 24 hr

↓若在馬康奇培養基菌落呈現白色菌落且在溴化十六烷基三甲銨培養基上有菌落生長，則可能為綠膿桿菌。

溴化十六烷基三甲銨培養基 (Cetrimide agar)

項次	配方	添加量
1	胰化明膠 (Pancreatic digest of gelatin)	20 g
2	氯化鎂 (MgCl_2)	1.4 g
3	硫酸鉀 (K_2SO_4)	10 g
4	洋菜 (Agar)	13.6 g
5	溴化十六烷基三甲銨 ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$)	0.3 g
6	蒸餾水	1000 mL



<https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1418859086>

https://www.researchgate.net/figure/Figure2-Show-Pseudomonas-aeruginosa-colony-on-cetrimide-agar_fig2_308596767

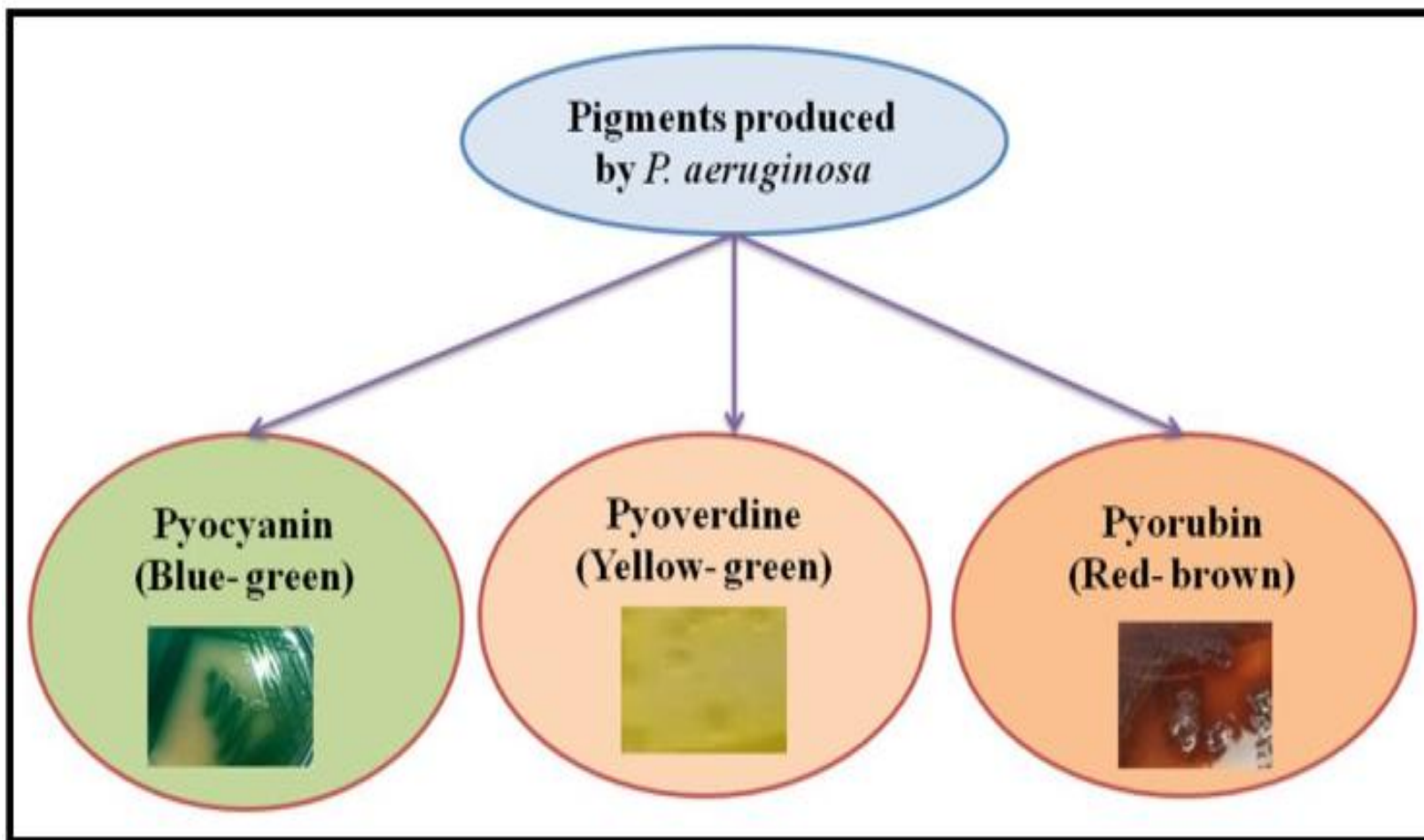


Fig. Pigments produced by *P. aeruginosa*

初步試驗：

↓自馬康奇培養基或溴化十六烷基三甲銨培養基上鈎菌，進行革蘭氏染色(Gram stain), **Gram (-)**

↓**三糖鐵斜面培養基**試驗和**氧化酶試驗**(oxidase test)，結果為正反應者，則應進行生化試驗。

三糖鐵培養基 (Triple sugar iron agar, TSI)

項次	配方	添加量
1	聚蛋白胨 (Polypeptone)	20 g
2	氯化鈉	5 g
3	乳糖 (Lactose)	10 g
4	蔗糖 (Sucrose)	10 g
5	葡萄糖 (Glucose)	1 g
6	硫酸銨亞鐵 [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.2 g
7	硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.2 g
8	酚紅 (Phenol red)	0.025 g
9	洋菜 (Agar)	13 g
10	蒸餾水	1000 mL

Result

Reaction on TSI			Result	Example
Butt color	Slant color	H ₂ S		
Red	Red	Negative	Alk/Alk/- (No action on sugars)	Non fermenter e.g. <i>Pseudomonas</i>
Yellow	Red	Negative	A/Alk/- (Glucose fermented without H ₂ S)	LNF e.g. <i>Shigella</i>
Yellow	Red	Positive black in butt	A/Alk/+ (Glucose fermented with H ₂ S)	LNF e.g. <i>Salmonella</i> & <i>Proteus</i>
Yellow	Yellow	Negative	A/A/- (three sugars are fermented)	LF e.g. <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>



<https://www.slideshare.net/anwarsh148/enterobacteriaceae-biochemical-reaction-2>

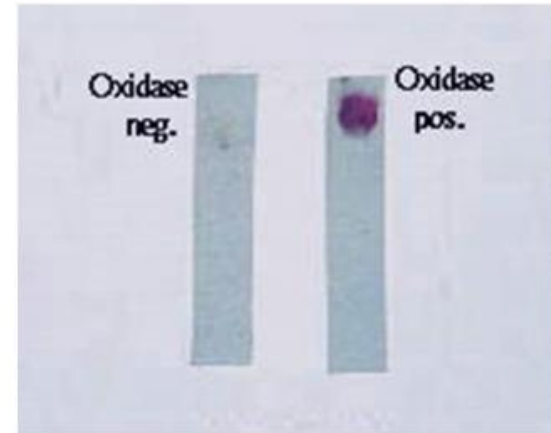
Oxidase Test

Principle:

Tetramethyl p-phenylene diamine hydrochloride
(oxidase reagent)
colourless

Cytochrome oxidase enzyme

Indophenol
(Purple colour)
within 1-2 min



<https://quizlet.com/36699920/lab-tests-for-gram-negative-rods-flash-cards/>

<https://leaked-video.live/lp/skip-lp/index-new.html?tag=500067&tag1=ADK&tag2=14920667&tag3=500067&tag4=ADK&clickid=3olz1x38t2kpxkohr0&country={country}&affid=500067&subid=14920667&as=adk>

生化反應可參照下表所列之結果

生化試驗		正反應	負反應	綠膿桿菌反應
TSI斜面 培養基	斜面	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) ^a
	底部	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) ^a
	產氣	培養基有裂縫	培養基完整	(-) ^a
	硫化氫	黑色	非黑色	(-) ^a
42°C生長試驗		有菌落生長	無菌落生長	(+) ^a
檸檬酸鹽試驗		混濁	澄清	(+) ^a
丙二酸鹽試驗		藍色	綠色	(+) ^a
精氨酸脫酸酶試驗		紫色	黃色	(+) ^a
硝酸鹽還 原試驗	顏色	粉紅或紅色	無變化	(+) ^a
	氣泡	有	無	(+) ^a
螢光產生試驗		有(水溶性)	無	(+)
色素產生試驗		有(紅色)	無	(+)

a：表示為有可能是綠膿桿菌。

• 水質微生物限量與檢驗

• 水質確認

1. 水質檢驗（每週至少 1 次）或製程參數監控得擇一確認；應定期執行微生物檢測（每月至少 1 次），生菌數之容許值為 **NMT 100 CFU/mL**。
2. 微生物定期檢測，建議各使用點每月至少取樣檢測 1 次，且**每週至少取樣檢測 1 點**。
3. 製程參數監控：至少應包含導電度。

水質總生菌數檢驗

↓ 取1 mL 置入已滅菌培養皿

↓ 加入冷卻至45°C 之大豆分解蛋白質-乾酪素瓊脂
培養基 15-20 mL, 加蓋

↓ 於水平檯面上傾側或旋轉, 使檢品與培養基充分
混合, 於室溫下凝固

↓ 倒置於30-35°C, 48-72 hr

大豆分解蛋白質-乾酪素瓊脂培養基 (Soybean-Casein Digest Agar)

項次	配方	添加量
1	胰消化乾酪素	15.0 g
2	木瓜消化大豆	5.0 g
3	氯化鈉	5.0 g
4	瓊脂	15.0 g
5	水	1000 mL

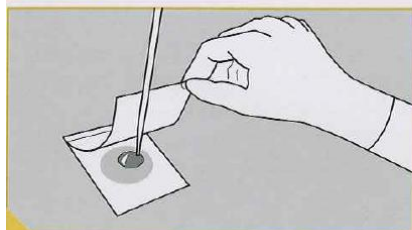
調整pH, 使滅菌後於25°C, 所測pH值為7.3±1

有關微生物檢驗快篩片

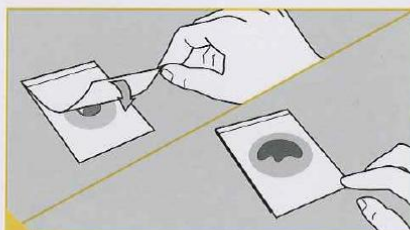
1. 3M™ Petrifilm™ 總生菌數快檢片
2. 日水製藥(Nissui): CompactDry “Nissui” TC
3. 日澤總生菌數快檢片: MC Media Pad AC PLUS
4. Merck: Cult-Dip combi

3M™ Petrifilm™

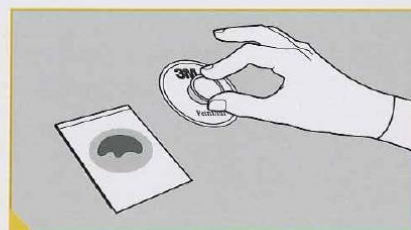
接種



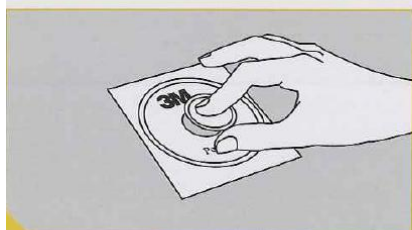
1 將3M™ Petrifilm™ 快速總生菌數快檢片放置於平坦處，揭起上層膜，使用微量吸管將1ml的檢體垂直滴於濾膜的中央處。



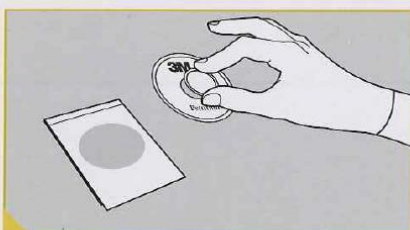
2 緩慢地將上層膜滾動向下覆蓋，並避免在過程中產生氣泡。請勿使上層膜直接落下。



3 將3M™ Petrifilm™ 壓板放置在上層膜中央。



4 輕輕下壓，使檢體均勻覆蓋於圓形培養區域。切勿扭轉或滑動壓板。

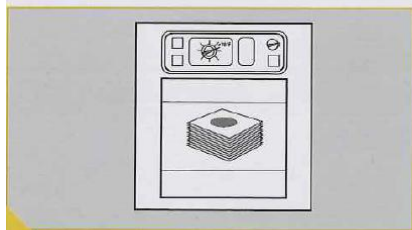


5 拿起壓板，靜置1分鐘使培養基凝固。

注意：

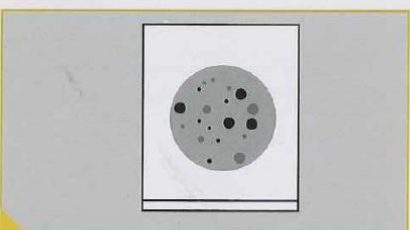
不要使用含有檸檬酸、亞硫酸氫鈉，或硫代硫酸鈉的稀釋劑在3M™ Petrifilm™ 快速總生菌數快檢片上，它們會抑制菌落的生長。若檸檬酸緩衝液被用來替代0.1% 蛋白胨水時，請加熱至40-50°C。

培養



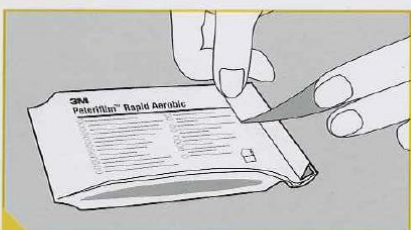
6 將快檢片的透明面朝上堆疊，置於35°C培養箱培養24小時，可堆疊至40片；若此標準方法用於檢驗乳製品時，快檢片最多可堆疊至20片。

判讀



7 可目視或使用菌落計數器計算菌落數，請參考菌落數計算之說明。

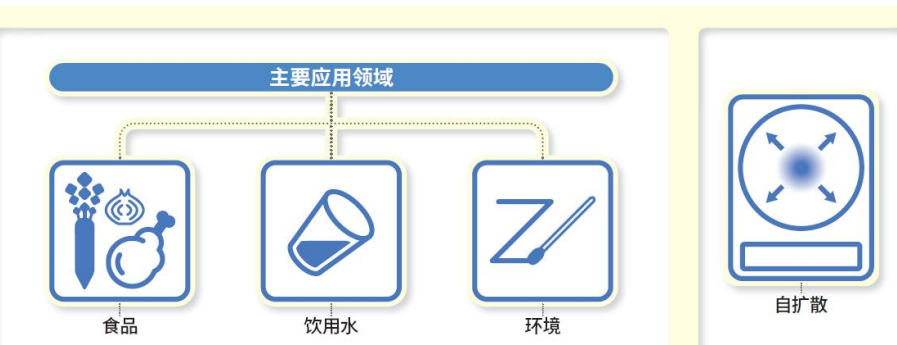
儲存



8 將已開封的快檢片包裝封口摺緊，並以膠帶封合。存放於20-25°C且濕度60%以下之乾燥箱，或放入夾鏈袋置於一般冰箱冷藏保存。

Nissui

●使用方法



菌落总数

CompactDry “Nissui” TC

AOAC / MicroVal / NordVal



培养温度
$35 \pm 2^{\circ}\text{C}$
培养时间
48 ± 3 小时
说明
所有菌落
● / ○

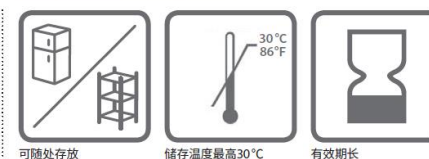


Compact

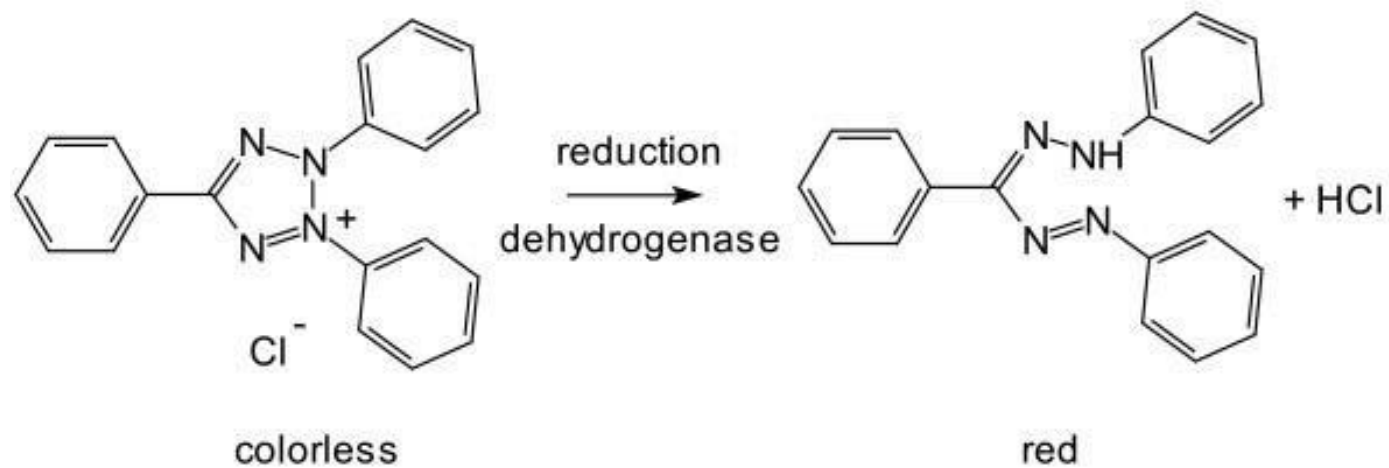
●无限次叠加



Dry

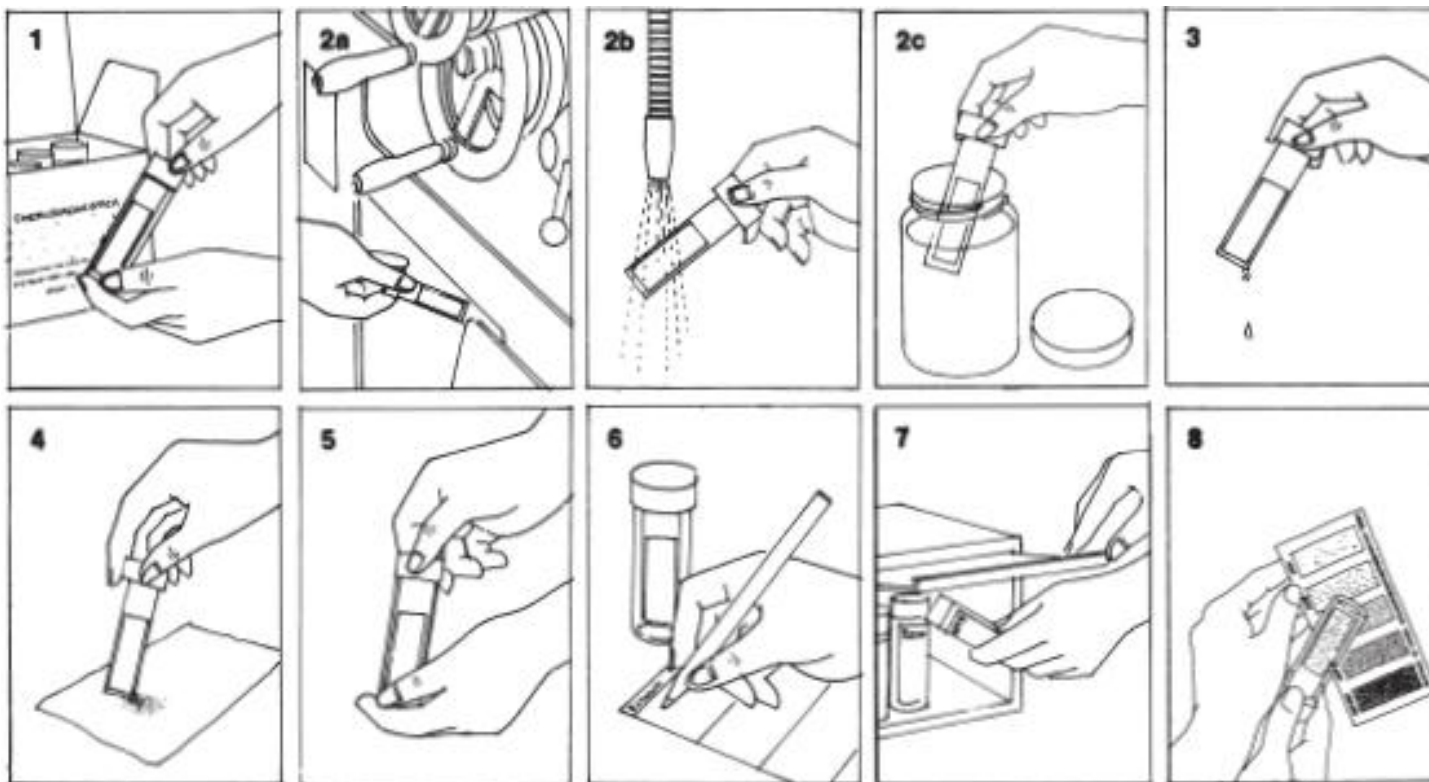


品质保证 日本生产

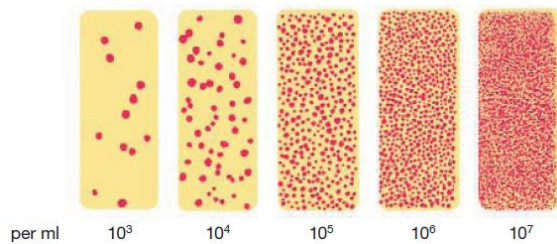


<https://alchetron.com/Formazan>

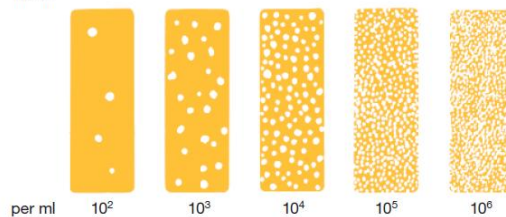
Merck: Cult-Dip combi



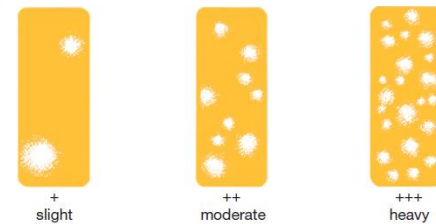
Total Bacteria Count Agar (TTC-Agar)
Bacteria



Potato Dextrose - Agar mod.
Yeast



Fungi

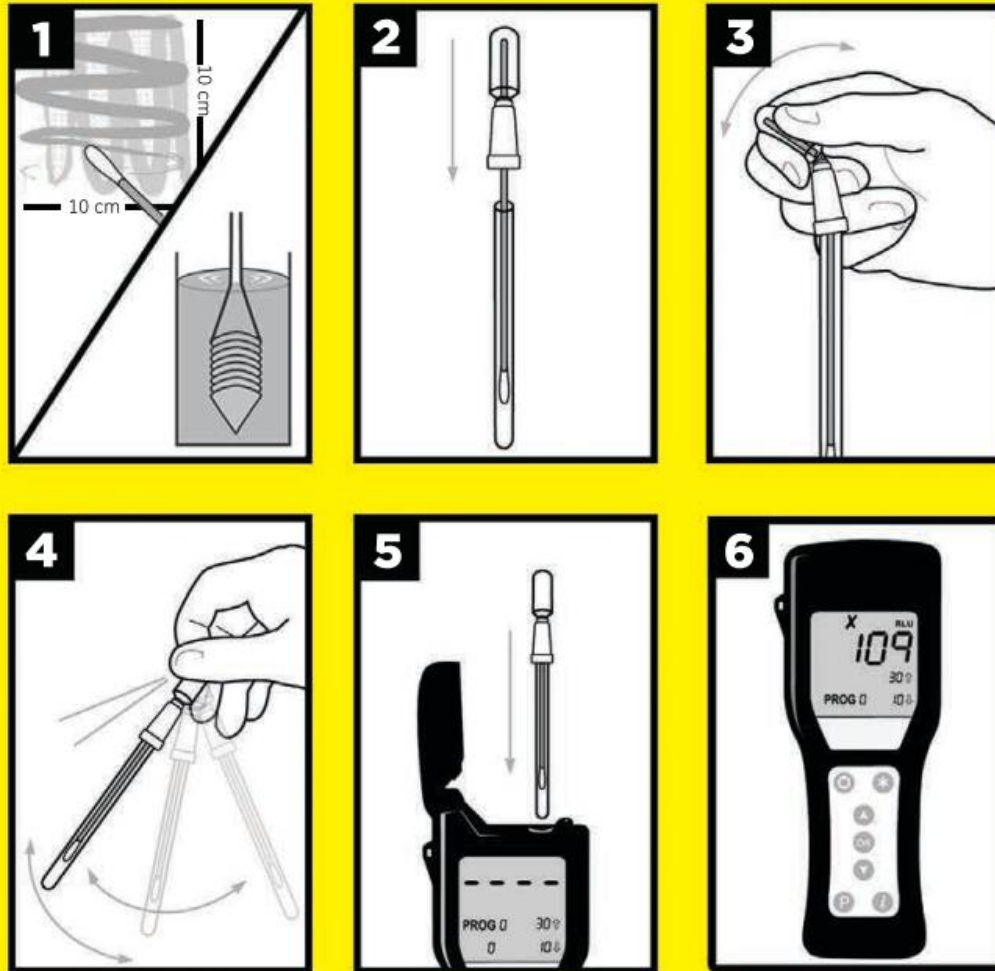


5. Hygiena SystemSURE Plus Hygiena Luminometer

Water ATP Test

- AquaSnap™ Total measures both **microbial ATP** (living cells and particulate matter) and Free ATP (non-microbial or dead cells) in solution. The device contains a detergent to release ATP that is bound to microbial or organic matter and inside microbes. AquaSnap is easy to use, economical and gives real-time results.
- The specifically designed dipper tip collects 100 µl of water ensuring consistent sample collection. Use AquaSnap Total in combination with [AquaSnap Free](#) to determine microbial ATP in a water sample.

ATP Testing Procedure



<https://www.hygiene.com/food-safety-solutions/atp-monitoring/systemsure-plus/>

有關微生物檢驗快篩片

- 世界各國尚未採取微生物檢驗快篩片為公定方法
- 食藥署於各建議檢驗方法均聲明 -- 如使用經確效認可之市售培養基，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。
- 應事先評估對其適用性，擔負其風險性。
- 結語

參考資料

1. 化粧品中微生物檢驗方法 109年7月28日第2次修正
2. BAM Chapter 23: Methods for Cosmetics, FDA, US
3. ISO 11930 Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product 2019
4. 中華藥典 第8版

謝謝

敬請指教