食品藥物研究年報. 12：87-96 2021
Ann. Rept. Food Drug Res. 12：87-96 2021

# 食品中大腸桿菌平板計數檢驗方法之評估

吳思靜　葉民煉　林詩菱　黃翠萍　林澤揚　高雅敏　曾素香　王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘　要

大腸桿菌為人類和其他溫血動物腸道中的正常菌種，常被作為監測飲用水、食品之衛生指標菌，如超過衛生標準限量，則表示食品遭受污染，食入受污染之產品可能引起腸胃道的不適，造成腹瀉、腹痛等症狀。大腸桿菌檢驗方法，衛生福利部已公告最確數計數法，惟因應產品輸銷歐盟之檢驗需求，尚需建立平板計數法。本研究目的旨在評估美國FDA/BAM (Bacteriological Analytical Manual)及ISO之大腸桿菌平板計數法，兩者皆是檢測大腸桿菌產生葡萄糖醛酸苷酶(*β*-glucuronidase)之特性，該酵素將培養基內含呈色原質4-甲基繖形酮-*β*-d-葡萄醣醛酸苷(4-methylumbelliferyl *β*-D-glucuronide, MUG)或5-溴-4-氯-3-吲哚-*β*-d-葡萄醣醛苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-*β*-d-glucuronide, BCIG)水解產生螢光物質4-甲基繖形酮(4-methylumbelliferone, 4-MU)或呈色物質5-溴-4-氯-3-吲哚(5-bromo-4-chloro-3-indolyl)，以計數平板培養基生長的典型菌落。經試驗後之靈敏度及專一性結果分別為：以不同血清型別的大腸桿菌54株進行靈敏度測試，其中只有1株O157為偽陰性；以氣單胞菌等非大腸桿菌46株進行專一性測試，其中有3株志賀氏桿菌為偽陽性。培養基經評估結果為：紫紅膽鹽乳糖瓊脂培養基/紫紅膽鹽乳糖瓊脂培養基-MUG (violet red bile lactose agar/violet red bile lactose agar-4-methylumbelliferyl *β*-D-glucuronide, VRBA/VRBA-MUG)及胰化蛋白腺-膽鹽-X-葡萄糖醛酸苷培養基(tryptone-bile X-glucuronide agar, TBX)培養基的菌數回收率均大於70%。以市售綜合果汁為基質進行大腸桿菌及混菌之添加試驗，結果大腸桿菌均與原添加菌數相當。另，抽樣檢驗市售產品20件進行大腸桿菌檢驗，其中TBX培養基共5件產品檢出大腸桿菌，而VRBA/VRBA-MUG培養基僅於1件產品檢出大腸桿菌。本評估方法結果作為修訂公告檢驗方法之依據。

**關鍵詞：大腸桿菌、平板計數法、葡萄糖醛酸苷酶、VRBA-MUG培養基、TBX培養基**

## 前　言

大腸桿菌(*Escherichia coli*)為兼性厭氧性的革蘭氏陰性桿菌，屬腸桿菌科成員之一，廣泛存在於人類和溫血動物腸道中，除了一些特殊血清型可以引起腹瀉外，大多為糞便常在菌。由於大腸桿菌在人和動物的糞便中含量很高且較少出現在其他環境下，因此大腸桿菌常被作為監測飲用水、食品之衛生指標菌，如超過衛生標準限量，則表示食品遭受污染，食入受污染之產品可能引起腸胃道的不適，造成腹瀉、腹痛等症狀。

研究文獻指出，約94-96%的大腸桿菌，以及少數的沙門氏桿菌(*Salmonella*)、志賀氏桿菌(*Shigella*)及耶爾辛氏菌(*Yersinia* spp.)產生*β*-D-葡萄醣醛酸苷酶(*β*-D-glucuronidase, GUD)

[1]。目前已知僅少數大腸桿菌[2]，包含大腸桿菌O157:H7不會產生GUD酵素[3]。常見檢測大腸桿菌的市售呈色培養基，即為檢測GUD酵素的活性，其活性之檢測是觀察不同受質分解後所產生的呈色和螢光，常見受質包括對硝苯酚-*β*-d-葡萄醣醛酸苷(p-nitrophenol-*β*-d-glucuronide, PNPG)或5-溴-4-氯-3-吲哚-*β*-d-葡萄醣醛苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-*β*-d-glucuronide, BCIG)，和4-甲基繖形酮-*β*-d-葡萄醣醛酸苷(4-methylumbelliferyl-*β*-d-glucuronide, MUG)。以MUG為例，MUG可被GUD水解產生4-甲基繖形酮(4-methylumbelliferone, 4-MU)，當以紫外光(365 nm)照射時，4-MU即會產生藍色螢光。因此，MUG已被加入不同培養液與培養基中[1]，透過觀察螢光的產生來偵測動物來源食品[4]、乳製品[5]等食品中是否存在大腸桿菌。然而，4-MU的螢光強度會受到所處環境pH值的影響，因此含有MUG之微生物培養基應為弱鹼性以便檢測螢光。另外，MUG可與其他培養基成分同時滅菌，以及不會對大腸桿菌生長造成抑制現象之優點，惟其缺點為螢光物質容易從菌落周圍迅速擴散至培養基中。目前市售常用於檢測大腸桿菌的選擇性呈色培養基為ISO 16649之胰化蛋白胨-膽鹽-X-葡萄糖醛酸苷培養基(Tryptone-bile X-glucuronide agar, TBX)，其於胰化蛋白胨膽鹽培養基(Tryptone-bile agar)中添加呈色物質BCIG，GUD酵素水解該呈色物質後，產生清晰且易觀察的藍綠色之大腸桿菌菌落[6]。

微生物定量檢驗方法共有兩種，其中一種為菌落數(Colony-forming units, CFU)之平板計數法(Colony-count technique)；另一種為最確數(Most Probable Number, MPN)計數法。CFU和MPN因為兩者使用之檢驗方法不同，檢驗結果代表的意義也不同[7]。平板計數法及最確數計數法之檢驗結果，平板計數法係直接計算菌落數，而最確數計數法則由查最確數表得知，其為統計學最可能之值。輸銷歐盟食品應符合Commission Regulation (EC) No 2073/2005食品微生物標準，而歐盟針對大腸桿菌採用平板計數法進行檢驗[8]，與我國目前採用最確數計數法[9]有所差異，因應產品輸銷歐盟之檢驗需求，尚需建立平板計數法。故，參照ISO (International Standard for Organization) 16649-2:2001[10]及美國FDA/BAM (Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual) chapter 4 Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria[11] 之方法，評估兩者檢驗方法之差異性，以作為我國修訂檢驗方法之參考。

## 材料與方法

### 一、實驗菌株

實驗菌株目標菌 *Escherichia coli* 54株，非目標菌*Aeromonas* spp. 4株、*Bacillus* spp. 4株、*Citrobacter freundii* 2株、*Cronobacter sakazakii* 2株、*Enterobacter* spp. 4株、*Escherichia hermannii* 1株、*Hafinia alvei* 1株、*Klebsiella* spp. 3株、*Kluyvera georgiana* 1株、*Listeria* spp. 2株、*Morganella morganri* 1株、*Proteus hauseri* 1株、*Pantoea dispersa* 1株、*Pseudomonas aeruginosa* 1株、*Salmonella* spp. 2株、*Serratia* spp. 3株、*Shigella* spp. 4株、*Staphylococcus* spp. 6株、*Vibrio* spp. 2株、*Yersinia enterocolitica* 1株，共46株。實驗菌株購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心或抽驗市售產品之分離純化菌株。

### 二、檢驗方法

㈠歐盟ISO 16649-2:2001之大腸桿菌平板計數法[10]吸取檢液1 mL，加入TBX培養基15 mL，混合均勻，待培養基凝固後，於44°C倒置培養18-24小時，選取15-150個藍綠色菌落之平板進行計數，檢驗結果為CFU/g (mL)。

㈡美國FDA/BAM Chapter 4之大腸桿菌平板計數法[11]

吸取檢液1 mL，加入紫紅膽鹽乳糖瓊脂培養基(Violet red bile lactose agar, VRBA) 10 mL，混合均勻，待培養基凝固後，再均勻覆蓋一層5 mL之VRBA-MUG，使培養基凝固形成VRBA/VRBA-MUG，於35°C倒置培養18-24小時，以365 nm UV光照射，選取25-250個典型菌落(紫紅色且具藍色螢光)之平板進行計數，檢驗結果為CFU/g (mL)。

## 三、靈敏度(Sensitivity)及專一性(Specificity)試驗

不同血清型之大腸桿菌及非大腸桿菌，分別進行靈敏度和專一性試驗。試驗流程：以無菌接種環鉤取增菌培養液10 μL (1 loop)，劃線培養於VRBA-MUG及TBX培養基，分別於35°C及44°C倒置培養18-24小時，觀察菌落型態，以判定試驗菌株是否有偽陰性及偽陽性。

## 四、培養基菌數回收率(Product Recovery, $P_R$)試驗

增菌培養液1 mL，加入9 mL之磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water, BPBW) 製備10、100、1000倍等系列稀釋檢液。吸取檢液1 mL並注入培養皿後，分別倒入VRBA/VRBA-MUG、TBX及TSA三種培養基，各培養基之稀釋檢液皆進行2重複試驗。混合均勻並待培養基凝固，分別將VRBA/VRBA-MUG、TBX及TSA培養基依相對應之方法進行培養。VRBA/VRBA-MUG及TSA於35°C倒置培養18-24小時；TBX於44°C倒置培養18-24小時，計算典型菌落數。VRBA/VRBA-MUG、TBX菌數除以TSA菌數，計算大腸桿菌呈色培養基之菌數回收率。

## 五、市售產品抽樣檢驗

參酌美國FDA/BAM之微生物分析方法確效指引(APPENDIX 5: Examples of Food Types and Associated Microbiological Contaminants)[12]，抽驗較易遭受大腸桿菌污染之市售產品共20件，分別依FDA/BAM及ISO 16649-2方法進行大腸桿菌之檢驗。固態檢體以均質機攪拌均勻，稱取檢體50 g，加入稀釋液450 mL，製備成10倍稀釋檢液，接著依序製備100、1000、10000倍等系列稀釋檢液。以平板計數法進行試驗，將各稀釋檢液分別吸取1 mL注入培養皿中(二重複)，並分別傾注三種不同培養基(VRBA/VRBA-MUG、TBX、PCA)，分別於35°C (VRBA/VRBA-MUG)及44°C (TBX)倒置培養18-24小時後計算典型菌落數。另以PCA作為對照組，於35°C倒置培養48小時，計算總生菌數。

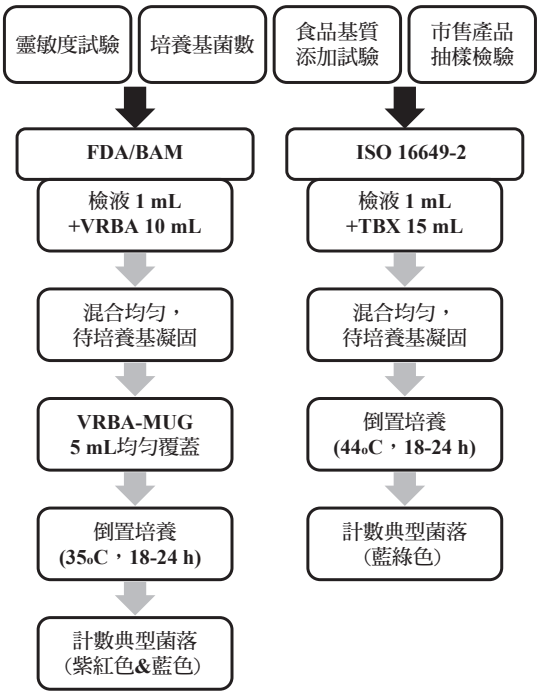
# 結果與討論

衛生福利部依食品安全衛生管理法第十七條訂定食品中微生物衛生標準，其中大腸桿菌限量為MPN/g (mL)，故依同法第三十八條訂定相對應之公告檢驗方法，衛生主管機關以MPN最確數計數法進行相關檢驗。目前歐盟採用平板計數法進行檢驗，我國因應產品輸銷歐盟之檢驗需求，尚需建立平板計數法。本研究參考FDA/BAM和ISO 16649-2之大腸桿菌平板計數法，進行靈敏度/專一性試驗、培養基菌數回收率試驗、食品基質添加試驗，另抽樣市售產品檢驗，以評估兩者檢驗方法，實驗架構如圖一。

## 一、大腸桿菌之靈敏度及專一性試驗

為評估大腸桿菌檢驗方法偽陰性及偽陽性，以VRBA-MUG及TBX培養基進行靈敏度和專一性試驗。

靈敏度試驗，以不同血清型大腸桿菌共54株，以四區劃線法劃線於VRBA-MUG和




**圖一、大腸桿菌平板計數法之實驗架構**

註：另以非大腸桿菌劃線培養於VRBA-MUG及TBX，評估專一性試驗(偽陽性)

TBX培養基進行檢測。結果顯示：只有血清型O157:H7呈現偽陰性，且兩種培養基之試驗結果一致，靈敏度為98.2%，偽陰性率為1.8%。另外，文獻指出超過95%大腸桿菌會產生GUD酵素，惟大腸桿菌血清型O157:H7例外，其GUD活性表現會受分解代謝產物阻遏作用之影響，因此即使攜帶產生GUD酵素之基因*uid A* (*gus A*)，其GUD表現仍可能呈現陰性[13,14]。

專一性試驗，以非大腸桿菌菌株共46株，亦以四區劃線法劃線於VRBA-MUG和TBX培養基進行檢測。結果顯示：*Shigella boydii* ATCC 9207、*Shigella boydii* BCRC 15957、*Shigella sonnei* BCRC 15965呈現偽陽性，且兩種培養基之試驗結果一致，專一性為93.5%，偽陽性率6.5%。文獻指出，大部分腸桿菌科不會產生GUD，除了部分的*Shigella*和*Salmonella*[1,15]，本次試驗結果亦顯示*Shigella* 3株會產生GUD，此與文獻敘述相符。

由前述結果得知，以VRBA-MUG和TBX培養基檢測大腸桿菌及非大腸桿菌，其靈敏度與專一性結果一致。

## 二、培養基菌數回收率之探討

為評估VRBA/VRBA-MUG及TBX之培養基效能，以大腸桿菌6株(BCRC 10675、ATCC 8739、BCRC 15375、1051900930001、1041901111005、1049021113002)，進行培養基菌數回收率試驗。結果顯示於圖二，培養基菌數回收率：BCRC 10675為100%和100%、ATCC 8739 為73%和78.4%、BCRC 15375為90.6%和93.8%、1051900930001為83.6%和83.6%、1041901111005為74%和85%、1049021113002 為79.3%和73.1%。VRBA/VRBA-MUG及TBX培養基的菌數回收率並無顯著差異，且均大於70%，符合培養基之性能標準[16]。

## 三、基質添加及混菌試驗之回收率探討

為了解非目標菌(雜菌)對於大腸桿菌檢測之影響，分別以無菌之TSB培養液和市售含有非目標菌之現打綜合果汁為基質，進行添加試驗，本試驗共設計二組試驗，且個別皆有實驗組與對照組，以評估不同培養基檢測不同食品基質之靈敏度。

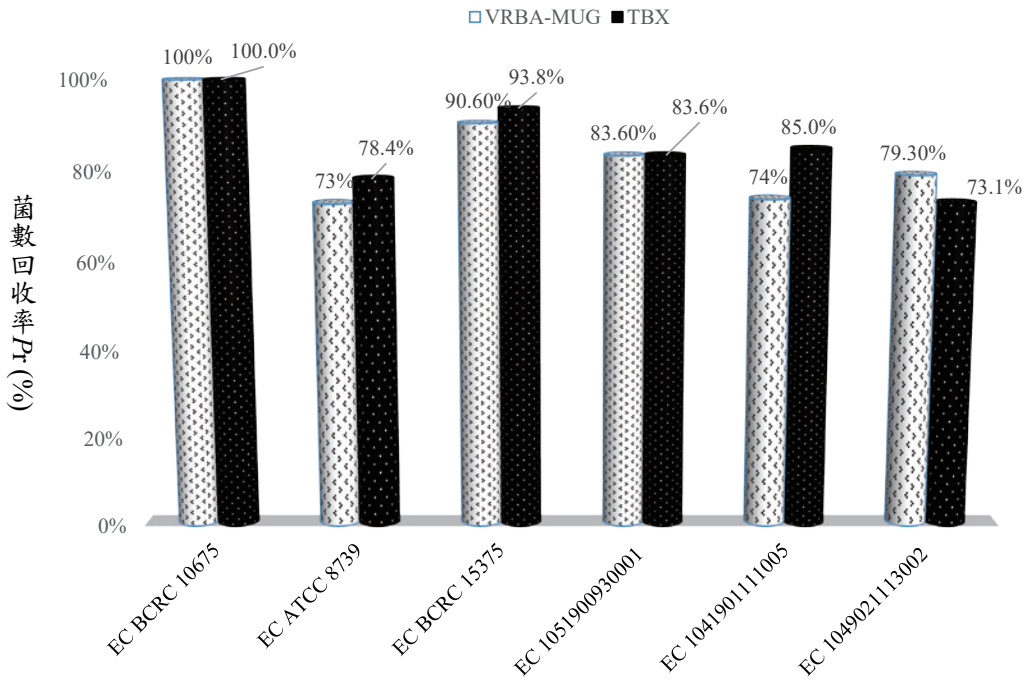
第一組以TSB培養液為基質進行試驗，A組-大腸桿菌(*Escherichia coli*)菌數為6.0 × $10^2$ CFU/mL，B組 - 非大腸桿菌之沙門氏桿菌(*Salmonella*)菌數為4.2 × $10^3$ CFU/mL，C組 - 非大腸桿菌之克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella pneumonia*)菌數為6.0 × $10^3$ CFU/mL，D組-大腸桿菌(*Escherichia coli*)及非大腸桿菌(*Salmonella*和*Klebsiella pneumonia*)以1:100的菌數比例(6.0 × $10^2$ CFU/mL：1.1 × $10^4$ CFU/mL)添加至基質中，以VRBA/VRBA-MUG和TBX培養基之平

板計數法檢測大腸桿菌之菌數，結果顯示：A組為5.8 × $10^2$ CFU/mL和5.5 × $10^2$ CFU/mL，菌數回收率分別為96.7%和91.7%、B及C組之兩種培養基皆未檢出大腸桿菌、D組為4.9 × $10^2$ CFU/mL和5.7 × $10^2$ CFU/mL，菌數回收率為81.7%和95% (表一)。另，TSB培養液中添加大腸桿菌，以VRBA/VRBA-MUG及TBX培養基檢出之菌數並無顯著差異，表示以VRBA/VRBA-MUG及TBX培養基皆可準確檢驗大腸桿菌之菌數。

第二組以市售綜合果汁為食品基質，檢測基質之生菌數及大腸桿菌，生菌數高達4.2 × $10^5$ CFU/mL，且未檢出大腸桿菌，作為空白對照組。為確認高菌數之非目標菌是否會影響大腸桿菌之檢出，設計添加不同菌數之大腸桿菌，A組添加2.5 × $10^2$ CFU/mL、B組添加2.5 × $10^4$ CFU/mL、C組添加2.5 × $10^5$ CFU/mL，使用VRBA/VRBA-MUG和TBX培養基進行平板計數法檢測大腸桿菌，菌數檢出結果：A組為2.0 × $10^2$ CFU/mL和1.9 × $10^2$ CFU/mL，菌數回收率為80%和76%、B組為2.0 × $10^4$ CFU/mL和2.4 × $10^4$ CFU/mL，菌數回收率為80%和96%、C組為2.4 × $10^5$ CFU/mL和2.1 × $10^5$ CFU/mL，菌數回收率為96%和84% (表二)。結果顯示，以含有高達$10^5$ CFU/mL生菌數之市售綜合果汁為食品基質，無論是添加低或高菌數之大腸桿菌，兩種培養基皆可以不受基質之生菌數影響而檢測出大腸桿菌，並且皆可正確檢測大腸桿菌之菌數。

## 四、市售產品抽樣檢驗大腸桿菌之探討

本研究依據BAM建議，抽驗易受大腸桿菌污染之市售產品共20件(肉類4件、禽類4件、海鮮類6件、蔬果類1件、乳製品1件、香辛料及調味料4件)，進行食品中大腸桿菌之檢驗。結果顯示(表三)，在瓜仔豬絞肉、地瓜三明治、鹽水雞心及雞腸、熟鵝腿肉的TBX培養基檢出大腸桿菌。另外，只有鹽水雞心在




圖二、培養基之菌數回收率(Product Recovery)試驗

表一、TSB培養液添加及混菌之試驗結果

| Treatment | *E. coli* bacteria added (CFU/mL) | Total number of bacteria added (*E. coli* + Non-*E.coli*) (CFU/mL) | Number of bacteria detected (CFU/mL) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TSA | VRBA/VRBA-MUG | | TBX | |
| | | | | Total | Typical | Total | Typical |
| *E. coli* | $6.0\times10^{2}$ | $6.0\times10^{2}$ | $5.8\times10^{2}$ | $5.8\times10^{2}$ | $5.8\times10^{2}$ | $5.5\times10^{2}$ | $5.5\times10^{2}$ |
| *Salmonella* | N.D.* | $4.2\times10^{3}$ | $4.0\times10^{3}$ | $3.8\times10^{3}$ | N.D. | $4.0\times10^{3}$ | N.D. |
| *K. pneumoniae* | N.D. | $6.0\times10^{3}$ | $5.6\times10^{3}$ | $4.9\times10^{3}$ | N.D. | $4.6\times10^{3}$ | N.D. |
| *E. coli* + *Salmonella* + *S. aureus*) | $6.0\times10^{2}$ | $1.1\times10^{4}$ | $1.0\times10^{4}$ | $1.0\times10^{4}$ | $4.9\times10^{2}$ | $8.7\times10^{3}$ | $5.7\times10^{2}$ |
| Blank | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

[1.] *E. coli*: *Escherichia coli*; TSA: Tryptone soy agar; VRBA/VRBA-MUG: Violet red bile lactose agar/Violet red bile lactose agar-MUG; TBX: Tryptone bile X-glucuronide agar; N.D: not detected

[2.] N.D.*: < 1 CFU/mL

表二、食品基質(綜合果汁)添加及混菌之試驗結果

| Treatment | *E. coli* bacteria added (CFU/mL) | Number of bacteria detected (CFU/mL) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PCA | VRBA/VRBA-MUG | | TBX | |
| | | | Total | Typical | Total | Typical |
| Blank | N.D.* | $4.2\times10^{5}$ | $5.7\times10^{4}$ | N.D. | $3.3\times10^{3}$ | N.D. |
| Add experiment-1 (*E. coli* + Blank) | $2.5\times10^{2}$ | $3.8\times10^{5}$ | $7.1\times10^{4}$ | $2.0\times10^{2}$ | $5.5\times10^{3}$ | $1.9\times10^{2}$ |
| Add experiment-2 (*E. coli* + Blank) | $2.5\times10^{4}$ | $5.2\times10^{5}$ | $7.3\times10^{4}$ | $2.0\times10^{4}$ | $2.8\times10^{4}$ | $2.4\times10^{4}$ |
| Add experiment-3 (*E. coli* + Blank) | $2.5\times10^{5}$ | $7.2\times10^{5}$ | $2.8\times10^{5}$ | $2.4\times10^{5}$ | $2.1\times10^{5}$ | $2.1\times10^{5}$ |

[1.] *E. coli*: *Escherichia coli*; PCA: Plate count agar; VRBA/VRBA-MUG: Violet red bile lactose agar/Violet red bile lactose agar-MUG; TBX: Tryptone bile X-glucuronide agar; N.D: not detected

[2.] N.D.*: < 1 CFU/mL

表三、抽驗市售產品大腸桿菌之檢驗結果

| Product Name | PCA (CFU/mL(g)) | VRBA/VRBA-MUG (CFU/mL(g)) | | TBX (CFU/mL(g)) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Total | Typical (*E. coli*) | Total | Typical (*E. coli*) |
| 瓜仔豬絞肉 | $8.5\times10^{6}$ | $7.3\times10^{5}$ | N.D.* | $8.7\times10^{3}$ | 10 |
| 手工豬肉水餃 | $8.1\times10^{7}$ | $4.7\times10^{6}$ | N.D. | $7.0\times10^{3}$ | N.D. |
| 雞腿肉 | $1.4\times10^{8}$ | $4.7\times10^{7}$ | N.D. | $1.8\times10^{5}$ | N.D. |
| 豬肉 | $8.0\times10^{6}$ | $2.6\times10^{6}$ | N.D. | $1.9\times10^{4}$ | N.D. |
| 牛肉 | $2.5\times10^{6}$ | $5.9\times10^{4}$ | N.D. | $4.1\times10^{2}$ | N.D. |
| 鮭魚 | $4.0\times10^{7}$ | $4.4\times10^{5}$ | N.D. | $3.5\times10^{5}$ | N.D. |
| 全脂鮮奶** | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 麻醬涼麵 | $1.8\times10^{7}$ | $2.4\times10^{5}$ | N.D. | $1.9\times10^{4}$ | N.D. |
| 地瓜三明治 | $1.0\times10^{6}$ | $1.5\times10^{6}$ | N.D. | $1.1\times10^{4}$ | 20 |
| 鹽水雞心 | $2.3\times10^{6}$ | $5.0\times10^{5}$ | 65 | $3.6\times10^{4}$ | 240 |
| 鹽水雞腸 | $3.9\times10^{6}$ | $6.0\times10^{5}$ | N.D. | $2.8\times10^{5}$ | 180 |
| 熟鵝腿肉 | $2.6\times10^{6}$ | $1.4\times10^{5}$ | N.D. | $5.9\times10^{4}$ | 40 |
| 綜合水果汁** | $4.2\times10^{5}$ | $5.7\times10^{4}$ | N.D. | $3.3\times10^{3}$ | N.D. |
| 鮭魚生魚片 | $1.0\times10^{4}$ | $4.7\times10^{2}$ | N.D. | $2.5\times10^{1}$ | N.D. |
| 白蝦仁 | $1.3\times10^{4}$ | $1.8\times10^{4}$ | N.D. | $1.1\times10^{2}$ | N.D. |
| 吻仔魚 | $1.4\times10^{5}$ | $1.1\times10^{5}$ | N.D. | $1.0\times10^{2}$ | N.D. |
| 鮮蚵 | $4.2\times10^{6}$ | $1.1\times10^{5}$ | N.D. | $7.5\times10^{3}$ | N.D. |
| 冰品 | $5.6\times10^{3}$ | $2.5\times10^{1}$ | N.D. | $1.5\times10^{1}$ | N.D. |
| 熟文蛤肉 | $1.1\times10^{4}$ | $1.8\times10^{2}$ | N.D. | $1.4\times10^{2}$ | N.D. |
| 雞肉鮮蔬沙拉 | $3.0\times10^{2}$ | $2.4\times10^{2}$ | N.D. | N.D.* | N.D. |

1. *E. coli*: *Escherichia coli*; PCA: Plate count agar; VRBA/VRBA-MUG: Violet red bile lactose agar/Violet red bile lactose agar--MUG; TBX: Tryptone bile X-glucuronide agar; N.D: not detected
2. N.D.*: < 10 CFU/mL (Solid sample)
3. **: N.D. < 1 CFU/mL (Liquid sample)

VRBA/VRBA-MUG及TBX培養基皆檢出大腸桿菌，但VRBA/VRBA-MUG培養基的檢出情形低於TBX培養基。各檢體檢驗結果：瓜仔豬絞肉於TBX培養基的檢驗值為10 CFU/g、地瓜三明治於TBX培養基的檢驗值為20 CFU/g、鹽水雞心於TBX和VRBA/VRBA-MUG培養基的檢驗值分別為240 CFU/g及65 CFU/g、鹽水雞腸於TBX培養基的檢驗值為180 CFU/g、熟鵝腿肉於TBX培養基的檢驗值為40 CFU/g，其餘15件檢體於TBX及VRBA/VRBA-MUG培養基均未檢出大腸桿菌。進一步，鉤取TBX培養基上生長的大腸桿菌典型菌落，純化分離培養於VRBA-MUG及TSA培養基，並以MALDI-TOF及Vitek鑑定菌種，鑑定結果確為大腸桿菌。另VRBA/VRBA-MUG培養基上生長的雜菌(非目標菌)，明顯高於TBX培養基，兩者檢出之菌數有明顯之差異，顯示使用較高培養溫度(44°C)的TBX培養基應較使用一般細菌生長溫度(35°C)的VRBA/VRBA-MUG培養基，更能抑制部分雜菌之生長。另外，推測當食品基質之

非目標微生物菌數太高，大腸桿菌之生長會受到抑制或競爭，增加大腸桿菌檢測之困難度。因此，推論使用TBX培養基且置於44ºC培養可初步減少非目標微生物之干擾，更有利於大腸桿菌的檢出。

## 結　論

本研究結果顯示，以FDA/BAM及ISO 16649-2之大腸桿菌檢驗方法同步檢測大腸桿菌，兩種檢驗方法於專一性試驗(偽陰性)、靈敏度試驗(偽陽性)、培養基菌數回收率試驗、基質添加及混菌試驗的試驗結果皆無顯著差異。檢測市售產品時，VRBA/VRBA-MUG培養基生長之雜菌(非目標菌)菌數明顯高於TBX培養基，且TBX培養基之檢出大腸桿菌率略高於VRBA/VRBA-MUG培養基。由於ISO方法較易觀察典型菌落及檢測大腸桿菌，且不須使用紫外燈進行檢測，可簡化實驗操作步驟。另，ISO方法用於檢驗抽樣市售產品時，TBX培養基生長的雜菌較少，如此大腸桿菌較易被檢出，及較易鉤取分離純化菌株以進行後續相關研究。因此，將以ISO 16649-2作為修訂大腸桿菌平板計數法之依據。

## 參考文獻

1. Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. Int. J. Food Microbiol. 31(1-3): 45-58.
2. Rice, E. W., Allen, M. J., Brenner, D. J. and Edberg, S. C. 1991. Assay for beta-glucuronidase in species of the genus Escherichia and its applications for drinking-water analysis. Appl. Environ. Microbiol. 57(2): 592-593.
3. Frampton, E. W. and Restaino, L. 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. J. Appl. Microbiol. 74(3): 223-233.
4. Bredie, W. L. P. and De Boer, E. 1992. Evaluation of the MPN, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 16(3): 197-208.
5. Hahn, G. and Wittrock, E. 1991. Comparison of chromogenic and fluorogenic substances for differentiation of coliforms and *Escherichia coli* in soft cheese. Acta Microbiol Hung. 38(3-4): 265-271.
6. Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int. J. Food Microbiol. 60(2-3): 205-218.
7. 臺美檢驗科技股份有限公司。2019。CFU 與 MPN 的差異比較。[https://www.superlab.com.tw/cfu-mpn/]。
8. European Commission. 2020. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off. J. Eur. Union L. 338: 10-27.
9. 衛生福利部。2013。食品微生物之檢驗方法－大腸桿菌之檢驗(MOHWM0023.01)。102.12.20部授食字第1021951163號公告修正。
10. International Standard for Organization. 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*-Part 2: Colony-count technique at 44oC using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. ISO 16649-2.
11. U.S. Food and Drug Administration. 2020. Bacteriological analytical manual Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the

Coliform Bacteria. [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria].

12. U.S. Food and Drug Administration. 2019. Bacteriological analytical manual Appendix 3: Guidelines for the validation of analytical methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds. [https://www.fda.gov/media/83812/download].
13. Doyle, M. P. and Schoeni, J. L. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from retail fresh meats and poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53(10): 2394-2396.
14. Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157: H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. Emerging Infect. Dis. 1(2): 47.
15. Feng, P. C. and Hartman, P. A. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43(6): 1320-1329.
16. International Standard for Organization. 2014. Microbiology of food, animal feed and water-Preparation, production, storage and performance testing of culture media. ISO 11133.

# Evaluation of Test Methods for Colony-Count Technique of *Escherichia Coli* in Food

SZU-CHING WU, MIN-LIEN YEH, SHIH-LING LIN, TSUI-PING HUANG, CHE-YANG LIN, YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

## ABSTRACT

*Escherichia coli* (*E. coli*) is widely distributed in the intestines of humans and warm-blooded animals. It is often used as a sanitary indicator for monitoring the quality of drinking water and food. The presence of *E. coli* is a strong indication of animal waste contamination. Consumption of contaminated products may cause gastrointestinal discomfort, diarrhea, abdominal pain and other symptoms. The traditional most probable number (MPN) method for *E. coli* count is an announced official method in Taiwan. However, in response to the inspection needs of products exported to the European Union, a plate count method is required. Therefore, this study aimed on the evaluation of two *E. coli* plate count methods including the US Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual (FDA/BAM) and International Standard for Organization (ISO). Both methods were associated to the detection of *β*-glucuronidase activity from *E. coli*. The enzyme hydrolyzed 4-methylumbelliferyl *β*-D-glucuronide (MUG) or 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-*β*-D-glucuronide (BCIG) in the culture media, and produced fluorogenic (4-methylumbelliferone) or coloring (5-bromo-4-chloro-3-indolyl) substance making colonies visible. The sensitivity and specificity test results were as follows: the sensitivity test for 54 strains of different serotypes of *E. coli*, of which only one strain of O157 showed false negative. Forty-six strains of non-*E. coli* bacteria, such as Aeromonas were tested for specificity, among those 3 strains of *Shigella* showed false positive. The recovery tests in two culture media including violet red bile lactose agar/violet red bile lactose agar-4-methylumbelliferyl *β*-D-glucuronide (VRBA/VRBA-MUG) and tryptone-bile X-glucuronide (TBX) agar medium, showed higher than 70%. An additional test in fruit juice matrix inoculated with *E coli* and mixed bacteria was carried out, and the results showed that the amount of *E. coli* was equivalent to the original inoculation. A survey consisted of 20 commercial products were applied for *E. coli* determination. The results showed that *E. coli* was detected in TBX and VRBA-MUG media from 5 products and 1 product, respectively. The evaluation data in this study would be used as reference for revising the current official method.

Key words: *Escherichia coli*, plate count method, *β*-glucuronidase, VRBA-MUG, TBX