

食品微生物之檢驗方法—生菌數之檢驗修正總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰修正「食品微生物之檢驗方法—生菌數之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正英文名稱、「器具及材料」、「檢液之調製」、「生菌之培養」、「生菌之計算」、「附表」及檢驗流程圖之內容文字。
- 二、增列參考文獻。
- 三、增修訂部分文字。

食品微生物之檢驗方法－生菌數之檢驗修正對照表

修正名稱	現行名稱	說明
食品微生物之檢驗方法－生菌數之檢驗 Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Aerobic Plate Count	食品微生物之檢驗方法－生菌數之檢驗 Methods of Test for Food Microorganisms - Test of <u>Standard Plate Count (Aerobic Plate Count)</u>	修正英文名稱。
修正規定	現行規定	說明
1. 適用範圍：本方法適用於食品中生菌數之檢驗。 2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以平板計數培養基培養及計數之方法。 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為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： <u>能維持內部溫度在170±10°C者。</u> 2.2.2. 高壓滅菌釜： <u>可達121°C以上者。</u> 2.2.3. 冰箱：能維持5±3°C者。 2.2.4. 培養箱：能維持內部溫度溫差±1°C以內者。 2.2.5. 水浴：能維持水溫溫差±1°C以內者。 2.2.6. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。 2.2.7. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到 <u>100 g</u> ，靈敏度為 <u>1 mg</u> 。 2.2.8. 旋渦混合器。 2.2.9. 酸鹼度測定儀。 2.2.10. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。 2.2.11. 吸管輔助器。 2.2.12. 吸管：已滅菌， <u>1 mL</u> 吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL之 <u>刻度。</u>	1. 適用範圍：本方法適用於食品中生菌數之檢驗。 2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以平板計數培養基培養及計數之方法。 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為100呎燭光 <u>以上</u> ，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. 冰箱：能維持5±3°C者。 2.2.4. 培養箱：能維持內部溫度溫差± <u>1.0°C</u> 以內者。 2.2.5. 水浴：能維持水溫溫差± <u>1.0°C</u> 以內者。 2.2.6. 攪拌均質器(<u>Blender</u>)或鐵胃(<u>Stomacher</u>)：能適用於無菌操作者。 2.2.7. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到 <u>120 g</u> ，靈敏度為 <u>5 mg</u> 。 2.2.8. 旋渦混合器(<u>Vortex mixer</u>)。 2.2.9. 酸鹼度測定儀(<u>pH meter</u>)。 2.2.10. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。 2.2.11. 吸管輔助器(<u>Pipette aid</u>)。 2.2.12. 吸管(<u>Pipette</u>)：已滅菌， <u>1 mL</u> 吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL刻度。 2.2.13. 培養皿：已滅菌，內徑約90	一、修正「器具及材料」、「檢液之調製」、「生菌之培養」、「生菌之計算」、「附表」及檢驗流程圖之內容文字。 二、增列參考文獻。 三、增修訂部分文字。

2.2.13. 培養皿：已滅菌，內徑約90 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。

2.2.14. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。

2.2.15. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。

2.2.16. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、氫氧化鈉、葡萄糖(glucose)及聚山梨醇酯80(polysorbate 80, Tween 80)均採用試藥級；蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、酵母抽出物(yeast extract)及洋菜(agar)均採用微生物級。

2.2.17. 1N氫氧化鈉溶液之配製
取氫氧化鈉4 g，加入無菌水溶解使成100 mL。

2.2.18. 稀釋液之配製

2.2.18.1. 生理食鹽水

取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘。

2.2.18.2. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)

取磷酸二氫鉀34 g，溶於蒸餾水500 mL，以1N氫氧化鈉溶液調整pH值至7.2，再加蒸餾水使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，作為原液，冷藏備用。使用時，取原液1.25 mL，加入蒸餾水使成1000 mL，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘。

2.2.18.3. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% Peptone diluent)

取蛋白胨1 g，溶於蒸餾水1000 mL，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0 ± 0.2。

2.2.19. 平板計數培養基(Plate count agar, PCA)

胰化蛋白胨(tryptone)	5 g
酵母抽出物(yeast)	2.5 g

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。

2.2.14. 稀釋用容器：無菌袋或有1000 mL、500 mL、99 mL及90 mL標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。

2.2.15. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。

2.2.16. pH試紙：範圍6-8。

2.2.17. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、氫氧化鈉、葡萄糖(glucose)及油酸聚醇山梨酯(polysorbate 80, Tween 80)均採用試藥級；蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、酵母抽出物(yeast extract)及洋菜(agar)均採用微生物級。

2.2.18. 1N氫氧化鈉溶液之配製：
稱取氫氧化鈉4 g，加入無菌水溶解使成100 mL。

2.2.19. 稀釋液之配製：

2.2.19.1. 生理食鹽水：

取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL中，分裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘。

2.2.19.2. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)：

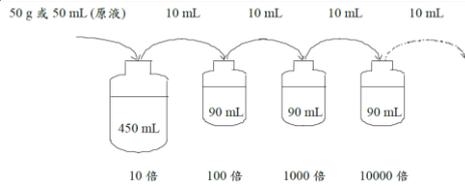
取磷酸二氫鉀34 g，溶於蒸餾水500 mL，以1N氫氧化鈉溶液調整pH值為7.2，再加蒸餾水使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，貯存於冰箱中，作為原液。使用時，取原液1.25 mL，加入蒸餾水使成1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以121°C滅菌15分鐘。

2.2.19.3. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% peptone diluent)：

取蛋白胨1 g，溶於蒸餾水使成1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0 ± 0.1。

2.2.20. 平板計數培養基(Plate count agar, PCA)，亦稱標準方法培

extract)		養基(Standard method agar)	
葡萄糖(glucose)	1 g	胰化蛋白胨(tryptone)	5 g
洋菜(agar)	15 g	酵母抽出物(yeast extract)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL	葡萄糖(glucose)	1 g
<p>加熱溶解後，分裝於適當之容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0 ± 0.2。</p> <p>2.3. 檢液之調製^(註1-3)</p> <p>2.3.1. 固態檢體：將檢體切碎、混勻後，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。</p> <p>2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎、混勻後，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。</p> <p>2.3.3. 液態檢體：將檢體混勻後，取50 mL，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。</p> <p>2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚肉、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如2~5°C，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(如45°C以下之水浴，15分鐘內可解凍者)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎、混勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應先使成適當小塊，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。</p> <p>2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等檢體，經適當攪拌混勻後，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。</p> <p>2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液10 mL，加至稀釋液90 mL中，依序作成一系列適當之100倍、1000倍、10000倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。</p>	洋菜(agar)	15 g	
	蒸餾水	1000 mL	<p>加熱溶解後，分裝於適當之容器中，經121°C滅菌15分鐘，最後pH值為7.0 ± 0.2。</p> <p>2.3. 檢液之調製</p> <p>2.3.1. 固態檢體：將檢體切碎混合均勻後，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。</p> <p>2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：以已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎後，混合均勻，取50 g，以下步驟同2.3.1.節之操作。</p> <p>2.3.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取50 mL，作為原液，以下步驟同2.3.1.節之操作。</p> <p>2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如2~5°C，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(置於45°C以下之水浴中，可在15分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依2.3.1.節，製成10倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於-20°C。</p> <p>2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等，經攪拌均勻後，取50 g，以下步驟同2.3.1.節之操作。</p> <p>2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液10 mL加至稀釋液90 mL中，依序作成100倍、1000倍、10000倍等一系</p>
	葡萄糖(glucose)	1 g	
	洋菜(agar)	15 g	



註1：除肉製品使用0.1%蛋白胰稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液，其次為生理食鹽水。

註2：處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。

註3：檢體總量不足50 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成10倍稀釋檢液。

2.4. 生菌之培養

2.4.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分振搖，混合均勻。

2.4.2. 吸取各稀釋檢液及(或)原液1 mL，分別置入培養皿，各檢液至少做二重複(二片平板)。

2.4.3. 另吸取稀釋液1 mL，置入培養皿，作為空白對照組(二重複)。

2.4.4. 於2.4.2.節及2.4.3.節之各培養皿中倒入冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 之PCA培養基12~15 mL，搖動混勻，自檢液之調製至此步驟應於15分鐘內完成。

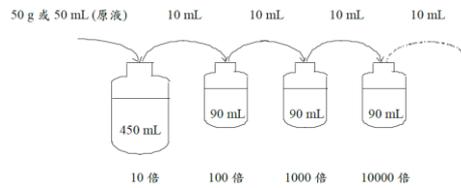
2.4.5. 將2.4.4.節之PCA培養基靜置，待培養基凝固後，倒置於 35°C 培養48 \pm 2小時。

2.5. 生菌數之計算

2.5.1. 經培養後，選取25~250個菌落之二片平板予以計數，其生菌數之單位表示方式為CFU/g或CFU/mL，且生菌數結果表示時應將該數字第三位數字四捨六入(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)，使其有效數為兩位。

2.5.2. 若各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數平板之菌落數為25~250個，則應以該稀釋倍數之二片平板之菌落數平均值乘其稀釋倍數，即

列稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



註：1. 除肉製品使用0.1%蛋白胰稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液，其次為生理食鹽水。

2. 檢體總量不足50 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成10倍稀釋檢液。

3. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。

2.4. 生菌之培養

2.4.1. 將稀釋檢液及(或)原液充分振搖，混合均勻。

2.4.2. 各吸取各稀釋檢液及(或)原液1 mL分別置入培養皿中，各檢液至少做二重複。

2.4.3. 另吸取稀釋液1 mL置入培養皿中，作為空白對照組(二重複)。

2.4.4. 2.4.2.節及2.4.3.節之各培養皿中倒入冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 之平板計數培養基(PCA) 12~15 mL，搖動混合，自檢液之調製至此步驟應於15分鐘內完成。

2.4.5. 將2.4.4.節之培養基平板靜置，待培養基凝固後，倒置於 35°C 培養48 \pm 2小時。

2.5. 生菌之計算

2.5.1. 經培養後，選取25~250個菌落之兩個平板來計數，其生菌數之表示方式為CFU/g或CFU/mL。

2.5.2. 若各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數平板之菌落數為25~250個，則應以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(附表：樣品編號1)；但

得其生菌數(附表：樣品編號1)；但若有二稀釋倍數平板之菌落數在25~250個之間時，則應依下列公式計算之(附表：樣品編號2)。

$$\text{生菌數(CFU/g或CFU/mL)} = \left[\left(\frac{Aa + Ab}{2} \right) \times A + \left(\frac{Ba + Bb}{2} \right) \times B \right] \times \frac{1}{2}$$

Aa、Ab：A稀釋倍數各平板之菌落數

Ba、Bb：B稀釋倍數各平板之菌落數

A、B：稀釋倍數

2.5.3. 若各稀釋倍數之菌落數均小於25個時，則以最低稀釋倍數之二片平板之菌落數平均值乘其稀釋倍數，並註明其為估計值(附表：樣品編號3)。

2.5.4. 若平板之菌落數大於250個時，則先計數平板中菌落分布具代表性之一部份，再計算其生菌數，並註明其為估計值(附表：樣品編號4)。

2.5.5. 若平板內產生擴散菌落^(註4)，則以下述方式計數：

2.5.5.1. 若擴散菌落所覆蓋面積(包括被擴散菌落造成之抑制生長範圍)超過整個平板面積之1/2時或被擴散菌落造成之抑制生長範圍超過1/4時，應不予計數，並註明其為“擴散菌落”(附表：樣品編號5)。

2.5.5.2. 若擴散菌落形成鏈狀時，若僅一條則應視為一個菌落，若有兩條以上存在時，應視其鏈源處之不同，分別計數之。若為彼此分開而形成大菌落時，亦應予以計數。

註4：擴散菌落可分為3種形式：

(1)鏈狀菌落，不能明顯分離，似由一堆細菌分裂生長而成。

(2)細菌生長於培養基及培養皿底部間之一層水氣中。

(3)細菌生長於培養基邊緣或表面上之一層水氣上。

2.5.6. 若各稀釋倍數均無菌落生長者，則生菌數應小於1乘以最低

若有兩種稀釋倍數之平板之菌落數在25~250個之間時，則應依下列公式計算之，但生菌數結果表示時應將該數字第三位數字四捨六入(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)，使其有效數為兩位(附表：樣品編號2)。

$$\text{生菌數(CFU/g或CFU/mL)} = \left[\left(\frac{Aa + Ab}{2} \right) \times A + \left(\frac{Ba + Bb}{2} \right) \times B \right] \times \frac{1}{2}$$

Aa、Ab：A稀釋倍數各平板內之菌落數。

Ba、Bb：B稀釋倍數各平板內之菌落數。

A、B：稀釋倍數。

2.5.3. 各稀釋倍數之菌落數均小於25個時，則以最低稀釋倍數之兩個平板菌落數平均值乘其稀釋倍數，並註明其為估計值(附表：樣品編號3)。

2.5.4. 平板中菌落數大於250個時，則先計數平板中菌落分佈其代表性之一部份，再計算生菌數，而以估計值表示(附表：樣品編號4)。

2.5.5. 擴散菌落，擴散菌落可分為3種形式：

(1)鏈狀菌落，不能明顯分離，似乎由一堆細菌分裂生長而成。

(2)細菌生長介於培養基及培養皿底部間之一層水氣中。

(3)細菌生長於培養基邊緣或表面上之一層水氣上。

2.5.5.1. 平板內產生擴散菌落時應以下述之方法計數。(附表：樣品編號5)擴散菌落所覆蓋面積(包括被擴散菌落造成之抑制生長範圍)超過整個平板面積之1/2時或者被擴散菌落造成之抑制生長範圍超過1/4時，應不予計數，而記錄為“擴散菌落”。

2.5.5.2. 擴散菌落形成鏈狀時，若僅一條則應視為一個菌落，若有兩條以上存在時，應視其鏈源處之不

稀釋倍數，並註明其為估計值(附表：樣品編號6)。

2.5.7. 若二片平板之菌落數，其中一片在25~250個之間，另一片大於250個時，兩者均應計數(附表：樣品編號7)。

2.5.8. 若二稀釋倍數之菌落數，各有一片在25~250個之間，另一片大於250個或小於25個時，四片皆計數，並依2.5.2.節公式計算之(附表：樣品編號8)。

2.5.9. 若二稀釋倍數之菌落數，其中一稀釋倍數之二片平板之菌落數均在25~250之間，另一稀釋倍數之二片平板之菌落數，一片在25~250之間，另一片大於250個或小於25個時，四片皆計數，並依2.5.2.節公式計算之(附表：樣品編號9及10)。

2.5.10. 若確證被污染者或依其他理由認為不適當者，應不得計算之。

附註：可參考使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以本檢驗方法為準。

參考文獻：

Maturin, L. and Peeler, J. T. 2001. Chapter 3 Aerobic plate count. Bacteriological Analytical Manual. [<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>].

同，分別計數之。若為彼此分開而形成大菌落時，亦應予以計數。

2.5.6. 各稀釋倍數均無菌落生長者，則生菌數應小於1乘以最低稀釋倍數並註明估計值(附表：樣品編號6)。

2.5.7. 若二重複平板之菌落數，其中一片在25~250個之間，另一片大於250個時，兩者均應計數(附表：樣品編號7)。

2.5.8. 若二稀釋倍數之菌落數，各有一片在25~250個之間，另一片大於250個或小於25個時，四片皆計數，並依2.5.2.節公式計算之(附表：樣品編號8)。

2.5.9. 當二稀釋倍數之菌落數，其中一稀釋倍數之2重複平板之菌落數均在25~250之間，另一稀釋倍數之2重複平板之菌落數，一片在25~250之間，另一片大於250個或小於25個時，四片皆計數，並依公式計算之(附表：樣品編號9及10)。

2.5.10. 確證被污染者或依其他理由認為不適當者，應不得計算之。附表、生菌數計算舉例說明(2平板/稀釋倍數)

樣品編號	菌落數			CFU/g ^(*)	計算依據
	1: 100	1: 1000	1: 10000		
1	TNTC ^(b)	175 ^(c)	16	190000	2.5.2
	TNTC	208	17		
2	TNTC	224	25	250000	2.5.2
	TNTC	245	30		
3	18	2	0	1600*	2.5.3
	14	0	0		
4	TNTC	TNTC	523	5100000*	2.5.4
	TNTC	TNTC	487		
5	TNTC	245	35	290000	2.5.5
	TNTC	230	擴散菌落		
6	0	0	0	<100*	2.5.6
	0	0	0		
7	TNTC	245	23	260000	2.5.7
	TNTC	278	20		
8	TNTC	225	21	270000	2.5.8
	TNTC	255	40		
9	TNTC	210	18	230000	2.5.9
	TNTC	240	28		
10	TNTC	260	30	270000	2.5.9
	TNTC	230	28		

(*) 星號(*)表示估計值。

(b) TNTC：菌落太多無法計數，菌落數明顯地多於250。

(c) 劃有底線的數字表示用於計數。

附表、生菌數計算之舉例說明

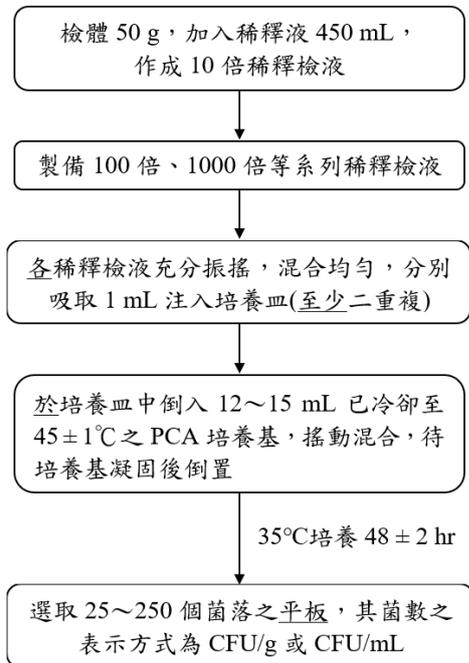
樣品編號	菌落數			CFU/g ^a	計算依據
	1:100	1:1000	1:10000		
1	TNTC ^b TNTC	175 ^c 208	16 17	190000	2.5.2
2	TNTC TNTC	224 245	25 30	250000	2.5.2
3	18 14	2 0	0 0	1600*	2.5.3
4	TNTC TNTC	TNTC TNTC	523 487	5000000*	2.5.4
5	TNTC TNTC	245 230	35 擴散菌落	290000	2.5.5
6	0 0	0 0	0 0	<100*	2.5.6
7	TNTC TNTC	245 278	23 20	260000	2.5.7
8	TNTC TNTC	225 255	21 40	270000	2.5.8
9	TNTC TNTC	210 240	18 28	230000	2.5.9
10	TNTC TNTC	260 230	30 28	270000	2.5.9

星號()表示估計值

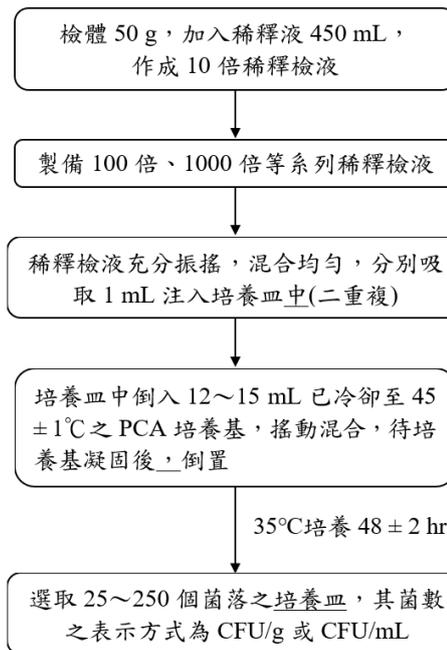
^bTNTC：菌落太多無法計數，菌落數明顯地多於250

^c劃有底線的數字表示用於計數

檢驗流程圖



2.6. 檢驗流程圖



2.7. 可參考使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以本檢驗方法為準。