

食品微生物之檢驗方法－大腸桿菌群之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms-Test of Coliform bacteria

1. 適用範圍：本方法適用於食品中大腸桿菌群之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以三階三支進行培養，配合 MPN 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 呎燭光以上，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 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.4. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.5. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：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 120 g，靈敏度為 5 mg。
 - 2.2.8. 精密天平：靈敏度為 0.001 g。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.11. 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。
 - 2.2.12. 試管：15 × 150 mm 試管或其他適用者。
 - 2.2.13. 發酵管(Durham fermentation tube)：內徑 7 × 20 mm 或其它適當規格，使用時倒置於 15 × 150 mm 之試管內。
 - 2.2.14. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。
 - 2.2.15. 吸管(Pipette)：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
 - 2.2.16. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、氫氧化鈉、乳糖(lactose)、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、牛膽汁粉末(oxgall powder)、煌綠(brilliant green)及油酸聚醇山梨酯(polysorbate 80, Tween 80)均採用試藥級；胰化蛋白胍(tryptose)及蛋白胍(peptone)採用微生物級。
 - 2.2.17. 1N 氫氧化鈉溶液之配製：

稱取氫氧化鈉 4 g，加入蒸餾水溶解使成 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，分裝於稀釋用容器中，經 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。

2.2.18.3. 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。

2.2.19. 培養基

2.2.19.1. 硫酸月桂胰化蛋白胨培養液 (Lauryl sulfate tryptose broth, LST)

胰化蛋白胨 (tryptose)	20.0 g
乳糖 (lactose)	5.0 g
磷酸氫二鉀 (K ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氫鉀 (KH ₂ PO ₄)	2.75 g
氯化鈉	5.0 g
硫酸月桂酸鈉 (sodium lauryl sulfate)	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌溶解後，分取 10 mL 注入裝有發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8 ± 0.2。

2.2.19.2. 煌綠乳糖膽汁培養液 (Brilliant green lactose bile broth, BGLB)

蛋白胨 (peptone)	10.0 g
乳糖 (lactose)	10.0 g
牛膽汁粉末 (oxgall powder)	20.0 g
煌綠 (brilliant green)	0.0133 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌溶解後，分取 10 mL 注入裝有發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8 ± 0.2。

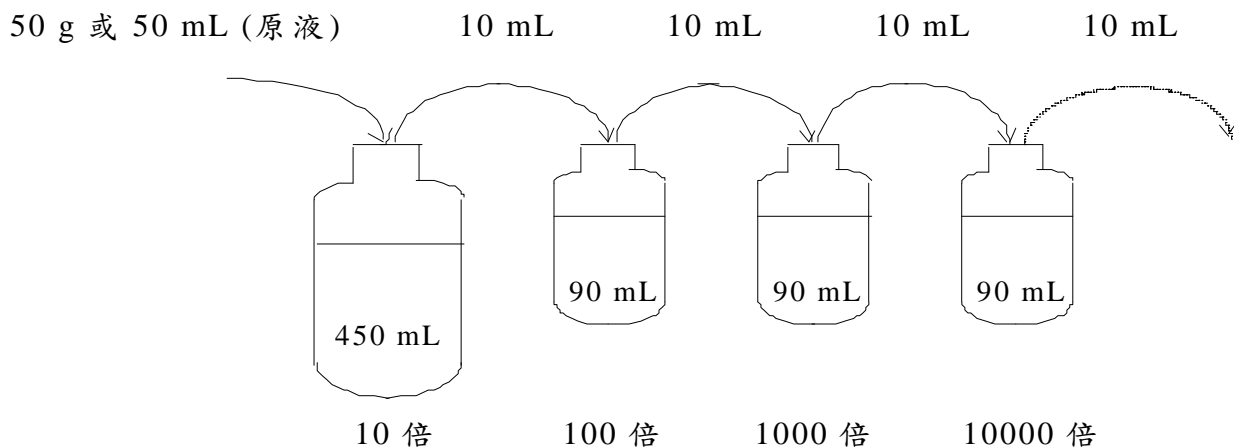
2.3. 檢液之調製

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。

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

用具將檢體粉碎後，混合均勻，取 50 g，以下步驟同 2.3.1.節之操作。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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%蛋白腴稀釋液外，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. 鑑別試驗

- 2.4.1. 推定試驗：將稀釋檢液及(或)原液充分振搖、混合均勻後，分別

吸取 1 mL 接種於已裝有硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養液(LST)試管中，每稀釋檢液各接種 3 支(稱三階三支)，自檢液之調製至此步驟應於 15 分鐘內完成，於 35°C 培養 24±2 小時，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，繼續培養 24 小時。若仍無氣體產生，為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，為可疑大腸桿菌群陽性。

2.4.2. 確定試驗：由 2.4.1.節產生氣體之各試管中取一白金耳量培養液，接種於另一支煌綠乳糖膽汁培養液(BGLB)於 35°C 培養 24±2 小時，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，繼續培養 24 小時，若仍無氣體產生即為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，判定為大腸桿菌群陽性。

2.4.3. 最確數(Most probable number, MPN)：由 2.4.2.節煌綠乳糖膽汁培養液(BGLB)確定為大腸桿菌群陽性者推算 2.4.1.節各階硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養液(LST)大腸桿菌群陽性之試管數，利用最確數表(如附表)，推算大腸桿菌群之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限	
0.1*	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	< 3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	--

*：各階試管中所含檢體量 (g 或 mL)

說明：最確數表適用的接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

$$\text{最確數 MPN/g (MPN/mL)} = \frac{\text{最確數表之最確數}}{\text{第一階試管含檢體量} \times 10}$$

例如：經判定含有測試菌之正反應試管數為 3-1-0 時，對照最確數表之最確數為 43，

(1) 當接種量為各階試管含檢體 1, 0.1, 0.01 (g 或 mL)，推算測試菌

$$\text{之最確數} = \frac{43}{1 \times 10} = 4.3 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

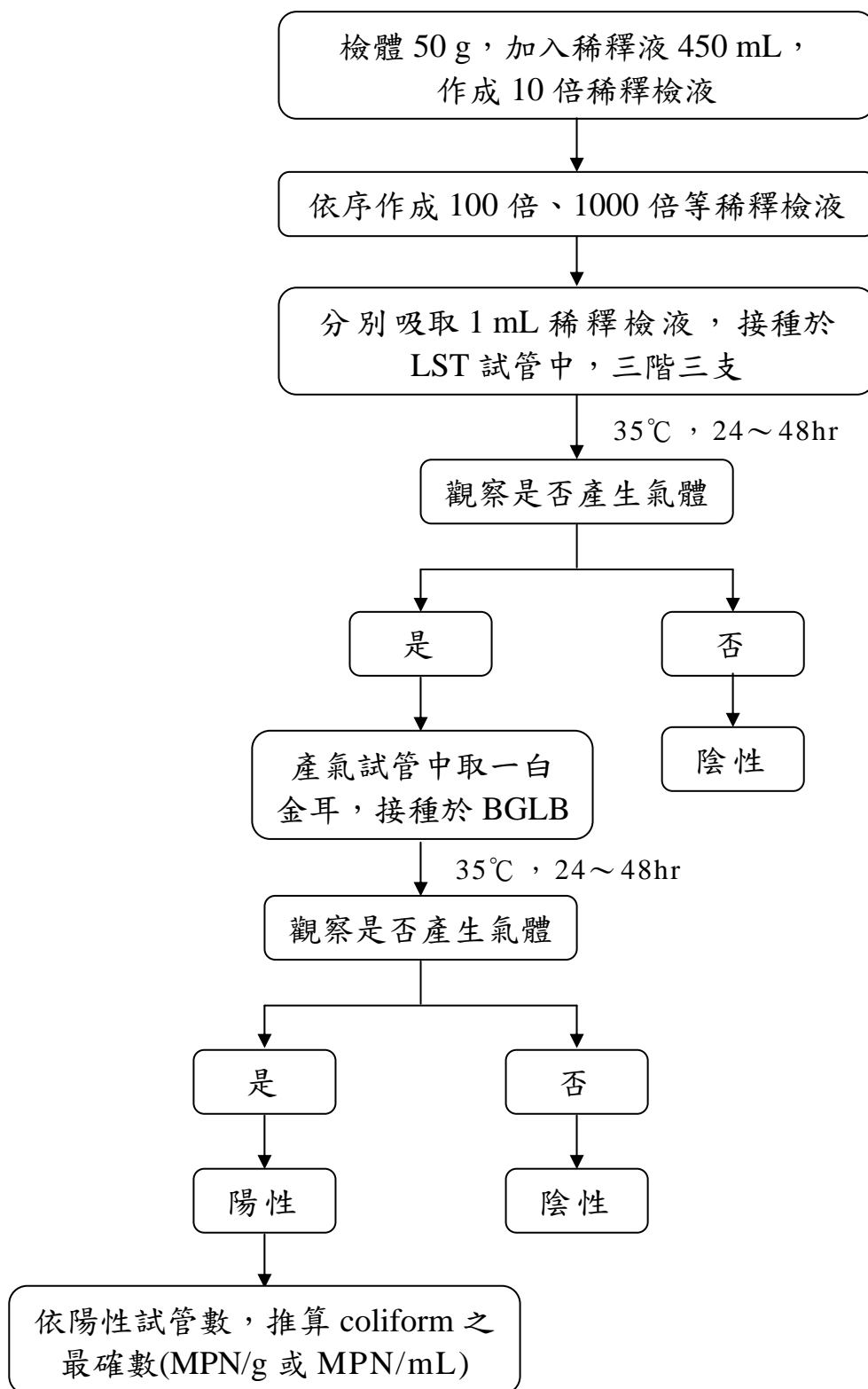
(2) 當接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，推算測

$$\text{試菌之最確數} = \frac{43}{0.1 \times 10} = 43 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(3) 當接種量為各階試管含檢體 0.01, 0.001, 0.0001 (g 或 mL)，推

$$\text{算測試菌之最確數} = \frac{43}{0.01 \times 10} = 4.3 \times 10^2 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

2.5. 檢驗流程圖



2.6. 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，應以傳統方法為準。