

食品微生物之檢驗方法－包裝飲用水及盛裝飲用水中大腸桿菌群檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Coliform in Bottled
and Packaged Drinking Water

1. 適用範圍：本方法適用於包裝飲用水及盛裝飲用水中大腸桿菌群之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經濾膜過濾後，以選擇性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. 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。
 - 2.2.6. 薄膜過濾裝置：可放置過濾薄膜之漏斗及減壓固定支架基座，漏斗應具無菌性或可滅菌性。
 - 2.2.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.8. 濾膜：孔徑0.45 μm 硝化纖維過濾薄膜(水質檢驗用、白色、有格子、已殺菌)或同級品，適用於2.2.6.節之薄膜過濾裝置者。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.11. 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。
 - 2.2.12. 培養皿：已滅菌，內徑約90 mm，深度約15 mm，或其他適當大小之規格，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
 - 2.2.13. 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。
 - 2.2.14. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。

- 2.2.15. pH試紙：範圍6-8。
- 2.2.16. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)、氫氧化鈉、乳糖(lactose)、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、95%乙醇、去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)、亞硫酸鈉(Na₂SO₃)、鹼性洋紅(basic fuchsin)、煌綠(brilliant green)、六水氯化鎂(MgCl₂·6H₂O)及無水氯化鎂均採用試藥級；酵母抽出物(yeast extract)、胰化酪蛋白胨(trypticase)、胰化蛋白胨(tryptose)、硫化蛋白胨(peptone)、牛膽汁粉末(oxgall powder)、蛋白胨(peptone)及瓊脂(agar)均採用微生物級。
- 2.2.17. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.18. 試劑
- 2.2.18.1. 1N氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉4 g，加入蒸餾水溶解使成100 mL。
- 2.2.18.2. 磷酸鹽緩衝溶液(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，經121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.18.3. 氯化鎂溶液：取六水氯化鎂81 g或無水氯化鎂38 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。
- 2.2.18.4. 無菌稀釋液：取氯化鎂溶液10 mL及磷酸鹽緩衝溶液2.5mL，加入蒸餾水使成2000 mL，混勻後裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.19. 培養基
- 2.2.19.1. LES Endo agar培養基 (m-Endo agar LES培養基)
- | | |
|---|-------|
| 酵母抽出物(yeast extract)..... | 1.2 g |
| 胰化酪蛋白胨(trypticase)..... | 3.7 g |
| 胰化蛋白胨(tryptose)..... | 7.5 g |
| 硫化蛋白胨(thiopeptone)..... | 3.7 g |
| 乳糖(lactose)..... | 9.4 g |
| 磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄) | 3.3 g |
| 磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄) | 1.0 g |

氯化鈉.....	3.7 g
去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate).....	0.1 g
硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate).....	0.05 g
亞硫酸鈉(Na ₂ SO ₃).....	1.6 g
鹼性洋紅(basic fuchsin).....	0.8 g
瓊脂(agar).....	15.0 g

LES Endo agar 培養基51 g，加入含95%乙醇20 mL之蒸餾水1000 mL，攪拌加熱至沸騰溶解，不可加熱過度，於50°C水浴中冷卻，最後pH值為7.2±0.2。分裝於培養皿中，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基表面乾燥。

2.2.19.2. m-Endo agar培養基

酵母抽出物(yeast extract).....	1.5 g
胰化蛋白胨(tryptose).....	10.0 g
硫化蛋白胨(thiopeptone).....	5.0 g
胰化酪蛋白胨(trypticase).....	5.0 g
乳糖(lactose).....	12.5 g
氯化鈉.....	5.0 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄).....	4.375 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄).....	1.375 g
硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate).....	0.05 g
去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate).....	0.1 g
亞硫酸鈉(Na ₂ SO ₃).....	2.1 g
鹼性洋紅(basic fuchsin).....	1.05 g
瓊脂(agar).....	15.0 g

取m-Endo agar 培養基48 g，加入含95 %乙醇20 mL之蒸餾水1000 mL，攪拌加熱至沸騰溶解，不可加熱過度，於50°C水浴中冷卻，最後pH值為7.2±0.2。分裝於培養皿中，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基表面乾燥。

2.2.19.3. 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。

2.2.19.4.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. 取樣：用已滅菌之容器或無菌袋盛取檢體，取檢體 100 mL 過濾；若汙染情形嚴重時，則可採 10 mL，每一檢體至少做二重複。
- 2.4. 過濾：檢體以濾膜減壓過濾。
- 2.5. 培養：經 2.4.節過濾後之薄膜，取出放置於 LES Endo agar 培養基或 m-Endo agar 培養基上，倒置，於 35 ± 1°C 下培養 24 小時。
- 2.6. 觀察：經培養後，觀察是否有金屬光澤之菌落生成，有金屬光澤菌落則進行後續確認。
- 2.7. 確認試驗：隨機挑選 10 個以上具金屬光澤之菌落，若具金屬光澤之菌落小於 10 個時則需全選，每個菌落取一接種環菌量接種於一管 LST，於 35 ± 1°C 下培養 48 小時，若有產氣者，由試管中取一接種環量培養液，接種於 BGLB，於 35 ± 1°C 培養 48 小時，觀察是否產生氣體；未產生氣體者即為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，判定為大腸桿菌群陽性。
- 2.8. 計數：由確認試驗所得結果，依確定之比率計算大腸桿菌群估計值，單位為 CFU/100 mL。若無金屬光澤菌落生長，則大腸桿菌群估計值以「<1 CFU/100 mL」表示。
- 2.9. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

檢驗流程圖

