

# 化粧品中微生物檢驗方法

## Microbiological Methods for Cosmetics

### 第一部分：好氣性生菌數之檢驗

#### Part I：Test of Aerobic Plate Count

1. 適用範圍：本方法適用於化粧品中好氣性生菌數之檢驗。
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. 無塵無菌操作台。
    - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
    - 2.2.3. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.4. 天平：可秤量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可秤量到 120 g，靈敏度為 5 mg。
    - 2.2.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.2.7. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
    - 2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)。
    - 2.2.9. 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。
    - 2.2.10. 玻璃珠：直徑約 5~7 mm，已滅菌。
    - 2.2.11. 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。
    - 2.2.12. 稀釋用容器：無菌袋或有 100 mL、50 mL 或 10 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶或試管。
    - 2.2.13. 彎曲塗抹玻棒、紗布墊、藥勺、抹刀、剪刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。

2.2.14. 試藥：氯化鈉、亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )、膽汁鹽(bile salts No.3)、結晶紫(crystal violet)、中性紅(neutral red)、乳糖(lactose)、95%乙醇及油酸聚醇山梨酯(Tween 80)均採用試藥級；Letheen培養液(Letheen broth)、Letheen洋菜(Letheen agar)、胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)、硫蛋白朊(thiotone peptone)、酵母抽出物(yeast extract)及洋菜(agar)均採用微生物級。

2.3. 70%乙醇溶液：

取95%乙醇560 mL，溶於蒸餾水200 mL，混合均勻。

2.4. 培養基：

2.4.1. 改良式Letheen培養液(Modified Letheen broth, MLB)：

Letheen培養液(Letheen broth)	25.7 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白朊(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.2 \pm 0.2$ 。

2.4.2. 改良式Letheen瓊脂培養基(Modified Letheen agar, MLA)：

Letheen洋菜(Letheen agar)	25.7 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白朊(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
氯化鈉	5 g
亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )	0.1 g
洋菜(agar)	5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分裝於適當容器中，經 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.2 \pm 0.2$ 。

### 2.4.3. 馬康奇培養基(MacConkey agar)：

聚蛋白腴(polypeptone)	3 g
蛋白腴(peptone)	17 g
乳糖(lactose)	10 g
膽汁鹽(bile salts No.3)	1.5 g
氯化鈉	5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，煮沸1至2分鐘，經121°C滅菌15分鐘後，待冷卻至45~50°C後，分裝於適當培養皿中，於室溫下乾燥。最終pH值為7.1 ± 0.2。

### 2.5. 檢液之調製：

檢體於開封前仔細檢查容器無任何的破損，將檢體振搖均勻混合，以70%乙醇溶液消毒檢體容器的表面，再以無菌紗布擦乾表面。

#### 2.5.1. 液態檢體：

精確稱取檢體1 mL，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.5.2. 固態與粉末檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL，利用抹刀將檢體分散後，再加入MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.5.3. 面霜及油脂類檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL、無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.5.4. 噴霧劑：

以70%乙醇溶液濕潤之紗布消毒噴霧器之噴嘴，先從噴嘴噴

出部分檢體於無菌紗布墊，丟棄，再將檢體噴灑於稀釋瓶中，精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.5.5. 無水材料類檢體：參照2.5.2.及2.5.3.節。

2.5.6. 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1 mL，加至MLB 9 mL中，依序作成 $10^2 \sim 10^6$ 倍等系列稀釋檢液。

2.5.7. 檢體總量不足1 g (mL)時，應以全部檢體量，添加適量之MLB作為10倍稀釋檢液。

2.6. 生菌培養：

2.6.1. 將稀釋檢液或原液充分振搖，混合均勻。

2.6.2. 分別吸取各稀釋檢液0.1 mL至MLA，以無菌曲玻棒塗抹，各稀釋檢液至少進行二重複。

2.6.3. 取MLB 0.1 mL至MLA，以無菌曲玻棒塗抹作為空白對照組，進行二重複。

2.6.4. 待檢液被培養基吸收後，將培養基倒置，於 $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培養箱培養48小時。

2.7. 生菌數之計算：

經培養後，選取25~250個菌落之稀釋倍數平板來計數，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。

2.8. 增菌試驗：

經MLA培養基培養，無菌落生長，則需進行本試驗。

2.8.1. 取2.4.節各系列稀釋檢液，於 $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培養至7天，每天觀察是否有細菌生長。

2.8.2. 於7天內觀察到有生長時，所有增菌稀釋液取一接種環劃線培養於MLA及McConkey培養基上，於 $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培養48小時後，進行金黃色葡萄球菌、大腸桿菌及綠膿桿菌之檢測。

## 第二部分：金黃色葡萄球菌之檢驗

### Part II：Test of *Staphylococcus aureus*

1. 適用範圍：本方法適用於化粧品中金黃色葡萄球菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養後進行鑑別之方法。
  - 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. 無塵無菌操作台。
    - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
    - 2.2.3. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.4. 天平：可秤量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可秤量到120 g，靈敏度為5 mg。
    - 2.2.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.2.7. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
    - 2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)。
    - 2.2.9. 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。
    - 2.2.10. 濾膜：孔徑0.45  $\mu\text{m}$ 及0.22  $\mu\text{m}$ ，Nylon材質。
    - 2.2.11. 玻璃珠：直徑約5~7 mm，已滅菌。
    - 2.2.12. 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。
    - 2.2.13. 稀釋用容器：無菌袋或有100 mL、50 mL或10 mL標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶或試管。
    - 2.2.14. 彎曲塗抹玻棒、紗布墊、藥勺、抹刀、剪刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
    - 2.2.15. 試藥：  
氯化鈉、亞碲酸鉀(potassium tellurite)、30%過氧化氫溶液、

磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )、乙二胺四醋酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、油酸聚醇山梨酯(Tween 80)、甘胺酸(glycine)、氯化鋰( $\text{LiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、葡萄糖(dextrose)及95%乙醇均採用化學試藥級。牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)、胨蛋白胨(proteose peptone)、Lethen洋菜(Lethen agar)、Lethen培養液(Lethen broth)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、硫蛋白胨(thiotone peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、胰化蛋白胨(tryptone)、牛肉抽出物(beef extract)、洋菜(agar)及凝固酶血漿(coagulase plasma, 兔來源, 經EDTA處理)均採用微生物級。

#### 2.2.16. 試劑：

##### 2.2.16.1. 70%乙醇溶液：

取95%乙醇560 mL，溶於蒸餾水200 mL，混合均勻。

##### 2.2.16.2. 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。

##### 2.2.16.3. 1%亞碲酸鉀溶液：

取亞碲酸鉀 1 g，溶於蒸餾水 100 mL，稍加熱，使其完全溶解(如有白色不溶物存在，則亞碲酸鉀粉末不可使用)，經 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑濾膜過濾，貯存於冰箱中備用，當有白色沉澱產生即不可使用，使用期限以不超過 1 個月為宜。

##### 2.2.16.4. 3%過氧化氫溶液：

取30%過氧化氫溶液1 mL，加蒸餾水使成10 mL，使用時新鮮配製。

#### 2.2.17. 培養基

##### 2.2.17.1. 腦心浸出培養液(Brain heart infusion broth, BHI)

牛腦浸出物(calf brain infusion)	200 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	250 g

脲蛋白胨(protose peptone)	10 g
氯化鈉	5 g
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.5 g
葡萄糖(dextrose)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於三角瓶內或試管中，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.4 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.17.2. 改良式Lethen培養液(Modified letheen broth, MLB)

Lethen培養液(Lethen broth)	25.7 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白胨(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最後pH值為 $7.2 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.17.3. 改良式Lethen培養基(Modified letheen agar, MLA)

Lethen洋菜(Lethen agar)	25.7 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白胨(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
氯化鈉	5 g
亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )	0.1 g
洋菜(agar)	5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最後pH值為 $7.2 \pm 0.2$ 。  
取20 mL分裝於已滅菌之培養皿。

#### 2.2.17.4. 巴德派克培養基(Baird-Parker agar, BP)

基礎培養基(basal medium)	
胰化蛋白胨(tryptone)	10 g

牛肉抽出物(beef extract)	5 g
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 <sub>2</sub> O)	5 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	950 mL

加熱溶解後以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.2。

蛋黃亞碲酸鹽強化培養液(Egg yolk tellurite enrichment, EYT)

蛋洗淨後，浸入 70%乙醇溶液中1小時。以無菌操作，取出蛋黃，加入無菌生理食鹽水，以體積 3:7 之比例混合攪拌均勻後，取 50 mL，加入經 0.45 μm 孔徑濾膜過濾之 1%亞碲酸鉀溶液 10 mL，混合均勻後貯存於冰箱中備用。

完全培養基(Complete medium)

將基礎培養基冷卻至45~50°C時加入EYT，以體積95:5之比例混合均勻。培養基注入培養皿前，應搖動混合使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入15~20 mL，凝固後呈不透明，使用前應使表面乾燥。製備好之培養基置於20~25°C，使用期限以不超過5天為宜。

### 2.3. 檢液之調製

#### 2.3.1. 液態檢體：

精確量取檢體 1 mL，置於滅菌試管，加入 MLB 9 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。

#### 2.3.2. 固態與粉末檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL，利用抹刀將檢體分散後，再加入MLB 8



mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.3.3. 面霜與油脂類檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL、無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.3.4. 噴霧劑：

以70%乙醇溶液濕潤之紗布消毒噴霧器之噴嘴，先從噴嘴噴出部分檢體於無菌紗布墊，丟棄，再將檢體噴灑於稀釋瓶中，精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.3.5. 無水材料類檢體：參照2.3.2.與2.3.3.節。

依檢體之大小，適量取1~10 g (mL)，依2.3.節之方法加入適量之MLB，作為10倍稀釋檢液。

### 2.4. 鑑別試驗：

#### 2.4.1. 分離培養：

2.3.節之10倍稀釋檢液於30°C培養48小時，以無菌接種環取一環耳劃線培養於BP培養基上，於35°C培養48小時，觀察所形成菌落之生長狀態。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，則為可疑之金黃色葡萄球菌。自BP培養基上鉤取可疑菌落劃線培養於MLA上，於35°C培養18~24小時後進行生化試驗鑑定。

#### 2.4.2. 生化試驗：

##### 2.4.2.1. 觸酶試驗(Catalase test)：

自2.4.1.節之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。

##### 2.4.2.2. 凝固酶試驗(Coagulase test)：

自2.4.1.節之MLA培養基上鉤菌至含BHI培養液0.2 mL之

試管中，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養18~24小時，加入凝固酶血漿0.5 mL，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養6小時，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24小時觀察之，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。

2.5. 判定：觸酶試驗與凝固酶試驗皆為正反應者，為金黃色葡萄球菌陽性。

### 第三部分：大腸桿菌之檢驗

#### Part III : Test of *Escherichia coli*

1. 適用範圍：本方法適用於化粧品中大腸桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養後進行鑑別之方法。
  - 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. 無塵無菌操作台。
    - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
    - 2.2.3. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.4. 天平：可秤量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可秤量到120 g，靈敏度為5 mg。
    - 2.2.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.2.7. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
    - 2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)。
    - 2.2.9. 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。
    - 2.2.10. 玻璃珠：直徑約5~7 mm，已滅菌。
    - 2.2.11. 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。
    - 2.2.12. 稀釋用容器：無菌袋或有100 mL、50 mL或10 mL標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶或試管。
    - 2.2.13. 彎曲塗抹玻棒、紗布墊、藥勺、抹刀、剪刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
    - 2.2.14. 試藥：  
氯化鈉、伊紅Y(eosin Y)、亞甲藍(methylene blue)、結晶紫(crystal violet)、亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )、膽汁鹽(bile salts No.3)、

中性紅(neutral red)、磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ )、乳糖(lactose)及95% 乙醇均採用化學試藥級。Letheen培養液(Letheen broth)、胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)、硫蛋白朊(thiotone peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、聚蛋白朊(polypeptone)、蛋白朊(peptone)及洋菜(agar)均採用微生物級。

#### 2.2.15. 70%乙醇溶液：

取95%乙醇560 mL，溶於蒸餾水200 mL，混合均勻。

#### 2.2.16. 培養基

##### 2.2.16.1. 改良式Letheen培養液(Modified letheen broth, MLB)

Letheen培養液(Letheen broth)	25.7 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白朊(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
亞硫酸氫鈉( $NaHSO_3$ )	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最後pH值為7.2 ± 0.2。

##### 2.2.16.2. 馬康奇培養基(MacConkey agar)

聚蛋白朊(polypeptone)	3 g
蛋白朊(peptone)	17 g
乳糖(lactose)	10 g
膽汁鹽(bile salts No.3)	1.5 g
氯化鈉	5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1 ± 0.2。

##### 2.2.16.3. 伊紅亞甲藍培養基(Levine's eosin methylene blue agar,

L-EMB)	
蛋白朊(peptone)	10 g
乳糖(lactose)	10 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2 g
洋菜(agar)	15 g
伊紅Y(eosin Y)	0.4 g
亞甲藍(methylene blue)	0.065 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以121°C滅菌15分鐘，最後pH值為7.1 ± 0.1。培養基注入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，培養皿約倒入15~20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基之表面乾燥。已注入培養皿之培養基宜當天使用，在冰箱中貯存者，應於使用前檢查有無雜菌之污染。

### 2.3. 檢液之調製

#### 2.3.1. 液態檢體：

精確量取檢體 1 mL，置於滅菌試管，加入 MLB 9 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。

#### 2.3.2. 固態與粉末檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL，利用抹刀將檢體分散後，再加入MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.3.3. 面霜與油脂類檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL、無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

#### 2.3.4. 噴霧劑：

以70%乙醇溶液濕潤之紗布消毒噴霧器之噴嘴，先從噴嘴噴出部分檢體於無菌紗布墊，丟棄，再將檢體噴灑於稀釋瓶中，

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.5. 無水材料類檢體：參照2.3.2.與2.3.3.節。

依檢體之大小，適量取1~10 g(mL)，依2.3.節之方法加入適量之MLB，作為10倍稀釋檢液。

2.4. 鑑別試驗：

2.3.節之10倍稀釋檢液於30°C培養48小時，以無菌接種環取一環耳劃線培養於馬康奇培養基，於35°C培養24小時，觀察所形成菌落之生長狀態，取馬康奇培養基上紅色、無色、或淡粉紅色菌落，劃線培養於L-EMB培養基，於35°C培養24小時。

2.5. 判定：

大腸桿菌陽性者於L-EMB之菌落特徵為於反射光下有特殊光澤，於透射光下為藍黑色。

#### 第四部分：綠膿桿菌之檢驗

##### Part IV : Test of *Pseudomonas aeruginosa*

1. 適用範圍：本方法適用於化粧品中綠膿桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養後進行鑑別之方法。
  - 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. 無塵無菌操作台。
    - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
    - 2.2.3. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.4. 天平：可秤量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可秤量到 120 g，靈敏度為 5 mg。
    - 2.2.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.6. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.2.7. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
    - 2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)。
    - 2.2.9. 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。
    - 2.2.10. 玻璃珠：直徑約 5~7 mm，已滅菌。
    - 2.2.11. 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。
    - 2.2.12. 稀釋用容器：無菌袋或有 100 mL、50 mL 或 10 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶或試管。
    - 2.2.13. 彎曲塗抹玻棒、紗布墊、藥勺、抹刀、剪刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
    - 2.2.14. 試藥：  
氯化鈉、氯化鎂( $\text{MgCl}_2$ )、氯仿(chloroform)、硝酸鉀( $\text{KNO}_3$ )、亞硫酸氫鈉( $\text{NaHSO}_3$ )、硫酸銨[ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]、硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ )、

硫酸鎂( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )、N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine. 2HCl)、對-胺基苯磺酸(sulfanilic acid)、萘基乙二胺鹽酸鹽 [ N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride ]、抗壞血酸(ascorbic acid)、硫酸鉀( $K_2SO_4$ )、磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ )、磷酸氫銨鈉( $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ )、磷酸二氫鉀( $KH_2PO_4$ )、丙二酸鈉(sodium malonate)、硫酸銨亞鐵 [  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  ]、硫代硫酸鈉( $Na_2S_2O_3$ )、Tween 80、檸檬酸鈉( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ )、酚紅(phenol red)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、碘化鉀、碘、沙黃 O (safranin O)、甘油(glycerol)、草酸銨(ammonium oxalate)、硫酸、冰醋酸、葡萄糖(glucose)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、精胺酸(arginine)、溴麝香草藍(bromothymol blue)、膽汁鹽(bile salts No.3)、中性紅(neutral red)、結晶紫(crystal violet)、溴化十六烷基三甲銨( $C_{19}H_{42}BrN$ )及 95%乙醇均採用化學試藥級。Lethen 培養液(Lethen broth)、胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)、硫蛋白朊(thiotone peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、洋菜(agar)、聚蛋白朊(polypeptone)、蛋白朊(peptone)、胰蛋白朊(tryptose)、牛心浸出物培養基(Heart infusion agar)、胨蛋白朊(proteose peptone)、3 號胨蛋白朊(proteose peptone No.3)、胰化蛋白朊(tryptone)、浸出培養液(infusion broth)、明膠(gelatin)及胰化明膠(pancreatic digest of gelatin)均採用微生物級。

#### 2.2.15. 試劑：

##### 2.2.15.1. 70%乙醇溶液：

取95%乙醇560 mL，溶於蒸餾水200 mL，混合均勻。

##### 2.2.15.2. 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 $121^\circ C$ 滅菌15分鐘。

##### 2.2.15.3. 1N硫酸溶液：

取硫酸20 mL，溶於蒸餾水340 mL，混合均勻。



2.2.15.4. 5N醋酸溶液：

取冰醋酸100 mL，溶於蒸餾水240 mL，混合均勻。

2.2.15.5. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)：

2.2.15.5.1. 哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)：

溶液A：取結晶紫2 g，溶於95%乙醇20 mL。

溶液B：取草酸銨0.8 g，溶於蒸餾水80 mL。

將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

2.2.15.5.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：

取碘化鉀2 g及碘1 g，置於研鉢中，研磨5~10秒，加蒸餾水1 mL研磨，次加蒸餾水5 mL研磨，再加蒸餾水10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達300 mL。

2.2.15.5.3. 哈克氏複染液(複染劑)：

取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，供作複染原液。使用時，取原液10 mL，加入蒸餾水90 mL，作為複染液。

註：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，需注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.15.6. 營養明膠(Nutrient gelatin)

取浸出培養液(infusion broth) 25 g及明膠(gelatin) 120 g，溶於蒸餾水1000 mL。加熱溶解後，調整pH值至 $7.4 \pm 0.2$ ，取4 mL，分裝於試管中，以 $121^{\circ}\text{C}$ 滅菌15分鐘。

2.2.15.7. 氧化酶試劑(Oxidase reagent)

取 N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine. 2HCl) 1 g 及抗壞血酸 0.1 g，溶於蒸餾水 100 mL。置於褐色試藥瓶中冷藏備用，限一週內使用。

2.2.15.8. 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite test reagents)：

試劑 A：取對-胺基苯磺酸 1 g，溶於 5N 醋酸溶液 125 mL。

試劑 B：取萘基乙二胺鹽酸鹽 0.25 g，溶於 5 N 醋酸溶液 200 mL。

#### 2.2.16. 培養基

##### 2.2.16.1. 改良式Letheen培養液(Modified letheen broth, MLB)

Letheen培養液(Letheen broth)	25.7 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白朊(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
亞硫酸氫鈉(NaHSO <sub>3</sub> )	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.2 ± 0.2。

##### 2.2.16.2. 丙二酸鹽培養液(Malonate broth)

酵母抽出物(yeast extract)	1 g
硫酸銨 [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	2 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.6 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.4 g
氯化鈉	2 g
丙二酸鈉(sodium malonate)	3 g
葡萄糖(glucose)	0.25 g
溴麝香草藍(bromothymol blue)	0.025 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取約 3 mL，注入試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.7 ± 0.2。

##### 2.2.16.3. 三糖鐵培養基(Triple sugar iron agar, TSI)

聚蛋白朊(polypeptone)	20 g
氯化鈉	5 g
乳糖(lactose)	10 g

蔗糖(sucrose)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 g
硫酸銨亞鐵 [ Fe (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O ]	0.2 g
硫代硫酸鈉(Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0.2 g
酚紅(phenol red)	0.025 g
洋菜(agar)	13 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分取5 mL，注入試管內，以118°C滅菌15分鐘，最後pH值為7.3 ± 0.2。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約4~5 cm，斜面底部之深度約2~3 cm。

#### 2.2.16.4. 馬康奇培養基(MacConkey agar)

聚蛋白胨(polypeptone)	3 g
蛋白胨(peptone)	17 g
乳糖(lactose)	10 g
膽汁鹽(bile salts No.3)	1.5 g
氯化鈉	5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1 ± 0.2。

#### 2.2.16.5. 硝酸鹽培養基(Motility nitrate medium)

胰蛋白胨(tryptose)	10 g
牛心浸出物培養基(Heart infusion agar)	8 g
硝酸鉀(KNO <sub>3</sub> )	1 g
葡萄糖(glucose)	0.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取4 mL注入試管內，以121°C滅菌15分鐘。

- 2.2.16.6. 精胺酸脫羧酶培養液(Arginine decarboxylase medium)
- |                         |         |
|-------------------------|---------|
| 蛋白胨(peptone)            | 5 g     |
| 酵母抽出物(yeast extract)    | 3 g     |
| 葡萄糖(glucose)            | 1 g     |
| 溴甲酚紫(bromcresol purple) | 0.02 g  |
| 蒸餾水                     | 1000 mL |
- 加熱攪拌溶解後，取精胺酸(L-arginine) 5 g 溶解於上述之培養液中，混合均勻，分取適量注入試管內，以121°C滅菌10分鐘，最終pH值為6.5 ± 0.2。
- 2.2.16.7. 酵母菌抽出物培養基(Yeast extract agar, YE)
- |                        |         |
|------------------------|---------|
| 胨蛋白胨(proteose peptone) | 10 g    |
| 酵母抽出物(yeast extract)   | 3 g     |
| 氯化鈉                    | 5 g     |
| 洋菜(agar)               | 15 g    |
| 蒸餾水                    | 1000 mL |
- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘。滅菌後作成斜面培養基，最終pH值為7.2~7.4。
- 2.2.16.8. 假單孢菌螢光培養基(Pseudomonas agar F)
- |   |         |
|---|---------|
| 3號胨蛋白胨(proteose peptone No.3)           | 20 g    |
| 胰化蛋白胨(tryptone)                         | 10 g    |
| 磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 1.5 g   |
| 硫酸鎂(MgSO <sub>4</sub> )                 | 0.73 g  |
| 甘油(glycerol)                            | 10 g    |
| 洋菜(agar)                                | 15 g    |
| 蒸餾水                                     | 1000 mL |
- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0。
- 2.2.16.9. 假單孢菌色素培養基(Pseudomonas agar P)
- |                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| 蛋白胨(peptone)                         | 20 g  |
| 硫酸鉀(K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 10 g  |
| 氯化鎂(MgCl <sub>2</sub> )              | 1.4 g |

甘油(glycerol)	10 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0。

#### 2.2.16.10. 溴化十六烷基三甲銨培養基(Cetrimide agar)

胰化明膠(pancreatic digest of gelatin)	20 g
氯化鎂(MgCl <sub>2</sub> )	1.4 g
硫酸鉀(K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
洋菜(agar)	13.6 g
溴化十六烷基三甲銨(C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> BrN)	0.3 g
蒸餾水	1000 mL

稱取 45.3 g 於 1000 mL 蒸餾水，再加入甘油 10 mL，混合均勻，加熱均勻攪拌溶解後，以 118°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.2 ± 0.2。

#### 2.2.16.11. 柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's citrate broth)

磷酸氫銨鈉(NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	1.5 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1 g
硫酸鎂(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.2 g
檸檬酸鈉(Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	3 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取10 mL注入試管內，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.7 ± 0.2。

### 2.3. 檢液之調製

#### 2.3.1. 液態檢體：

精確量取檢體 1 mL，置於滅菌試管，加入 MLB 9 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。

#### 2.3.2. 固態與粉末檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL，利用抹刀將檢體分散後，再加入MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

### 2.3.3. 面霜與油脂類檢體：

精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之Tween 80 1 mL、無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

### 2.3.4. 噴霧劑：

以70%乙醇溶液濕潤之紗布消毒噴霧器之噴嘴，先從噴嘴噴出部分檢體於無菌紗布墊，丟棄，再將檢體噴灑於稀釋瓶中，精確稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

### 2.3.5. 無水材料類檢體：參照2.3.2.與2.3.3.節。

依檢體之大小，適量取1~10 g (mL)，依2.3.節之方法加入適量之MLB，作為10倍稀釋檢液。

## 2.4. 鑑別試驗：

### 2.4.1. 分離培養：

2.3.節之10倍稀釋檢液於30°C培養48小時，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培養24小時，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。

### 2.4.2. 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鉤菌，進行革蘭氏染色(Gram stain)、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2.4.3.節的生化試驗。

#### 2.4.2.1. 革蘭氏染色鏡檢：

2.4.2.1.1. 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，採自然風乾固定，勿用火烤。

2.4.2.1.2. 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘後，水洗，水洗時間應不超過5秒鐘。

2.4.2.1.3. 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。

- 2.4.2.1.4. 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以水洗。此步驟需時甚短，僅數秒鐘即可，惟視抹片之厚薄而定。
- 2.4.2.1.5. 複染：用複染液複染30秒鐘，水洗。
- 2.4.2.1.6. 自然風乾。
- 2.4.2.1.7. 鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。綠膿桿菌為革蘭氏陰性桿菌。

#### 2.4.2.2. 三糖鐵斜面培養基試驗：

自溴化十六烷基三甲胺培養基上選取典型菌落接種於TSI斜面上及穿刺其底部，於35°C培養24小時，若TSI斜面顯示紅色且斜面底部亦顯示紅色為正反應(+)，若斜面呈黃色或有汽泡產生，則為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。

註：某些假單孢菌可能會產生微量的硫化氫，致使TSI斜面顏色變成黑色。

#### 2.4.2.3. 氧化酶測試：

使用無菌鉑鉍接種針(避免使用鎳鉻製品)或牙籤或小木棒，自平板培養基或斜面培養基鉤取少量新鮮菌株，塗抹於氧化試劑潤濕之濾紙上，10秒鐘內變為深紫藍色者為正反應，否則為負反應。綠膿桿菌為正反應。

#### 2.4.3. 生化試驗：

##### 2.4.3.1. 42°C生長試驗：

自TSI斜面鉤菌接種於兩個酵母菌抽出物培養基斜面上，一酵母菌抽出物培養基斜面於35°C培養24小時，另一斜面於42°C培養24小時。綠膿桿菌可生長在酵母菌抽出物培養基上並會產生腥味(fishy odor)。

註：在進行試驗前須將酵母菌抽出物培養基斜面先置於42°C培養箱下30~60分鐘進行預熱，若無進行預熱，則有些假單孢菌有可能會在酵母菌抽出物培養基斜面上生成菌落，影響實驗結果判斷。

2.4.3.2. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：

自 TSI 斜面鈎菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 24~48 小時後，呈現混濁狀，則為正反應(+); 仍維持原澄清狀則為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。

2.4.3.3. 丙二酸鹽試驗 (Malonate test)：

自 TSI 斜面鈎菌接種於丙二酸鹽培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 24 ± 2 小時。培養液由綠色變為藍色者為正反應(+); 仍維持綠色者為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。

2.4.3.4. 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)：

自 TSI 斜面鈎菌接種於硝酸鹽培養基中，置於 35°C 培養箱中培養 18~24 小時，取培養液 3 mL 至另一已滅菌之試管中，加入亞硝酸鹽試驗試劑 A 及試劑 B 各 2 滴，輕輕搖勻後觀察結果，呈現粉紅或紅色則為正反應(+), 若顏色無變化時有產生氣泡使培養基有裂紋時，表示硝酸被還原產生氮氣，視為正反應，綠膿桿菌為正反應。

2.4.3.5. 精氨酸脫酸酶試驗(Arginine decarboxylase test)：

自 TSI 斜面鈎菌以斜面劃線及穿刺法接種於精氨酸脫酸培養液，將上蓋旋緊，於 35 ± 2°C 培養 24 ± 2 小時，培養液維持紫色為正反應(+); 培養液呈黃色者為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。

2.4.3.6. 明膠液化試驗(Gelatin liquefaction)：

自 TSI 斜面鈎菌以斜面劃線及穿刺法接種於營養明膠，於 25°C 培養至少 72 小時，有液化現象者為正反應(+), 無液化現象者為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。

2.4.3.7. 螢光產生試驗：

自 TSI 斜面鈎菌畫線培養於假單孢菌螢光培養基，於 25°C 下至少培養 3 天後以紫外光觀察，有螢光者為正反應(+), 無螢光者為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。



#### 2.4.3.8. 色素產生試驗：

自TSI斜面鉤菌畫線培養於假單孢菌色素培養基，於25°C下至少培養3天，使用玻璃棒將假單孢菌色素培養基分成小塊狀並加入等量之蒸餾水，震盪直到色素被水洗出。將水層倒入分液漏斗，移至化學抽氣櫃中，加入氯仿5~10 mL，震搖後靜置等待分層。將有機層倒入試管中，加入蒸餾水3 mL，再加入1N硫酸溶液1滴，色素呈現紅色並移動至水層為正反應(+)，無色素產生為負反應(-)，綠膿桿菌為正反應。

2.5. 判定：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)	(+) <sup>a</sup>
	底部	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) <sup>a</sup>
	產氣	培養基有裂縫	培養基完整	(-) <sup>a</sup>
	硫化氫	黑色	非黑色	(-) <sup>a</sup>
42°C生長試驗		有菌落生長	無菌落生長	(+) <sup>a</sup>
檸檬酸鹽試驗		混濁	澄清	(+) <sup>a</sup>
丙二酸鹽試驗		藍色	綠色	(+) <sup>a</sup>
精氨酸脫酸酶試驗		紫色	黃色	(+) <sup>a</sup>
硝酸鹽還 原試驗	顏色	粉紅或紅色	無變化	(+) <sup>a</sup>
	氣泡	有	無	(+) <sup>a</sup>
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。

#### 參考文獻

1. U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual Chapter 23  
Microbiological Methods for Cosmetics。2001。
2. 行政院衛生署中華藥典編修委員會。2011。中華藥典。第七版。
3. International Organization for Standardization. 2006.

- Cosmetics-Microbiology-Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria. Reference number ISO 21149.
4. International Organization for Standardization. 2006.  
Cosmetics-Microbiology-Detection of *Escherichia coli*. Reference number ISO 21150.
  5. International Organization for Standardization. 2006.  
Cosmetics-Microbiology-Detection of *Pseudomonas aeruginosa*.  
Reference number ISO 22717.
  6. International Organization for Standardization. 2006.  
Cosmetics-Microbiology-Detection of *Staphylococcus aureus*.  
Reference number ISO 22718.