

食品微生物之檢驗方法－腸桿菌科之檢驗(草案)
Methods of Test for Food Microorganisms - Test of Enterobacteriaceae

1. 適用範圍：本方法適用於食品中腸桿菌科之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，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. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 乾熱滅菌器。
 - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.5. 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.7. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
 - 2.2.8. 天平：可稱量到 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
 - 2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.11. 加熱器。
 - 2.2.12. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
 - 2.2.13. 吸管或吸管尖：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
 - 2.2.14. 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。
 - 2.2.15. 稀釋用容器：無菌袋或附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他三角瓶、玻璃瓶或廣口瓶。
 - 2.2.16. 試管：16 × 160 mm 或其它適用者。
 - 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. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌或可拋棄式者。

2.2.19. 濾紙及褐色試藥瓶。

2.2.20. 試藥

氯化鈉、磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、葡萄糖、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N' -tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)、油酸聚醇山梨酯(polysorbate 80, Tween 80)、中性紅(neutral red)、溴瑞香草酚藍(bromothymol blue)、結晶紫(crystal violet)、礦物油(mineral oil)均採用試藥級；洋菜(agar)、膽鹽(bile salts)、肉抽出物(meat extract)、酪蛋白酵素水解物(enzymatic digest of casein)、動物組織酵素水解物(enzymatic digest of animal tissues)、蛋白胨(peptone)、酵母抽出物(yeast extract)均採用微生物級。

2.2.21. 礦物油：

取礦物油 20~50 mL，裝入有蓋容器中約 1/2 滿，以 121°C 滅菌 30 分鐘。

2.2.22. 氧化酶試驗試劑(Oxidase test reagent)

取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1 g，溶於蒸餾水 100 mL，貯存於褐色試藥瓶，置於冰箱中備用，使用期限以不超過一星期為宜。

2.2.23. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)

取蛋白胨 10 g，氯化鈉 5 g，磷酸氫二鈉 9 g，磷酸二氫鉀 1.5 g 溶於蒸餾水，使成為 1000 mL，分裝於容器中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。

2.2.24. 培養基

2.2.24.1. 膽鹽葡萄糖瓊脂培養基(Violet red bile glucose agar, VRBGA)

動物組織酵素水解物

(enzymatic digest of animal tissues).....7 g

酵母抽出物(yeast extract).....3 g

膽鹽(bile salts).....1.5 g

葡萄糖(glucose).....10 g

氯化鈉(sodium chloride).....5 g

中性紅(neutral red).....0.03 g

結晶紫(crystal violet).....0.002 g

洋菜(agar).....15 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分裝於三角瓶，加熱使其沸騰 1 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2，並且冷卻至 47~50°C 待培養使用。

2.2.24.2. 營養培養基(Nutrient agar, NA)

肉抽出物(meat extract).....3 g
 動物組織酵素水解物
 (enzymatic digest of animal tissues).....5 g
 氯化鈉(sodium chloride).....5 g
 洋菜(agar).....15 g
 蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分裝於三角瓶，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。分裝於培養皿，每一培養皿倒入 15~18 mL，做成平板培養基，使用前培養基表面應保持乾燥。

2.2.24.3. 葡萄糖氧化發酵培養基(Glucose OF medium)

酪蛋白酵素水解物
 (enzymatic digest of casein).....2 g
 磷酸氫二鉀(K₂HPO₄).....0.3 g
 葡萄糖(glucose).....10 g
 氯化鈉(sodium chloride).....5 g
 溴瑞香草酚藍(bromothymol blue).....0.08 g
 洋菜(agar).....3.5 g
 蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分裝 10 mL 於試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8±0.2。

2.3. 檢液之調製

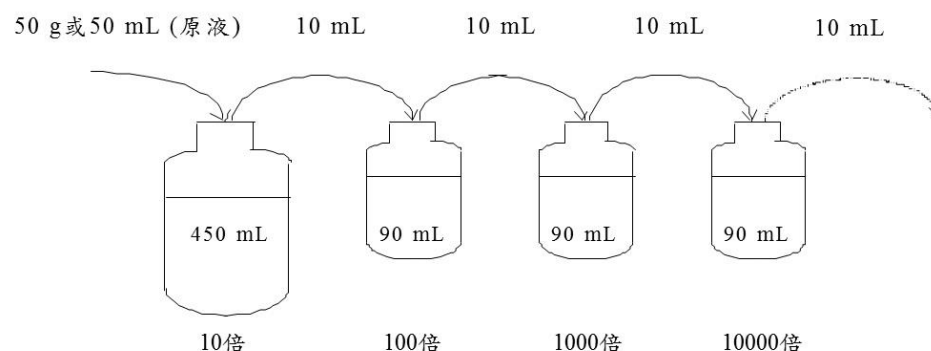
2.3.1. 檢體之處理^(註)

- 2.3.1.1. 固態檢體：將檢體適當切碎，混合均勻後，取 50 g，加入已滅菌之 BPW 緩衝液 450 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。
- 2.3.1.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎的檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎，並混合均勻。取 50 g 加入已滅菌之 BPW 緩衝液 450 mL，作為 10 倍稀釋檢液。
- 2.3.1.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取 50 mL 加入已滅菌之 BPW 緩衝液 450 mL，作為 10 倍稀釋檢液。
- 2.3.1.4. 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(置於 45°C 以下之水浴中，可於 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，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品，應速先行使成適當小塊。取檢體 50 g，以下步驟同 2.3.1.1.節之操作，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等，經適當攪拌均勻後，取檢體 50 g，以下步驟同 2.3.1.1.節之操作，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.6 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 倍及 10000 倍等一系列適當之稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



註：1. 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 1% Tween 80)，並充分振搖，使之乳化。

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

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 分離培養

2.4.1.1. 將 2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖動，混合均勻。

2.4.1.2. 各吸取每一稀釋檢液及(或)原液 1 mL，分別置入培養皿中，各檢液至少做二重複。

2.4.1.3. 2.4.1.2.節之各培養皿中倒入冷卻至 47~50°C 之 VRBG 培養基 15 mL，搖動混合均勻，靜置待培養基凝固後，再次倒入 5~10 mL 培養基，使成雙層培養基，靜置待培養基凝固後，倒置於 37°C，培養 24±2 小時，觀察所形成菌落之生長狀態，可疑菌落為紫紅色且有或無沉澱環。

2.4.1.4. 選取含 15~150 個可疑菌落之 VRBG 培養基予以計數，並由前述培養基各穿刺鉤取至少 5 個可疑菌落，分別劃線培

養於 NA 平板培養基，倒置於 37°C，培養 24±2 小時，供後續生化試驗(2.4.2.)使用。

2.4.2. 生化試驗

2.4.2.1. 葡萄糖發酵試驗(Glucose fermentation test)

鉤取 2.4.1.4.劃線培養於 NA 平板培養基之單一菌落，穿刺接種於葡萄糖氧化發酵培養基，再徐徐加入已滅菌之礦物油至高度 1 cm，於 37°C 培養 24±2 小時。培養基顏色由綠色轉變成黃色者，為正反應，否則為負反應。腸桿菌科應為正反應。

2.4.2.2. 氧化酶試驗(Oxidase test)

鉤取 2.4.1.4.劃線培養於 NA 平板培養基之單一菌落，塗抹於滴有氧化酶試劑濾紙上，10~15 秒後變為深藍紫色者，為正反應，否則為負反應。腸桿菌科應為負反應。

2.5. 判定

2.5.1. 腸桿菌科陽性者，應符合下表所列之結果。

試 驗	正 反 應(+)	負 反 應(-)	腸桿菌科之反應
葡萄糖發酵試驗	黃色	綠色	+
氧化酶試驗	深藍紫色	無色	-

2.5.2. 由 2.5.1.節判定為腸桿菌科陽性者，依 2.6.節計數其菌數。

2.6. 計數

2.6.1. 選取每片含 15~150 個菌落之同一稀釋倍數之所有平板計數可疑菌落，每片鉤取可疑菌落至少 5 個進行試驗，依 2.5.節判定計算出可疑菌落中含有腸桿菌科之比率(R，見下公式)，再以 2.6.2.或 2.6.3.節公式計算出檢體中腸桿菌科之菌數。

$$\text{比率(R)} = \frac{N_1}{N_0}$$

N_0 ：進行試驗之可疑菌落數

N_1 ：經試驗後判定為腸桿菌科之菌落數

2.6.2. 各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數平板之菌落數為 15~150 時，應計數該稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和並依下列公式計算。其菌數之表示方式為 CFU/g 或 CFU/mL，記錄菌數時應將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)，使其有效數字為兩位。

$$\text{腸桿菌科菌數(CFU/g 或 CFU/mL)} = (\Sigma a) \times \frac{A}{V_A} \times R$$

Σa ：A 稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

V_A ：A 稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

A：稀釋倍數

R：比率

- 2.6.3. 當有兩種稀釋倍數平板之菌落數在 15~150 之間時，先個別計算出各稀釋倍數之腸桿菌科菌數，再取其平均值，依下列公式計算。

$$\text{腸桿菌科菌數(CFU/g 或 CFU/mL)} =$$

$$\left[(\Sigma a) \times \frac{A}{V_A} + (\Sigma b) \times \frac{B}{V_B} \right] \times \frac{R}{2}$$

Σa ：A 稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

Σb ：B 稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

V_A ：A 稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

V_B ：B 稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

A、B：稀釋倍數

R：比率

- 2.7. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或生化鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

參考文獻：

ISO. 2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count technique. ISO 21528-2.

檢驗流程圖

