食品微生物之檢驗方法—包裝飲用水及盛裝飲用水中綠膿桿菌之檢驗修正總說明

為加強食品微生物之管理,並依據食品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、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗,其檢驗方法,由中央主管機關定之」,爰擬具「食品微生物之檢驗方法—包裝飲用水及盛裝飲用水中綠膿桿菌之檢驗」,其修正要點如下:

- 一、修正中英文標題。
- 二、增列培養皿使用規格。
- 三、增列「接種針及接種環」。
- 四、「真空過濾」修正為「減壓過濾」。
- 五、修正濾膜置於 M-PA-C 洋菜培養基之培養溫度。

食品微生物之檢驗方法—包裝飲用水及盛裝飲用水中綠膿桿菌之檢驗修正對照表

小 下 郊 派 仟 困 之 傚	7X 19 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11	
修正規定	現行規定	說明
食品微生物之檢驗方法-包裝飲用水	食品微生物之檢驗方法-綠膿桿菌之	一、修正中英文
及盛裝飲用水中綠膿桿菌之檢驗	檢驗	標題。
Methods of Test for Food	Methods of Test for Food	二、增列培養皿
Microorganisms-Test of Pseudomonas	Microorganisms-Test of Pseudomonas	使用規格。
aeruginosa in Bottled and Packaged	aeruginosa	三、增列「接種
<u>Drinking Water</u>		針及接種
1. 適用範圍:本方法適用於包裝飲用	1. 適用範圍:本方法適用於包裝飲用	環」。
水及盛裝飲用水中綠膿桿菌	水及盛裝飲用水中綠膿桿菌	四、「真空過濾」
(Pseudomonas aeruginosa)之檢驗。	(Pseudomonas aeruginosa)之檢驗。	修正為「減壓
2. 檢驗方法:檢體經濾膜過濾後,以	2.檢驗方法:檢體經濾膜過濾後,以選	過濾」。
選擇性培養基培養及計數之方法。	擇性培養基培養及計數之方法。	五、修正濾膜置
2.1. 工作環境:工作平台須寬敞、潔	2.1. 工作環境:工作平台須寬敞、潔	於M-PA-C洋
淨、光線良好,操作平台光度為 100	净、光線良好,操作平台光度為 100 呎	菜培養基之
呎燭光以上,密閉室內換氣良好,儘	燭光以上,密閉室內換氣良好,儘可能	培養溫度。
可能沒有灰塵及流動空氣。每15分鐘	沒有灰塵及流動空氣。每 15 分鐘落菌	六、增修訂部分
落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。	數不得超過 15 CFU/培養皿。	文字。
2.2. 器具及材料	2.2.器具及材料	
2.2.1. 乾熱滅菌器。	2.2.1. 乾熱滅菌器。	
2.2.2. 高壓滅菌釜。	2.2.2. 高壓滅菌釜。	
2.2.3. 冰箱:能維持 5±3℃者。	2.2.3. 冰箱:能維持 5±3℃者。	
2.2.4. 培養箱:能維持內部溫度溫差	2.2.4. 培養箱:能維持內部溫度溫差±	
±1.0℃以內者。	1.0℃以內者。	
2.2.5. 天平: 可稱量到 2000 g, 靈敏	2.2.5. 天平:可稱量到 2000 g, 靈敏度	
度為 0.1 g; 可稱量到 120 g, 靈敏度	為 0.1 g; 可稱量到 120 g, 靈敏度為 5	
為 5 mg。	mg °	
2.2.6. 薄膜過濾裝置:可放置過濾薄	2.2.6. 薄膜過濾裝置:可放置過濾薄膜	
膜之漏斗及真空固定支架基座,漏斗	之漏斗及真空固定支架基座,漏斗應具	
應具無菌性或可滅菌性。	無菌性或可滅菌性。	
2.2.7.旋渦混合器(Vortex mixer)。	2.2.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。	
2.2.8. 濾膜:孔徑 0.45 μm 之硝化纖維	2.2.8. 濾膜:孔徑 0.45 μm 之硝化纖維	
過濾薄膜(水質檢驗用、白色、有格	過濾薄膜(水質檢驗用、白色、有格子、	
子、已殺菌)或同級品,適用於 2.2.6.	已殺菌)或同級品,適用於2.2.6.節之薄	
節之薄膜過濾裝置者。	膜過濾裝置者。	
2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。	2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。	
2.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)。	2.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)。	
2.2.11. 吸管(Pipette):已滅菌,1 mL	2.2.11. 吸管(Pipette):已滅菌。1 mL 吸	
吸管應有 0.01 mL 之刻度;5 及 10 mL	管應有 0.01 mL 之刻度;5 mL 及 10 mL	
吸管應有 0.1 mL 刻度。	吸管應有 0.1 mL 刻度。	
2.2.12. 培養皿:已滅菌,內徑約 90	2.2.12. 培養皿:已滅菌,內徑約90	
mm,深度約15mm,或其他適當大小	mm,深度約15mm,底皿之內外面應	

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。

<u>2.2.15. 接種針及接種環(直徑約 3</u> mm): 鎳鉻合金, 鉑銥或鉻線材質, 或可拋棄式者。

2.2.16. pH 試紙: 範圍 6-8。

2.2.17.試藥:離胺酸鹽酸鹽(L-lysine· HCl)、氯化鈉、木糖(xylose)、蔗糖 (sucrose)、乳糖(lactose)、酚紅(phenol red)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、硫代硫酸鈉 (sodium thiosulfate)、硫酸鎂(MgSO₄·7H₂O)、 康斯菌素(kanamycin)及奈利啶酸 (nalidixic acid)均採用試藥級,酵母抽 出物(yeast extract)、即溶脱脂奶粉 (skim milk)、營養肉羹(nutrient broth) 及洋菜(agar)均採用微生物級。

2.2.18. 培養基

2.2.18.1. M-PA-C 洋菜培養基(M-PA-C agar)

agai)		
離胺酸鹽酸鹽(L-Lysine・	5.0 g	
HCl)		
酵母抽出物(yeast extract)	2.0 g	
氯化鈉	5.0 g	
木糖(xylose)	1.25 g	
蔗糖(sucrose)	1.25 g	
乳糖(lactose)	1.25 g	
酚紅(phenol red)	0.08 g	
檸檬酸鐵銨(ferric	0.8 g	
ammonium citrate)		
硫代硫酸鈉(sodium	5.0 g	
thiosulfate)		
硫酸鎂(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1.5 g	
康斯菌素(kanamycin)	0.008 g	
奈利啶酸(nalidixic acid)	0.037 g	
洋菜(agar)	12.0 g	
蒸餾水	1000 mL	
and the state of t		

加熱攪拌至沸騰,使培養基完全溶解 後,繼續加熱1分鐘,最終pH值為

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:離胺酸鹽酸鹽(L-lysine· HCl)、氯化鈉、木糖(xylose)、蔗糖 (sucrose)、乳糖(lactose)、酚紅(phenol red)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)、硫酸鎂(MgSO4·7H2O)、 康斯菌素(kanamycin)及奈利啶酸 (nalidixic acid)均採用試藥級,酵母抽出 物(yeast extract)、即溶脫脂奶粉(skim milk)、營養肉羹(nutrient broth)及洋菜 (agar)均採用微生物級。

2.2.17. 培養基

2.2.17.1. M-PA-C 洋菜培養基(M-PA-C agar)

離胺酸鹽酸鹽(L-Lysine·	5.0 g
HCl)	
酵母抽出物(yeast extract)	2.0 g
氯化鈉	5.0 g
木糖(xylose)	1.25 g
蔗糖(sucrose)	1.25 g
乳糖(lactose)	1.25 g
酚紅(phenol red)	0.08 g
檸檬酸鐵銨(ferric	0.8 g
ammonium citrate)	
硫代硫酸鈉(sodium	5.0 g
thiosulfate)	
硫酸鎂(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1.5 g
康斯菌素(kanamycin)	0.008 g
奈利啶酸(nalidixic acid)	0.037 g
洋菜(agar)	12.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌至沸騰,使培養基完全溶解 後,繼續加熱1分鐘,最終pH值為7.2 7.2±0.1,分裝於培養皿中。

2.2.18.2. 牛乳洋菜培養基(Milk agar)

混合液 A	
即溶脫脂奶粉 (skim	100 g
milk)	
蒸餾水	500 mL
混合液 B	
營養肉羹(nutrient broth)	12.5 g
氯化鈉	2.5 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

混合液 A 完全溶解後,於 115℃滅菌 20 分鐘;混合液 B 完全溶解後,則於 121℃滅菌 15 分鐘,待冷卻至 55℃,於無菌狀況下混合,分裝於培養皿中。 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 0.45 μm 之硝化纖維濾膜減壓過濾。
- 2.5. 培養:經 2.4.節過濾後之薄膜, 取出放置於 M-PA-C 洋菜培養基上, 倒置,於 42℃培養 24 小時。
- 2.6. 觀察:經培養後,觀察有否菌落 生成,若有直徑在 0.8 至 2.2 mm,呈 扁平狀,中央呈褐色至墨綠色,邊緣 光亮之菌落,為典型菌落。
- 2.7. 確認試驗:挑選3~5個典型菌落 進行確認試驗,將分離之典型菌落接 種至牛乳洋菜培養基,劃2至4cm長 度之線,於35℃培養24小時。如能 水解牛乳之酪蛋白(casein)而呈黃至綠 色之擴散者,即為綠膿桿菌。
- 2.8. 計數:按照確認試驗所得結果, 依確定之比率計算綠膿桿菌之估計 值,以 CFU/100 mL表示。
- 2.9. <u>如</u>使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統,<u>其</u>檢驗結果有爭議時,以本檢驗方法為準。

±0.1,分裝於培養皿中。

2.2.17.2. 牛乳洋菜培養基(Milk agar)

混合液 A	
即溶脫脂奶粉 (skim	100 g
milk)	
蒸餾水	500 mL
混合液 B	
營養肉羹(nutrient broth)	12.5 g
氯化鈉	2.5 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL
	0

混合液 A 完全溶解後,於 115℃滅菌 20 分鐘;混合液 B 完全溶解後,則於 121℃滅菌 15 分鐘,待冷卻至 55℃,於無菌狀況下混合,分裝於培養皿中。 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 0.45 μm 之硝化纖維 濾膜真空過濾。
- 2.5. 培養:經 2.4.節過濾後之薄膜,取 出放置於 M-PA-C 洋菜培養基上,倒 置,於 41.5°C培養 24 小時。
- 2.6. 觀察:經培養後,觀察有否菌落生成,若有直徑在 0.8 至 2.2 mm,呈扁平狀,中央呈褐色至墨綠色,邊緣光亮之菌落,為典型菌落。
- 2.7. 確認試驗:挑選 3~5 個典型菌落進行確認試驗,將分離之典型菌落接種至牛乳洋菜培養基,劃2至4 cm 長度之線,於35℃培養24小時。如能水解牛乳之酪蛋白(casein)而呈黃至綠色之擴散者,即為綠膿桿菌。
- 2.8. 計數:按照確認試驗所得結果,依確定之比率計算綠膿桿菌之估計值,以 CFU/100 mL表示。

檢驗流程圖

檢體以 0.45 μm 之硝化纖維 濾膜減壓過濾(二重複)

濾膜<u>取出放置於</u> M-PA-C 洋菜培養基,倒置

42°C 培養 24hr

取 3~5 個典型菌落,接種至牛乳洋菜 培養基,劃 2 至 4 cm 長度之線

35℃培養 24 hr

依確認試驗之比率,計算線膿桿菌之 估計值,以 CFU/100 mL 表示

2.9. 檢驗流程圖

檢體 100 mL, 以 0.45 μm 之硝化纖維濾膜 真空過濾(二重複)

濾膜放入 M-PA-C 洋菜培養基, 倒置

41.5℃ 培養 24hr

取 3~5 個典型菌落,接種至牛乳洋菜培養 基,劃 2 至 4 cm 長度之綠

35℃培養 24 hr

依確認試驗之比率,計算緣膿桿菌之估計 值,以 CFU/100 mL表示

2.10. <u>可參考</u>使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統,<u>惟</u>檢驗結果有爭議時,<u>應</u>以本檢驗方法為 準。