

食品微生物之檢驗方法－糞便性鏈球菌之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms- Test of Fecal Streptococci

1. 適用範圍：本方法適用於包裝飲用水及盛裝飲用水中糞便性鏈球菌(Fecal Streptococci)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. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 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。
 - 2.2.7. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μm 之親水性醋酸纖維膜。
 - 2.2.8. 薄膜過濾裝置：可放置過濾薄膜之漏斗及真空固定支架基座，漏斗應具無菌性或可滅菌性。
 - 2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.10. 濾膜：孔徑 0.45 μm 之硝化纖維過濾薄膜(水質檢驗用、白色、有格子、已殺菌)或同級品，適用於 2.2.8. 節之薄膜過濾裝置者。
 - 2.2.11. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.12. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.13. 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。
 - 2.2.14. 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：無菌袋或有 1000 mL、500 mL、99 mL 及 90 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
 - 2.2.16. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
 - 2.2.17. pH 試紙：範圍 6-8。
 - 2.2.18. 試藥：30% 過氧化氫溶液、氯化三酚基雙偶氮

(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)、結晶紫(crystal violet)、95%乙醇、草酸銨、碘化鉀、碘、沙黃 O (safranin O)、氯化鈉、三偶氮鈉(sodium azide, NaN_3)、甘油磷酸鈉(sodium glycerophosphate)、麥芽糖(maltose)、乳糖(lactose)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、七葉靈(esculin)、檸檬酸鐵(ferric citrate)、葡萄糖(dextrose)及磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)均採用試藥級，胨蛋白胨(proteose peptone)、聚蛋白胨(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)、洋菜(agar)、牛肉提取物(beef extract)、蛋白胨(peptone)、牛膽汁(oxgall)、牛腦浸出物(calf brain infusion)及牛心浸出液(beef heart infusion)均採用微生物級。

2.2.19. 試劑

2.2.19.1. 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。

2.2.19.2. 1%氯化三酚基雙偶氮溶液：取氯化三酚基雙偶氮 1 g，加蒸餾水 100 mL，攪拌溶解，以無菌濾膜過濾後，避光儲存備用，當溶液產生粉紅色時即須廢棄不可使用。

2.2.20. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註)

2.2.20.1. 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。

2.2.20.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g 置於研鉢中，經研磨 5~10 秒，加蒸餾水 1 mL 研磨，續加蒸餾水 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，將此溶液移入褐色試藥瓶，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。

2.2.20.3. 哈克氏複染液(複染劑)

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

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

2.2.21. 培養基

2.2.21.1. KF 鏈球菌洋菜培養基(KF Streptococcus agar)

胨蛋白胨(proteose peptone)或聚蛋白胨
 (polypeptone) 10 g
 酵母抽出物(yeast extract) 10 g
 氯化鈉..... 5 g
 三偶氮鈉(sodium azide, NaN_3) 0.4 g
 甘油磷酸鈉(sodium glycerophosphate) 10 g
 麥芽糖(maltose) 20 g
 乳糖(lactose) 1 g
 溴甲酚紫(bromcresol purple) 0.015 g
 洋菜(agar) 20 g
 蒸餾水..... 1000 mL
 加熱溶解，繼續加熱 5 分鐘，冷卻至 50 或 60°C，加
 已滅菌 1% 氯化三酚基雙偶氮 (2,3,5-triphenyl-
 tetrazolium chloride)溶液 10 mL，最後 pH 值為 7.2 ±
 0.2，分裝於培養皿中。

2.2.21.2. 牛膽汁七葉靈洋菜培養基(Bile esculin agar)

牛肉提取物(beef extract) 3 g
 蛋白胨(peptone)..... 5 g
 七葉靈(esculin)..... 1 g
 牛膽汁(oxgall)..... 40 g
 檸檬酸鐵(ferric citrate)..... 0.5 g
 洋菜(agar) 15 g
 蒸餾水..... 1000 mL
 加熱溶解後，於 121°C 殺菌 15 分鐘，最後 pH 值為
 6.6 ± 0.2，分裝於培養皿中。

2.2.21.3. 腦心浸出液(Brain-heart infusion broth, BHI)

牛腦浸出物(calf brain infusion) 200 g
 牛心浸出液(beef heart infusion) 250 g
 胨蛋白胨(proteose peptone) 10 g
 葡萄糖(dextrose) 2 g
 氯化鈉..... 5 g
 磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 2.5 g
 蒸餾水..... 1000 mL
 加熱溶解後，分裝於試管中，於 121°C 殺菌 15 分鐘，
 最後 pH 值為 7.4 ± 0.2。

2.2.21.4. 腦心浸出液洋菜培養基(Brain-heart infusion agar,

BHA)

牛腦浸出物(calf brain infusion)	200 g
牛心浸出液(beef heart infusion)	250 g
胨蛋白朊(proteose peptone)	10 g
葡萄糖(dextrose)	2 g
氯化鈉.....	5 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水.....	1000 mL

加熱至沸騰，使培養基完全溶解後，分裝於試管中，於 121°C 殺菌 15 分鐘，做成斜面培養基，最後 pH 值為 7.4 ± 0.2。

- 2.3. 取樣：用已滅菌之容器或無菌袋盛取檢體，取 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：以減壓過濾方式，將檢體過濾至孔徑 0.45 μm 之濾膜上。
- 2.5. 培養：經第 2.4. 節過濾後之薄膜，取出放置於 KF 鏈球菌洋菜培養基，倒置，於 35°C 培養 48 小時。
- 2.6. 觀察：經培養後，觀察有否菌落生成，暗紅或粉紅之菌落，是為典型菌落。
- 2.7. 確認試驗
 - 2.7.1. 挑選 3~5 個典型菌落進行確認試驗。
 - 2.7.2. 將 2.6. 節分離之典型菌落接種至腦心浸出液洋菜斜面培養基(BHA)，於 35°C 培養 48 小時。如生長則進行下列試驗。
 - 2.7.3. 觸酶反應(Catalase test)：由腦心浸出液洋菜斜面培養基(BHA)上取(沾)菌，塗抹於載玻片上，加 1~2 滴 3% 過氧化氫溶液，觀察有無氣泡產生，產生氣泡者為正反應，否則為負反應。糞便性鏈球菌為負反應。
 - 2.7.4. 革蘭氏染色(Gram stain)
 - (1) 加適量無菌生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)自腦心浸出液洋菜斜面培養基(BHA)上鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後迅速通過火焰 3~4 次微熱固定，勿直接火烤。
 - (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗。
 - (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘，水洗。
 - (4) 脫色：用 95% 乙醇洗至不再有紫色褪出時，再水

洗，此步驟僅約 30 秒，惟視抹片之厚薄而定。

(5) 複染：用哈克氏複染液複染 30 秒，水洗。

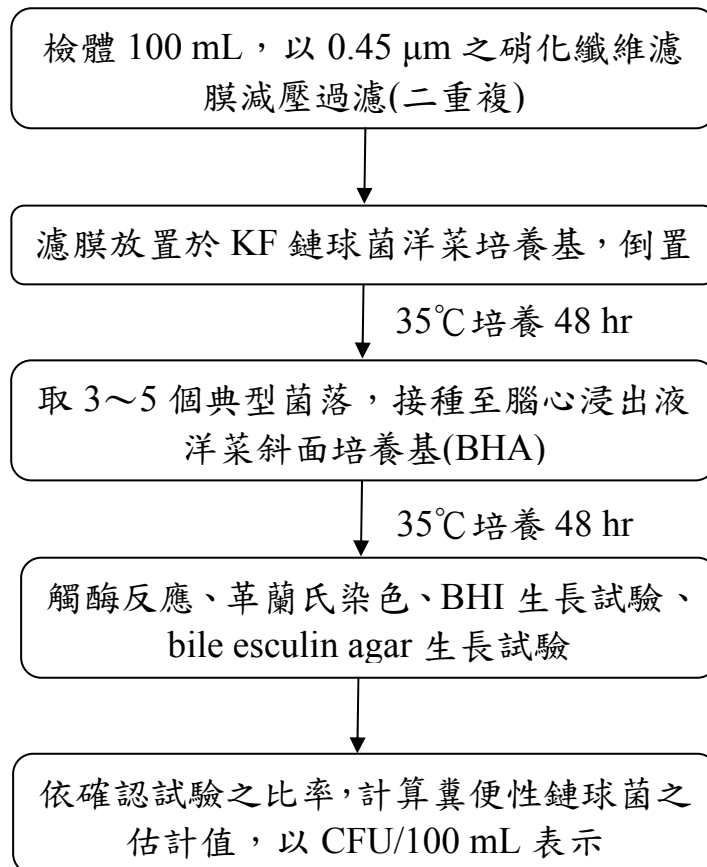
(6) 風乾。

(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。糞便性鏈球菌應為革蘭氏陽性，球菌，直徑 0.5~1.0 μm ，成對或呈短鏈。

2.7.5. 從腦心浸出液洋菜斜面培養基(BHA)上取一接種環菌量(loop)移植於腦心浸出液(BHI)中，於 45°C 培養 24~48 小時。另移植一接種環菌量至牛膽汁七葉靈洋菜培養基(bile esculin agar)中，於 35°C 培養 24~48 小時。觀察有無生長，糞便性鏈球菌可在此二培養基中生長。

2.8. 計數：復按照確認試驗所得結果，依確定之比率計算糞便性鏈球菌之估計值，以 CFU/100 mL 表示。

2.9. 檢驗流程圖



2.10. 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，應以本檢驗方法為準。