

食品微生物檢驗方法—大腸桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microbiology — Test of *Escherichia coli*

1. 適用範圍：本檢驗法適用於食品中大腸桿菌之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1. 器具及材料：

2.1.1. 乾熱滅菌器：玻璃用具等之滅菌用，其內部中心溫度能達 170 °C 以上，並維持該溫度 1 小時以上者。

2.1.2. 高壓滅菌釜：培養基及稀釋液等不能乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用，常以 121 °C (約 15 lb/in²，1 kg/cm² 或一大氣壓) 滅菌 15 分鐘以上。

2.1.3. 冰箱：保持 0 °C 至 5 °C。

2.1.4. 吸管：通常使用者為 10 ml 及 1 ml，應有 0.1 ml 之刻度。

2.1.5. 培養皿：內徑約 9 cm，深度 1.5 ~ 1.8 cm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。

2.1.6. 稀釋用容器：附蓋(栓)之 500 ml 廣口瓶或 15 × 150 mm 試管。

2.1.7. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 ± 1.0 °C 以內者。

2.1.8. 水浴：能維持水溫溫差在 ± 1.0 °C 以內者。

2.1.9. 攪拌均質器 (Blender)：能適用於無菌操作者。

2.1.10. 發酵管 (Durham fermentation tube)：外徑 9 × 22 mm，使用時倒置於 15 × 150 mm 之試管內。

2.1.11. 接種用白金針或白金耳。

2.1.12. 培養基：

2.1.12.1. 硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹 (LST-Lauryl Sulfate Tryptose Broth)

胰化蛋白胨 (Tryptose)	20 g
乳糖 (Lactose)	5 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 (NaCl)	5 g
硫酸月桂酸鈉 (Sodium lauryl sulfate)	0.1 g
蒸餾水	1000 ml

加熱溶解後，分取 9 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。

2.1.12.2. 大腸桿菌肉羹 (*Escherichia coli* Broth，簡稱 EC Broth)

胰化蛋白胨 (Tryptone)	20 g
乳糖 (Lactose)	5 g
胆汁鹽 (Bacto bile salt 3)	1.5 g
磷酸氫二鉀 (K ₂ HPO ₄)	4 g

磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	1.5 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
蒸餾水	1000 ml

溶解後，分取 5 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 6.9 ± 0.1 。

2.1.12.3. 伊紅亞甲藍瓊脂培養基 [EMB - Eosin Methylene Blue Agar (Levine)]

蛋白胨 (Peptone)	10 g
乳 糖 (Lactose)	10 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	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，每一培養皿約倒入 15 ~ 20 ml，凝固後打開皿蓋約 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$ ，使培養基之表面乾燥。已注入培養皿之培養基以當天使用最佳，在冰箱中貯存者應於使用前先檢查有無雜菌之污染。

2.1.12.4. 營養瓊脂 (Nutrient Agar)

牛肉抽出物 (Beef extract)	3 g
蛋白胨 (Peptone)	5 g
洋 菜 (Agar)	15 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 7.3 ± 0.1 ；分裝於試管者，作成斜面培養基。

2.1.12.5. 胰化蛋白胨肉羹 (Tryptone or Tryptophane Broth)

胰化蛋白胨 (Tryptone)	10 g
蒸餾水	1000 ml

溶解後，分取 5 ml 注入試管內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

2.1.12.6. 甲基紅—歐普氏培養基 (MR - VP Medium)

蛋白胨 (Peptone)	7 g
葡萄糖 (Dextrose)	5 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	5 g
蒸餾水	1000 ml

溶解後，分取 5 ml 注入試管內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

2.1.12.7. 柯塞爾氏檸檬酸鹽肉羹 (Koser's Citrate Broth)

磷酸氫銨鈉 ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.5 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	1 g
硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
檸檬酸鈉 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3 g
蒸餾水	1000 ml

大腸桿菌之檢驗

溶解後，分取 10 ml 注入試管內，以 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.7 ± 0.2 。

2.1.12.8. 煌綠乳糖胆汁肉羹 (BGLB-Brilliant Green Lactose Bile Broth, 2%)

蛋白胨 (Peptone)

乳 糖 (Lactose)

牛胆粉 (Oxgall powder)

煌綠色試劑 (Brilliant green)

蒸餾水

溶解後，分取 5 ml 注入裝有發酵管之試管內，以 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.2 ± 0.2 。

2.1.13. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀、氫氧化鈉、結晶紫 (Crystal violet)、草酸銨 (Ammonium oxalate)、碘化鉀、碘、沙黃 (Safranin)、對一二甲胺基苯甲醛 (P-Dimethylaminobenzaldehyde)、甲基紅 (Methyl red)、 α -萘酚 (α -Naphthol)、氫氧化鉀、肌酸 (Creatine)、乙醇、戊醇或異戊醇 (Amyl alcohol or isoamyl alcohol) 及鹽酸均採用試藥級，蛋白胨採用微生物級。

2.1.14. 稀釋液 (註一)：

2.1.14.1. 生理食鹽水：

取 8.5 g 氯化鈉溶於 1000 ml 蒸餾水中，分裝於稀釋用容器中，經 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0 ± 0.1 。

2.1.14.2. 磷酸緩衝溶液：

取 34 g 磷酸二氫鉀溶於 500 ml 蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1 N 氫氧化鈉溶液調節其 pH 值為 7.2，然後加蒸餾水至全量為 1000 ml，經 121℃滅菌 15 分鐘後，貯存於冰箱中，作為原液備用。

使用時取 1.25 ml 原液加蒸餾水至全量為 1000 ml，分裝於稀釋用容器中，經 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.2 ± 0.1 。

2.1.14.3. 蛋白胨稀釋液：

取 1 g 蛋白胨溶於蒸餾水中至全量為 1000 ml，分裝於稀釋用容器中，經 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0 ± 0.1 。

2.1.15. 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)：

2.1.15.1. Hucker's 結晶紫液 (初染劑)：

溶液 A：取 2 g 結晶紫溶於 20 ml 之 95% 乙醇中。

溶液 B：取 0.8 g 草酸銨溶於 80 ml 蒸餾水中。

將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後過濾，取濾液，作為初染劑。

2.1.15.2. 革蘭氏碘液 (媒染劑)：

取 2 g 碘化鉀及 1 g 碘置於研鉢中，經研磨 5~10 秒鐘後，加 1 ml 蒸餾水研磨，次加 5 ml 蒸餾水研磨，再加 10 ml 蒸餾水，研磨至碘化鉀和碘完全溶於水中，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。

2.1.15.3. Hucker's 複染液 (複染劑)：

取 2.5 g 沙黃溶於 100 ml 之 95% 乙醇中，供作複染原液。使用時，取 10 ml 原液加 90 ml 蒸餾水，作為複染液。

2.1.16. 試劑：

2.1.16.1. 柯瓦克氏試劑 (Kovacs reagent)：

取 5 g 對一二甲胺基苯甲醛溶於 75 ml 戊醇或異戊醇中，再徐徐加入 25 ml 濃鹽酸，混

合均勻後應呈黃色，並須保存於 4℃ 冰箱中。

2.1.16.2. 甲基紅指示劑：

取 0.1 g 甲基紅溶於 300 ml 之 95 % 乙醇中，然後加蒸餾水至全量為 500 ml。

2.1.16.3. 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer reagent, 簡稱 VP reagent)：

溶液 A：取 5 g α -萘酚溶於 100 ml 無水乙醇中。

溶液 B：取 40 g 氫氧化鉀溶於蒸餾水中，使成 100 ml。

2.2. 檢液之調製：

2.2.1. 檢體之處理 (註二)：

2.2.1.1. 固態檢體先適當切碎，混合均勻後，取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之稀釋液中，用攪拌均質器攪拌。攪拌方法為初以低速攪拌數秒鐘，然後高速，但攪拌的總時間不能超過 2 分鐘，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.1.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎的檢體，可用已滅菌之藥勺或其他方便使用的用具加以粉碎，並混合均勻。取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之稀釋液中，即為 10 倍稀釋檢液。

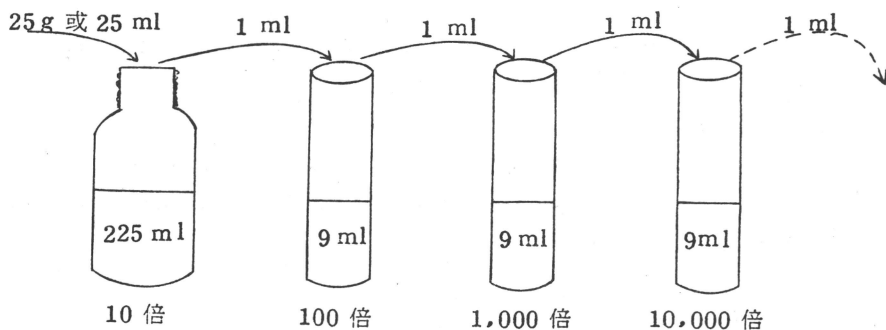
2.2.1.3. 液態檢體可用振搖的方式，使充分均勻混合後，取 25 ml 加入 225 ml 已滅菌之稀釋液中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.1.4. 冷凍檢體若須解凍者，如冷凍魚 (畜) 肉、蔬果、水餃等，最好放在冷藏之溫度下解凍 (如 2~5℃, 18 小時內即可解凍完全)；另外亦可使用更高的溫度快速解凍 (即放在 45℃ 以下的水浴中，可於 15 分鐘內解凍者)，解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體的解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之稀釋液中，用攪拌均質器攪拌 (攪拌方法同 2.2.1.1. 節)，即為 10 倍稀釋檢液。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 25 g 加入 225 ml 已滅菌之稀釋液中，用攪拌均質器攪拌 (攪拌方法同 2.2.1.1. 節)，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.1.5. 凝態及濃稠液態檢體如布丁、煉乳等，經適當攪拌均勻後，取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之稀釋液中，用攪拌均質器攪拌 (攪拌方法同 2.2.1.1. 節)，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.2. 檢液之處理：

分別使用滅菌之吸管，依序作成一系列適當之 100 倍、1000 倍、10000 倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



2.3. 鑑別試驗：

2.3.1. 推定試驗：

2.2. 節之稀釋檢液及 (或) 原液 (註三) 充分振搖、混合均勻後，分別吸取 1 ml 接種於

大腸桿菌之檢驗

已裝有 9 ml 硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹試管中，每稀釋檢液各接種 3 支（稱三階三支），並置於 35℃ 培養箱中培養 24 ± 2 小時，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，繼續培養 24 小時。若仍無氣體產生者，即為大腸桿菌陰性；產生氣體者，則為可疑大腸桿菌陽性。

2.3.2. 確定試驗：

2.3.2.1. 由上述產生氣體之每一試管中取一白金耳量接種於另一支大腸桿菌肉羹中，並置於 45.5℃ 培養箱中培養 24 ± 2 小時，觀察是否產生氣體，未產生氣體者，繼續培養 24 小時。若仍無氣體產生者，即為大腸桿菌陰性，產生氣體者，則為可疑大腸桿菌陽性。

2.3.2.2. 由產生氣體之試管中取一白金耳量培養液，在伊紅亞甲藍瓊脂培養基表面作劃線培養，於 35℃ 培養箱中培養 18～24 小時，觀察所形成菌落之生長狀態，並自伊紅亞甲藍瓊脂培養基上鈎取直徑 2～4 mm，頂部凸狀，中央黑紫色，具有金屬光澤之菌落，移植於營養瓊脂斜面上，於 35℃ 培養箱中培養 18～22 小時，作革蘭氏染色（註四）後鏡檢，其結果若為革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌者，則繼續進行 IMViC 試驗。

2.3.2.3. IMViC 試驗（註五）：

2.3.2.3.1. 吲哚試驗（Indole test）：

自營養瓊脂斜面上鈎菌接種於胰化蛋白胨肉羹中，並置於 35℃ 培養箱培養 24 ± 2 小時後，加入 0.2 ml 柯瓦克氏試劑，輕輕搖動後靜置 10 分鐘，若上層呈現紅色，則為正反應（+）；否則為負反應（-）。大腸桿菌通常為正反應，有時亦呈負反應。

2.3.2.3.2. 歐普氏試驗（VP test）：

自營養瓊脂斜面上鈎菌接種於甲基紅—歐普氏培養基中，並置於 35℃ 培養箱培養 48 ± 2 小時後，取 1 ml 培養液至另一已滅菌之試管中，加入 0.6 ml 歐普氏試劑之溶液 A 及 0.2 ml 歐氏試劑之溶液 B 後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，經 2～4 小時後觀察結果，若呈現粉紅色，則為正反應（+）；否則為負反應（-）。大腸桿菌為負反應。

2.3.2.3.3. 甲基紅試驗（MR test）：

將 2.3.2.3.2. 節剩餘之甲基紅—歐普氏培養液再培養 48 ± 2 小時後，加入 0.3 ml 甲基紅指示劑，輕輕搖勻，若仍為紅色，則為正反應（+）；否則為負反應（-）。大腸桿菌為正反應。

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

自營養瓊脂斜面上鈎菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽肉羹中，並置於 35℃ 培養箱培養 72～96 小時後，若呈現混濁狀，則為正反應（+）；若仍維持原澄清狀，則為負反應（-）。大腸桿菌為負反應。

2.3.2.4. 乳糖產氣試驗：

自營養瓊脂斜面上鈎菌接種於煌綠乳糖胆汁肉羹中，並置於 35℃ 培養箱培養 48 ± 2 小時內，若產生氣體者，則為正反應（+）；若未產生氣體者，則為負反應（-）。大腸桿菌為正反應。

2.4. 判定：

2.4.1. 大腸桿菌陽性者應符合下列之試驗結果：

(1) 革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌者。

	吲哚試驗	甲基紅試驗	歐普氏試驗	檸檬酸鹽利用試驗	
(2) IMViC 試驗其結果為	+	+	-	-	者。
	-	+	-	-	

(3)乳糖產氣試驗爲正反應者。

2.4.2. 最確數 (Most Probable Number, 簡稱MPN) :

由 2.4.1. 節判定爲大腸桿菌陽性者之各階硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹產氣之試管數, 利用最確數表 (如附表), 推算出大腸桿菌之最確數 (MPN/g 或 MPN/ml)。

(註一): 除肉製品使用蛋白胨稀釋液外, 其他檢體通常使用之稀釋液爲磷酸緩衝溶液, 其次爲生理食鹽水。

(註二): 處理含油脂量多, 不易勻散及易起泡沫之檢體時, 應加入適量之滅菌乳化劑 (如 Triton X-100, Tergitol Anionic 7 或 1% Tween 80 等), 並充分振搖, 使之乳化。

(註三): 除液態檢體外, 其他檢體以 2.1.14. 節之稀釋液作成 10 倍稀釋檢液, 再取 10 ml 當作原液 1 ml。

(註四): 革蘭氏染色方法:

(1)製作抹片。

(2)初染: 將已固定之抹片用 Hucker's 結晶紫液染 1 分鐘後, 水洗。

(3)媒染: 加革蘭氏碘液作用 1 分鐘後, 水洗。

(4)脫色: 用 95% 乙醇洗至不再有紫色褪出時, 再以自來水沖洗。此步驟需時甚短, 僅數秒鐘即可, 惟視抹片之厚薄而定。

(5)複染: 用 Hucker's 複染液複染 30 秒鐘, 水洗。

(6)自然乾燥。

(7)鏡檢: 呈現深紫色者爲革蘭氏陽性菌, 呈現紅色者爲革蘭氏陰性菌。

(註五): IMViC 試驗:

用以鑑別大腸桿菌之一連串試驗。I 表示吲哚試驗; M 表示甲基紅試驗; V 表示歐普氏試驗, i 爲諧音字, C 表示檸檬酸鹽利用試驗。

3. 參考文獻:

1. M. L. Speck, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (1976). APHA Inc.
2. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. (1979). FDA, U. S. Department of Health, Education, & Welfare.
3. 日本衛生試驗法註解 (1980) 日本藥學會編。
4. F. S. Thatcher and D. S. Clark Microorganisms in Foods. (1968).

大腸桿菌之檢驗

附表：最確數表

正 反 應 試 管 數			MPN/100ml	95 % 信 賴 界 限	
10 ml	1 ml	0.1 ml		下 限	上 限
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
0	2	0	— —		
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
2	3	0	— —		
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	≥2,400		

計算公式： $\frac{\text{表中之MPN數}}{100} \times \text{中間試管之稀釋倍數} = \text{MPN/g (ml)}$

例：連續三階之稀釋倍數 $10^2 - 10^3 - 10^4$

正反應試管數 $3 - 1 - 0$

表中之 MPN 數 43

代入計算公式，求得每公克或每公撮檢體中之最確數為

$$\frac{43}{100} \times 10^3 = 430/\text{g (ml)}$$