

食品微生物之檢驗方法－腸桿菌科之檢驗

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：可達121°C以上者。
 - 2.2.3. 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^\circ\text{C}$ 者。
 - 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. 攪拌均質器或鐵胃：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100 g者，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.9. 旋渦混合器。
 - 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.11. 加熱器。
 - 2.2.12. 吸管輔助器或微量分注器。
 - 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. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。
 - 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、鉑鈹或鉻線材質，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)、磷酸二鉀(K_2HPO_4)、葡萄糖、*N,N,N',N'*-四甲基對苯二胺鹽酸鹽 (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)、聚山梨醇酯80 (polysorbate 80, Tween 80)、中性紅(neutral red)、溴瑞香草酚藍(bromothymol blue)、結晶紫(crystal violet)及礦物油(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)及酵母抽出物(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*N,N,N',N'*-四甲基對苯二胺鹽酸鹽1 g，溶於蒸餾水100 mL，保存於褐色瓶，冷藏備用，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及磷酸二氫鉀1.5 g，溶於蒸餾水使成為1000 mL，分裝於容器，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. 紫紅膽鹽葡萄糖培養基(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，分裝於容器，加熱使其沸騰1分鐘，最終pH

值為 7.4 ± 0.2 ，並且冷卻至 $47 \sim 50^\circ\text{C}$ 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，分裝於容器，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 $15 \sim 18$ 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(K_2HPO_4).....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 。

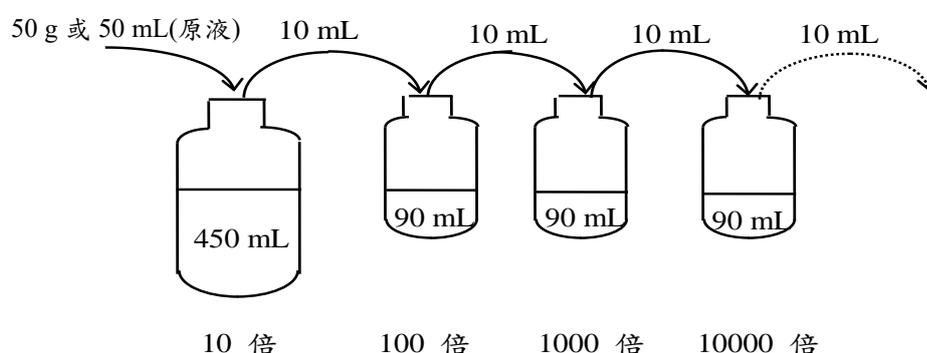
2.3. 檢液之調製^(註1,註2)

- 2.3.1. 固態檢體：將檢體適當切碎、混勻後，取50 g，加入BPW緩衝液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.2. 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、混勻後，取50 g，加入BPW緩衝液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.3. 液態檢體：將檢體混勻後，取50 mL，加入BPW緩衝液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.4. 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 $2 \sim 5^\circ\text{C}$ ，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(如 45°C 以下之水浴，15分鐘內解凍者)。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50 g，加入BPW緩衝液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等檢體，經適當攪拌混勻後，取50 g，加入BPW緩衝液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.6. 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，加入稀釋液90 mL，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。



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Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。

註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，各檢液至少做二重複。

2.4.1.3. 各培養皿中倒入已冷卻至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VRBG培養基5~10 mL，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平板培養基後倒置，於37°C培養24±2小時，供後續生化試驗用。

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.節劃線培養於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.節劃線培養於NA平板培養基之單一菌落(避免使用鎳鉻製品)，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.節計算其菌數。

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.節判定計算可疑菌落中含有腸桿菌科之比率(R，見下列公式)，再以2.6.2.或2.6.3.節公式計算檢體中腸桿菌科菌數。

$$\text{比率}(R) = \frac{N_1}{N_0}$$

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檢體中腸桿菌科菌數(CFU/g或CFU/mL)。計算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，依下列公式計算檢體中腸桿菌科菌數(CFU/g或CFU/mL)。

$$\text{腸桿菌科菌數(CFU/g 或 CFU/mL)} =$$

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

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

附註：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：

International Organization for Standardization. 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

