

「微生物基礎檢驗方法與基準」

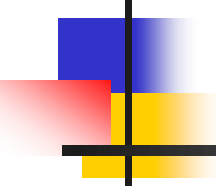
社團法人中華民國學名藥協會

溫國慶

(台中) 集思新烏日會議中心 3樓會議室 (111/11/23)

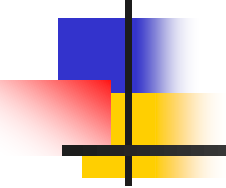
(高雄) 蓮潭國際文教會館 國際一廳 (111/11/30)

(台北) 集思交通部會議中心 國際會議廳 (111/12/05)



內容

- 前言
- 化粧品微生物法規規範與容許量基準
- 微生物檢驗方法適用性及抑菌性
- 培養基效能試驗及紀錄
- 好氣性生菌數、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、
綠膿桿菌及白色念珠菌之檢驗與紀錄
- 結語



前言

檢測前準備事項

■ 設備

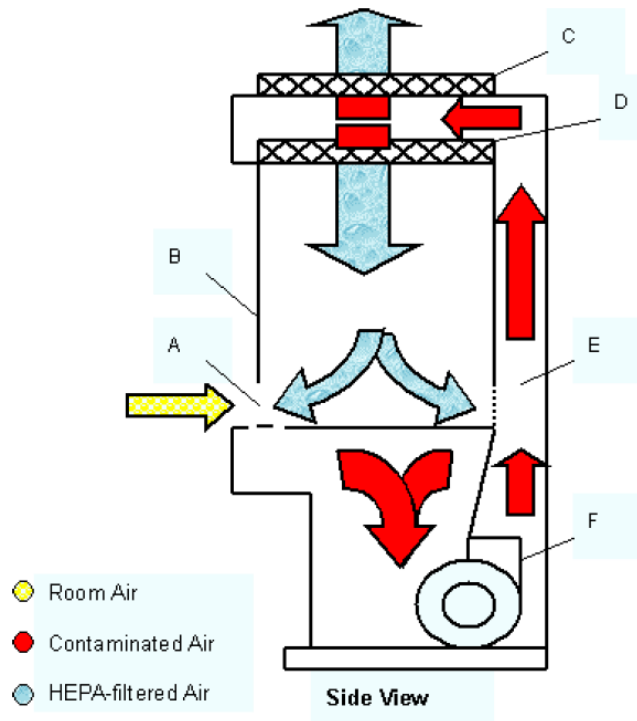
1. 天平
2. 無菌操作台 (Laminar Flow), 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
3. 高壓滅菌釜 (Autoclave)
4. 培養箱 (Incubator)
5. pH 測定儀

■ 培養基配製－

應有紀錄與標示：

(培養基名稱、批次號碼、製備日期、有效期限.....)

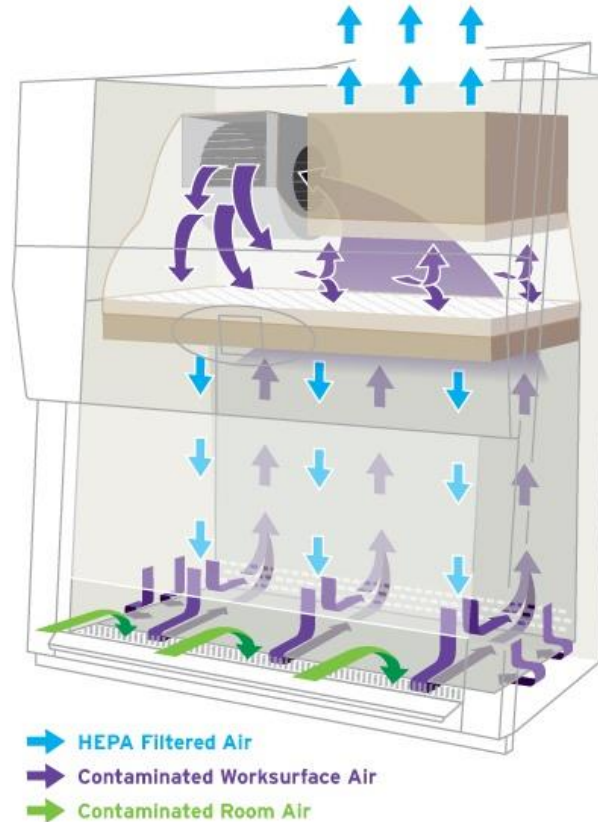
Class II / A1 BSC



- A. 視窗開口
- B. 視窗
- C. 排氣HEPA FILTER
- D. 供氣HEPA FILTER
(Supply HEPA filter)
- E. 後氣室(Rear plenum)
- F. 風機

Class II, Type A2

Air In-flow 70% Recirculated vs. 30% Exhausted



化粧品微生物法規規範與容許量基準

第51條

- **抽樣及測試**，應使用明確、適當且可行之試驗方法。
- **允收基準**，由品質管制實驗室依原料、包裝材料、半成品及成品之種類、特性定之。

解說

- 允收基準之建立，依**原料**、包裝材料、**半成品**及**成品**之種類、特性定之。
- 允收基準宜考量外觀、顏色、關鍵項目（影響品質）、使用限制表（特定用途、防腐劑、抗菌劑）成分之含量、**微生物**等項。

微生物試驗相關規定：

- 培養基及試驗方法選用應有**適用性**評估，若使用「**化粧品中微生物檢驗方法**」、「**藥典**」或其他國際標準（ISO、FDA、EU），得減免評估。
- 檢品製備或調製應評估其**抑菌性**（如檢品稀釋或中和）。
- 培養基應有**效能試驗**資料（得以 CoA 取代）。
- 微生物試驗應納入**陰性對照**同步執行，總生菌數試驗應有**陽性對照**資料。（每一試驗批）
- 若使用微生物**快篩片**、**鑑定套組**或**自行開發方法**，應一併考量前述試驗。

化粧品微生物容許量基準表修正規定

編號	產品類型	生菌數	其他規定
1	三歲以下孩童用、眼部周圍用及使用於接觸黏膜部位之化粧品	100 CFU/g 或 CFU/mL 以下	不得檢出大腸桿菌(<i>Escherichia coli</i>)、綠膿桿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)、金黃色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)或白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>)等。
2	其他類化粧品	1000 CFU/g 或 CFU/mL 以下	

微生物檢驗方法適用性及抑菌性

適用性評估

1. Factors to consider for experimental design

<i>Samples</i>	<i>Antimicrobial</i>
<i>Test controls</i>	<i>Activity/Interference</i>
<i>Microorganisms</i>	<i>pH</i>
<i>Temperature</i>	<i>Growth Phase</i>
<i>Time</i>	<i>Number of Microorganisms</i>
<i>Growth Promotion</i>	<i>Single Cultures</i>
<i>Atmosphere</i>	<i>Enzymes</i>

微生物檢驗方法適用性及抑菌性

適用性評估

2. Validation Parameters

<i>Specificity</i>	<i>Range</i>
<i>Appropriateness</i>	<i>Robustness and ruggedness</i>
<i>Accuracy</i>	<i>Limit of Detection</i>
<i>Precision</i>	<i>Limit of Determination</i>
<i>Repeatability (within test variation)</i>	<i>Linearity</i>
<i>Intermediate Precision</i>	<i>Predictive Value</i>

Tim Sandle. Approaching Microbiological Method Validation | IVT 2015

微生物檢驗方法適用性及抑菌性

■ 抑菌性

1. 化學抑制法(chemical inhibition)
2. 稀釋法(dilution)
3. 過濾法(filtration/washing)

Table — Examples of neutralizers for the antimicrobial activity of preservatives and washing liquids

Preservative	Chemical compounds able to neutralize the antimicrobial activity of preservatives
Phenolic substances: Parabens, phenoxyethanol, phenylethanol, etc. Anilides	Lecithin Polysorbate 80 Fatty alcohol ethylene oxide condensate Non-ionic surfactants
Quaternary ammonium salts Cationic surfactants	Lecithin, saponin, polysorbate 80, sodium dodecylsulphate Fatty alcohol ethylene oxide condensate

表二 各種去除干擾物質之常用中和劑或方法

干擾物質	可選用之中和劑或方法
戊二醛 (glutaraldehyde)、汞劑 (mercurials)	亞硫酸氫鈉 (Sodium hydrogen sulfite, Sodium bisulfite)
酚類 (Phenolics)、乙醇 (alcohol)、醛類 (aldehydes)、山梨酸 (sorbate)	將檢品稀釋
醛類 (aldehydes)	甘胺酸 (Glycine)
四級銨化合物 (Quaternary ammonium compounds, QACs)、對羥基苯甲酸酯類 (parahydroxybenzoates, parabens)、二雙胍類 (bis-biguanides)	卵磷脂 (Lecithin)
四級銨化合物、碘 (iodine)、對羥基苯甲酸酯類	油酸聚醇山梨酯 (Polysorbate)
汞劑	硫酸乙醇酸鹽 (Thioglycollate)
汞劑、鹵素 (halogens)、醛類	硫代硫酸鹽 (Thiosulfate)
乙二胺四乙酸 (EDTA, edetate)	鎂或鈣離子 (Mg or Ca ions)

培養基效能試驗及紀錄

微生物名稱	培養基效能試驗 (參考中華藥典)	
	好氣性生菌數	酵母菌與黴菌總數
金黃色葡萄球菌	Modified Lethen agar (MLA) 及 Modified Lethen broth, MLB < 100 cfu, 30 ± 2 °C, 48 hr	
綠膿桿菌	Modified Lethen agar (MLA) 及 Modified Lethen broth, MLB < 100 cfu, 30 ± 2 °C, 48 hr	
枯草桿菌	Modified Lethen agar (MLA) 及 Modified Lethen broth, MLB < 100 cfu, 30 ± 2 °C, 48 hr	
白色念珠菌	Modified Lethen agar (MLA) < 100 cfu, 30 ± 2 °C, 48 hr	Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDA) < 100 cfu, 32.5 ± 2.5 °C, 24-48 hr
黑麴菌	Modified Lethen agar (MLA) < 100 cfu, 30 ± 2 °C, 48 hr	Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDA) < 100 cfu, 32.5 ± 2.5 °C, 24-48 hr

效能性試驗

- 選擇性培養基

以相對應之菌株接種，接種量 < 100 cfu $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 培養
18 ~ 24 小時 觀察是否能長菌

無菌性試驗

於 $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 恆溫培養箱中培養 18 ~ 24 小時，觀察是否有
菌落生長

培養基配製紀錄

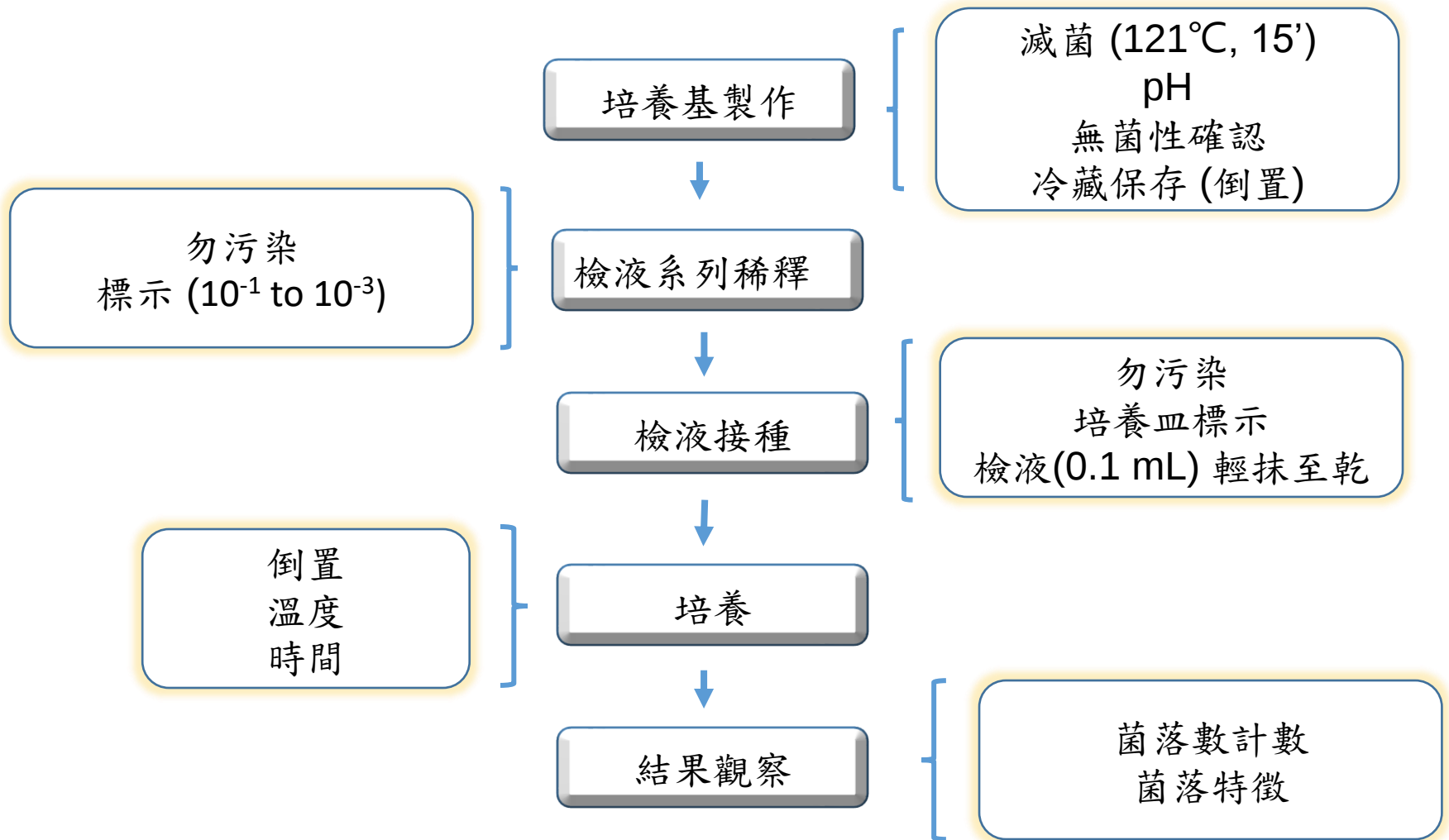
<u>名稱</u>	MLA	<u>批號:</u>	<u>配製者/日期</u>		<u>使用期限</u>	
<u>脫水培養基重量</u>	_____ g	<u>配製總體積</u>	_____ mL	<u>分裝數量</u>	_____ 皿	
<u>滅菌溫度(121°C)</u>	_____ °C	<u>時間 (15 分)</u>	起 _____ 時 _____ 分 迄 _____ 時 _____ 分	<u>pH</u> (7.2 ± 0.2)		
無菌試驗						
效能試驗 ☐ 當批首次啟用 ☐ 非首次啟用						
微生物	金黃色葡萄球菌	綠膿桿菌	白色念珠菌	黑麴菌		
判定						
結果						
<u>核對者/日期</u>						

表單編號:

好氣性生菌數、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、 綠膿桿菌及白色念珠菌之檢驗與紀錄

- 化粧品原料檢驗－可參考化粧品微生物檢驗方法或參考中華藥典方法
- 化粧品原料微生物限量請衡量產品自訂或參考原廠COA 規格
- 半成品及成品－化粧品中微生物檢驗方法

平板塗抹法操作流程



Spread Plate Technique for Colony Counting A Complete Procedure (Microbiology)

<https://www.youtube.com/watch?v=gwPZhsyMI9M>

※ 滅菌之後的液態培養基請置入塑膠袋束緊後，以事業廢棄物處理。

各種微生物培養基及條件

菌種	培養基	培養條件
好氣性生菌數	• Modified Lethen agar (MLA)	30 ± 2 ° C, 48 hr
金黃色葡萄球菌	• Baird-Parker agar (BP) • Modified Lethen agar (MLA)	35 ° C, 48 hr 35 ° C, 18-24 hr
大腸桿菌	• MacConkey agar • Levine's eosin methylene blue agar (L-EMB)	35 ° C, 24 hr 35 ° C, 24 hr
綠膿桿菌	• MacConkey agar • Ceftrimide agar	35 ° C, 24 hr 35 ° C, 24 hr
白色念珠菌	• Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDA)	32.5 ± 2.5 ° C, 24-48 hr

★固體培養基再融化不超過1次，以免影響其效能

★融化的培養基儲存不應超過 8 小時

微生物限量試驗標準菌株

藥典建議之品管標準菌株名稱	ATCC 編號	BCRC 編號
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	BCRC 11634
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	BCRC 12154
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	BCRC 11633
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	BCRC 21538

ATCC: American Type Culture Collection

BCRC: Bioresource Collection and Research Center

Scheme for Enumeration, Isolation, and Identification of Cosmetic Microbes

- Sample preparation.
- Dilute prepared samples in MLB.
- Spread duplicate 0.1 ml samples on..

(a)	(b)	(c)	(d)
MLA 48h, 30°C	PDA (or MEA) with chlortetracycline 7 days, 30°C	BP (or VJ) agar 48h, 35°C (optional)	Anaerobic agar MLA 2-4 days, 35°C

- Enrich MLB dilutions for 7 days, at 30°C. Purify growth only if no colonies on MLA.
- Count colonies and subculture different colony types on MLA and MacConkey agar (and BP or VJ agars if used in c, above). For fungal isolates, **see** text.
- Determine Gram reaction, cell shape, and catalase production of purified isolates.
- Proceed with identification of bacterial isolates as described in text, or use identification kits.

好氣性生菌數之檢驗 (Test of Aerobic Plate Count)

液態檢體

- ↓ 精確稱取檢體1 mL →滅菌試管
- ↓ MLB 9 mL混勻
- ↓ 10倍稀釋檢液

固態與粉末檢體

- ↓ 精確稱取檢體1 g →滅菌試管
- ↓ Tween 80 1 mL (121°C滅菌15分鐘)
- ↓ MLB 8 mL混勻
- ↓ 10倍稀釋檢液

噴霧劑

- ↓ 噴嘴消毒
- ↓ 噴出部分檢體丟棄
- ↓ 再將檢體噴灑於稀釋瓶中
- ↓ 精確稱取檢體1 g →滅菌試管
- ↓ MLB 9 mL混勻
- ↓ 10倍稀釋檢液

無水材料類檢體

- ↓ 參照固態與粉末檢體或面霜及油脂類檢體

面霜及油脂類檢體

- ↓ 精確稱取檢體1 g →滅菌試管
- ↓ Tween 80, 1 mL (121°C滅菌15分鐘)
- ↓ 無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL 混勻
- ↓ 10倍稀釋檢液

改良式 Letheen 培養液 (Modified Letheen broth, MLB)

項次	配方	添加量
1	Letheen 培養液 (Letheen broth)	25.7 g
2	胰化酪蛋白朊 (Trypticase peptone)	5 g
3	硫蛋白朊 (Thiotone peptone)	10 g
4	酵母抽出物 (Yeast extract)	2 g
5	亞硫酸氫鈉 (NaHSO_3)	0.1 g
6	蒸餾水	1000 mL

121°C, 15', pH 7.2 $\pm$ 0.2

Letheen 培養液 (Letheen broth)

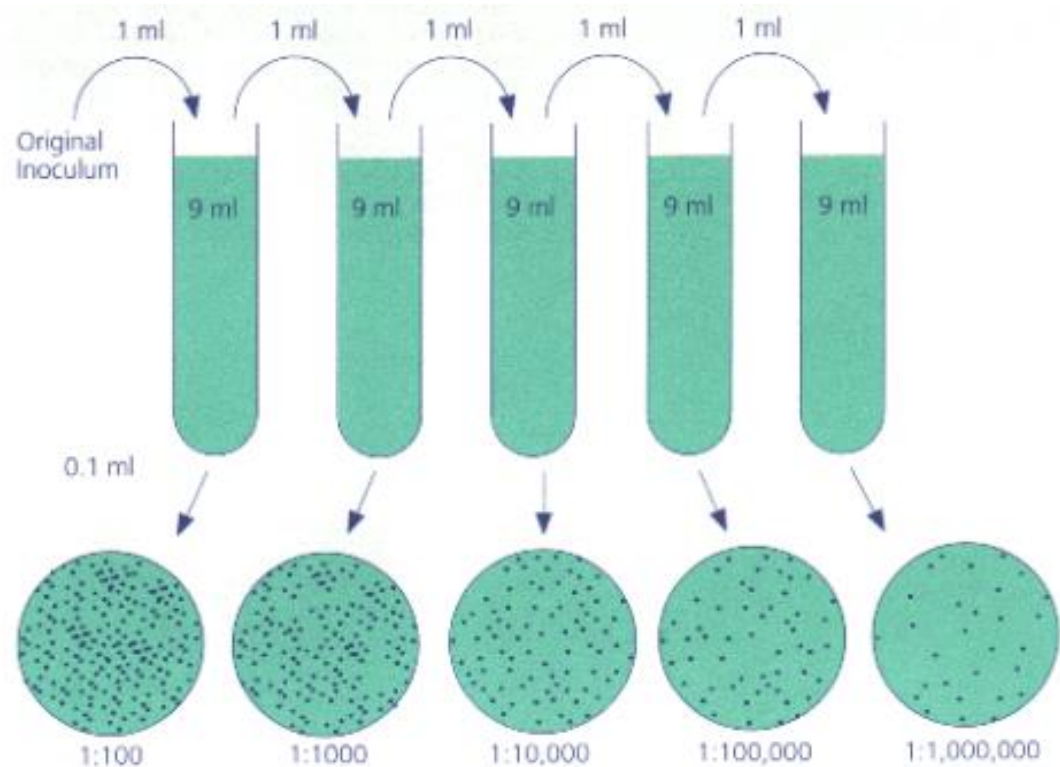
項次	配方	添加量
1	Meat Peptone	10.0 g
2	Beef Extract	5.0 g
3	Polysorbate 80	5.0 g
4	Sodium Chloride	5.0 g
5	Lecithin	0.7 g
6	Demineralized Water	1000 mL

系列稀釋檢液

↓ 取上述10倍稀釋檢液1 mL

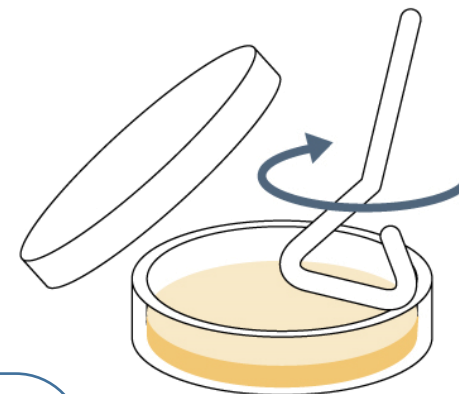
↓ 加至MLB 9 mL

↓ 依序作成 $10^2 \sim 10^6$ 系列稀釋



生菌培養

- ↓各稀釋檢液0.1 mL至MLA，以無菌曲玻棒塗抹，進行二重複
- ↓取MLB 0.1 mL至MLA，以無菌曲玻棒塗抹(空白對照組，二重複)
- ↓待檢液被培養基吸收後，將培養基倒置於
- ↓ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 hr



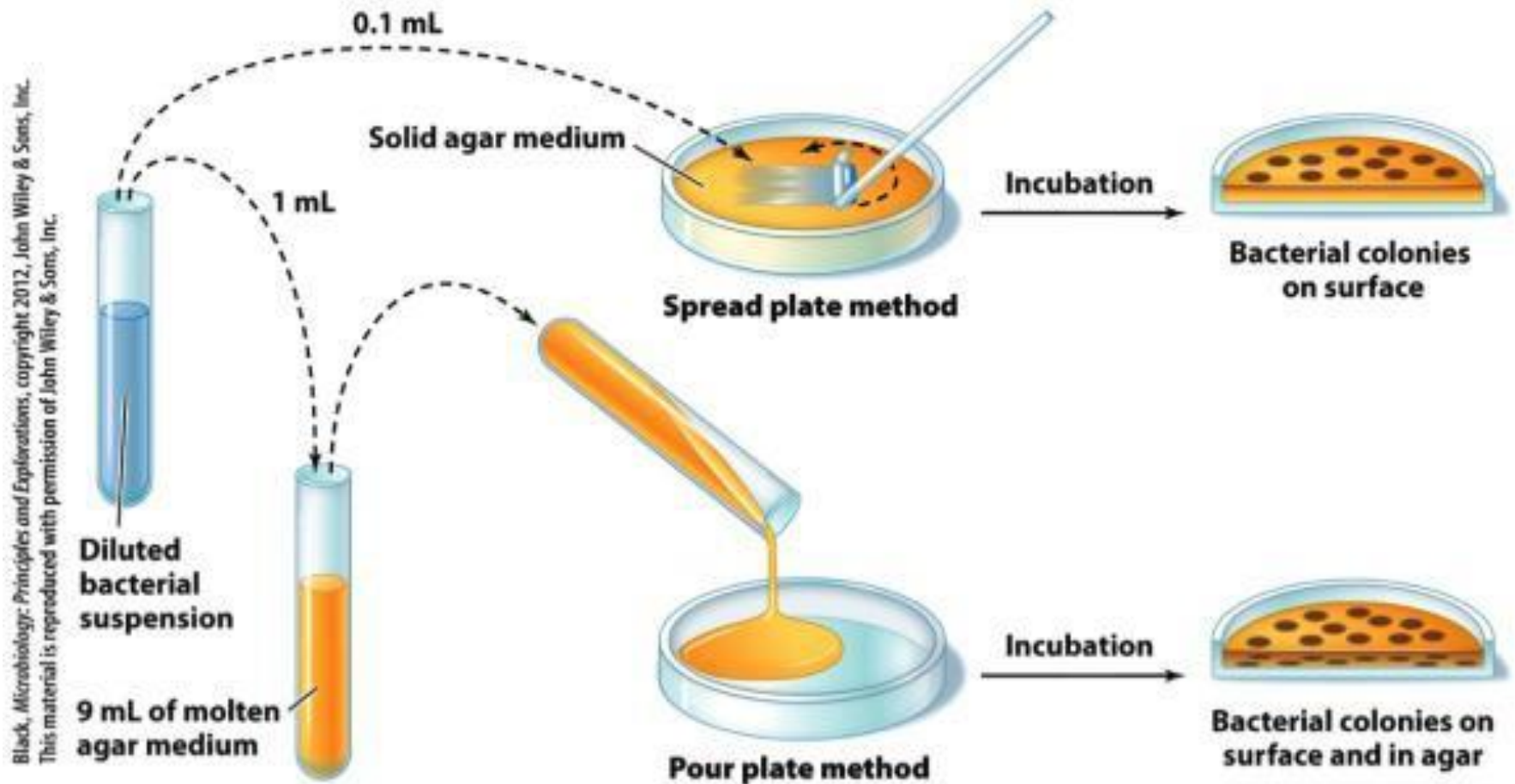
菌數之計算

- ↓選取25~250個菌落之稀釋倍數平板來
- ↓將該稀釋倍數之兩個平板之菌落數平均值乘其稀釋倍數
- ↓即得其生菌數，單位為CFU/g或CFU/mL

改良式 Letheen 培養基 (Modified Letheen agar, MLA)

項次	配方	添加量
1	Letheen 洋菜 (Letheen agar)	32 g
2	胰化酪蛋白朊 (Trypticase peptone)	5 g
3	硫蛋白朊 (Thiotone peptone)	10 g
4	酵母抽出物 (Yeast extract)	2 g
5	氯化鈉	5 g
6	亞硫酸氫鈉 (NaHSO_3)	0.1 g
7	洋菜 (Agar)	5 g
8	蒸餾水	1000 mL

121°C, 15', pH 7.2 ± 0.2



<https://m.yao51.com/jiankangtuku/fnsknmpy.html>

菌落計數計 (Colony Counter)



<http://www.suntex.com.tw/en/ProductDetailInfo.php?brand=176&cate=178&pid=194>

總生菌數之結果計算

◆ 案例

10X 培養皿 0, 0 結果 < 100 cfu/g

◆ 案例

10X 培養皿 1, 1 平均1 結果 = 100 cfu/g (1.0×10^2 cfu/g)

◆ 案例

100X 培養皿 130, 120 平均 125

1000X 培養皿 38, 54 平均 46

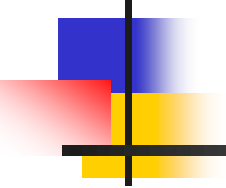
結果 $(125 \times 1,000 + 46 \times 10,000) \div 2 = 292,500$ (2.9×10^5 cfu/g)

品名		批號		☐ 原料 ☐ 半成品 ☐ 成品		
試驗開始日期			試驗完成日期			
試驗項目			好氣性生菌數			
重/容量: _____ g/mL						
空白對照組				陽性對照組		
試驗組	培養皿	稀釋倍數			結果	
		10 ¹	10 ²	10 ³		
	1 (CFU)	2	0	0		2.5×10×10 = 2,500 ⇒ 2.5×10 ³ CFU/g
	2 (CFU)	3	0	0		
	平均值	2.5	0	0		
試驗項目			增菌試驗			
重/容量: _____ g/mL						
培養基			結果			
MLB						
MLA						
馬康奇培養基 (McConkey)						
試驗項目			金黃色葡萄球菌			
重 / 容量: _____ g/mL						
	Baird-Parker agar, (BP)		生化試驗			
菌落特徵	呈灰黑色或黑色，周邊色淡，菌落外圍依序由內而外，有不透明環及透明環環繞。		革蘭氏染色 (+/-)	觸酶試驗 (正/負)	凝固酶試驗 (正/負)	
空白對照組						
陽性對照組						
試驗組						
結果：						

試驗項目		綠膿桿菌			
重 / 容量：_____ g/mL					
	馬康奇培養 (McConkey)	溴化十六烷基三甲胺 培養基(Cetrimide agar)	生化試驗		
菌落特徵	白色菌落	有菌落生長	革蘭氏染色 (+/-)	三糖鐵 培養基 (TSI)	氧化酶試 驗(正/負)
空白對照組					
陽性對照組					
試驗組					
結果：					
生化試驗	正反應	負反應	綠膿桿菌反應	結果	
斜面	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) ^a		
底部	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) ^a		
產氣	培養基有裂縫	培養基完整	(-) ^a		
硫化氫	黑色	非黑色	(-) ^a		
42°C生長試驗	有落菌生長	無落菌生長	(+) ^a		
檸檬酸鹽試驗	混濁	澄清	(+) ^a		
丙二酸鹽試驗	藍色	綠色	(+) ^a		
精氨酸脫氨酶試驗	紫色	黃色	(+) ^a		
顏色	粉色或紅色	無變化	(+) ^a		
氣泡	有	無	(+) ^a		
螢光產生試驗	有(水溶性)	無	(+)		
色素產生試驗	有(紅色)	無	(+)		
結果：					

試驗項目		大腸桿菌		
重 / 容量：_____ g/mL				
	馬康奇培養 (McConkey)	伊紅亞甲藍培養基 (L-EMB)	生化試驗	
菌落特徵	紅色或淡粉紅色菌落	反射光下有金屬光澤 (Metallic sheen)，於透射光 下為藍黑色。	革蘭氏染色 (+/-)	
空白對照組				
陽性對照組				
試驗組				
結果：				
試驗項目		白色念珠菌		
重 / 容量：_____ g/mL				
	沙氏葡萄糖氯黴素培養基 (SDCA)	生化試驗		
菌落特徵	白色至米色菌落，表面奶油狀 隆起。	革蘭氏染色 (+/-)	發芽管實驗 (正/負)	1% 聚山梨醇酯 80 之玉米粉瓊脂 培養基培養試驗 (正/負)
空白對照組				
陽性對照組				
試驗組				
結果：				
檢驗者/日期：		品質主管/日期：		

表頭編號：



增菌試驗

經MLA培養，無菌落生長，則需進行本試驗

- ↓ 取各系列稀釋檢液(MLB)， $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，7天，每天觀察是否有細菌生長
- ↓ 所有增菌稀釋液取一接種環劃線培養於MLA及MacConkey培養基， $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，48 hr
- ↓ 進行金黃色葡萄球菌、大腸桿菌及綠膿桿菌之檢測

馬康奇培養基 (MacConkey agar)

項次	配方	添加量
1	聚蛋白朊 (Polypeptone)	3 g
2	蛋白朊 (Peptone)	17 g
3	乳糖 (Lactose)	10 g
4	膽汁鹽 (Bile salts No.3)	1.5 g
5	氯化鈉	5 g
6	中性紅 (Neutral red)	0.03 g
7	結晶紫 (Crystal violet)	0.001 g
8	洋菜 (Agar)	13.5 g
9	蒸餾水	1000 mL

121°C, 15', pH 7.2 ± 0.2

金黃色葡萄球菌之檢驗 (Test of *Staphylococcus aureus*)

鑑別試驗

分離培養

- ↓ 10倍稀釋檢液於30°C, 48 hr
- ↓ 取一環耳劃線培養於BP培養基，35°C, 48 hr，菌落為圓形，直徑2~3 mm，表面凸起、平滑、具乳酪膠狀，呈灰黑色或黑色，周邊色淡，菌落外圍依序由內而外，有不透明環及透明環環繞
- ↓ 鉤取可疑菌落劃線培養於MLA，35°C, 18~24 hr
- ↓ 生化試驗鑑定

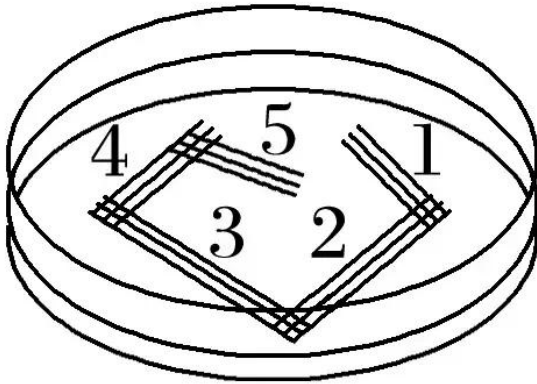
巴德派克培養基 (Baird-Parker agar, BP)

基礎培養基(basal medium)		蛋黃亞碲酸鹽強化培養液 (Egg yolk tellurite enrichment, EYT)	
配方	添加量	配方	添加量
胰化蛋白胨 (tryptone)	10 g	蛋黃: 無菌生理食鹽水	3:7
牛肉抽出物 (beef extract)	5 g	1% 亞碲酸鉀溶液	10 mL
酵母抽出物 (yeast extract)	1 g		
丙酮酸鈉 (sodium pyruvate)	10 g		
甘胺酸 (glycine)	12 g		
氯化鋰 (LiCl · 6H ₂ O)	5 g		
洋菜 (agar)	20 g		
蒸餾水	950 mL		

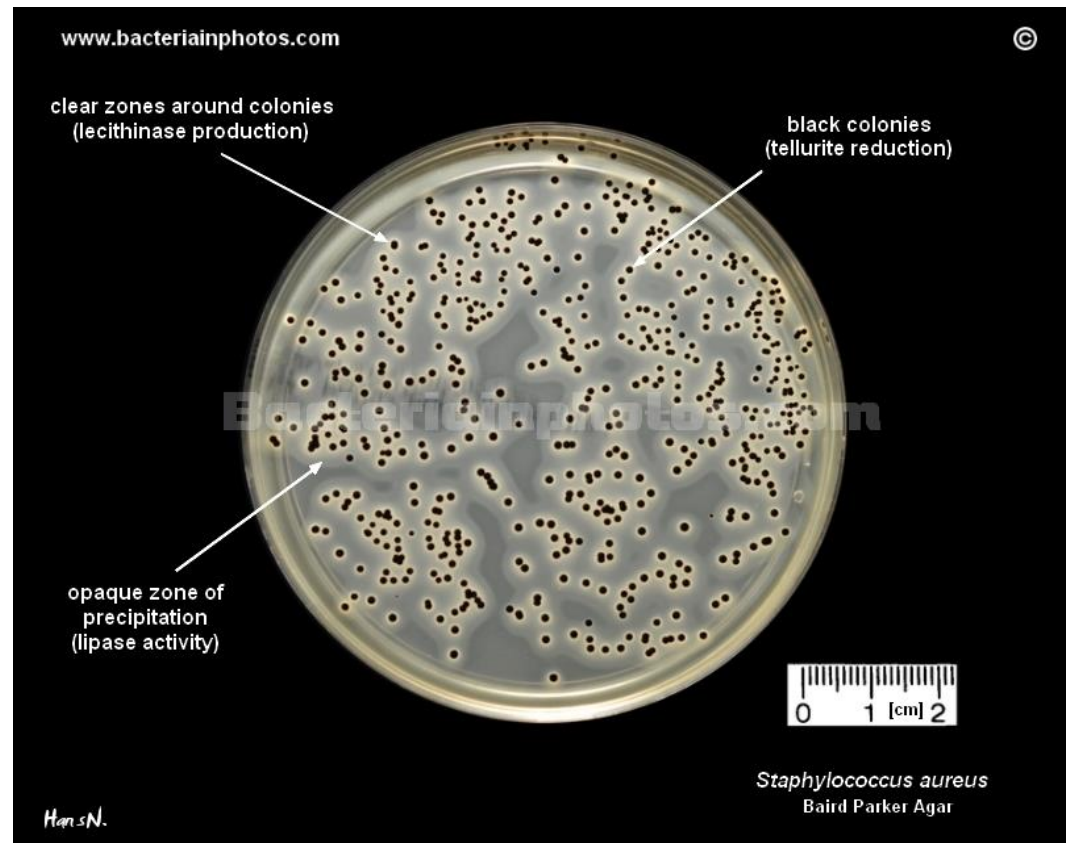
完全培養基(Complete medium)

基礎培養基：EYT= 95:5

121°C, 15', pH 7.0 ± 0.2



<https://kknews.cc/news/r9k92br.html>

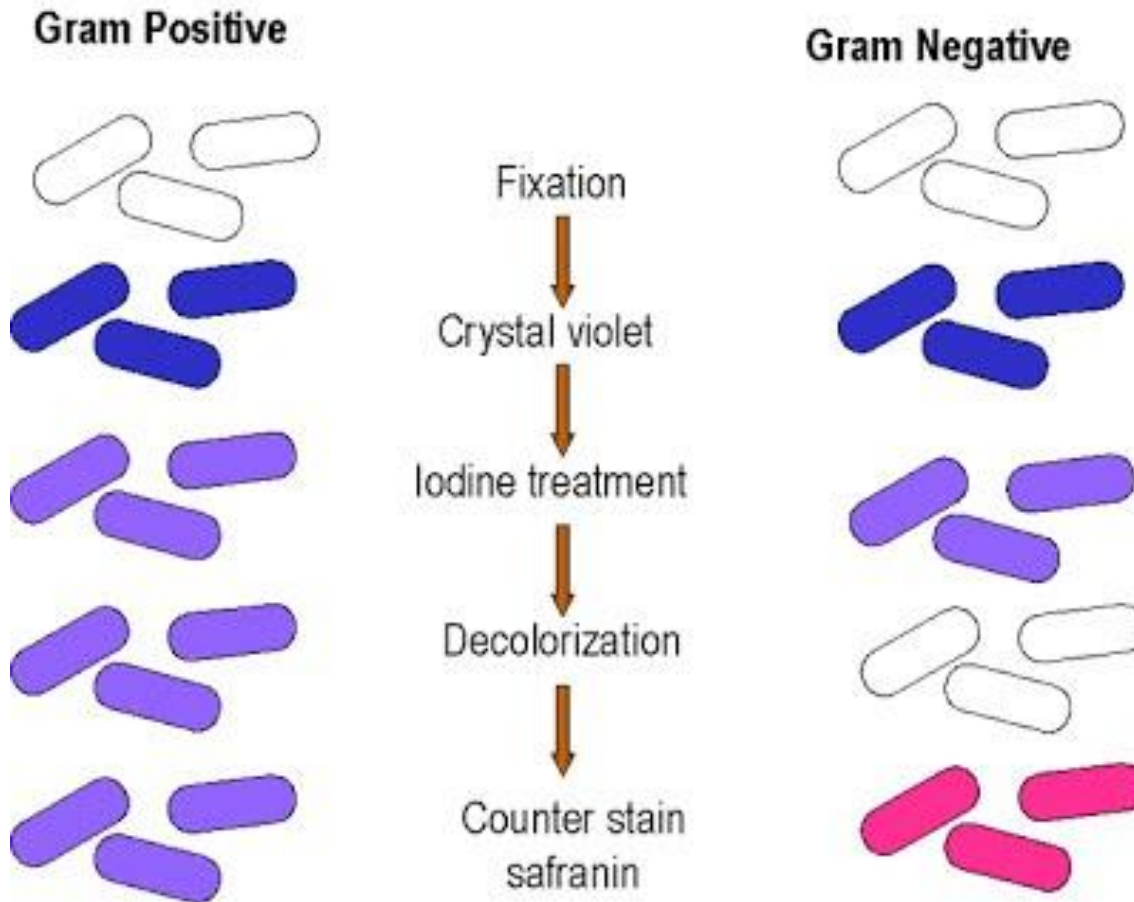


http://www.bacteriainphotos.com/baird_parker_agar.html

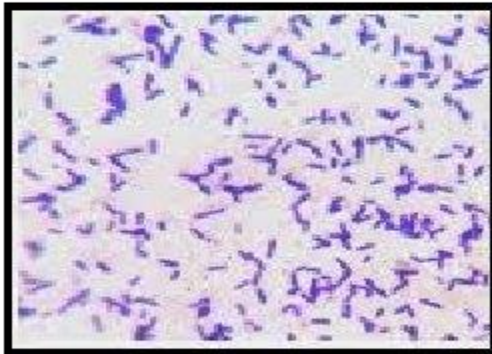
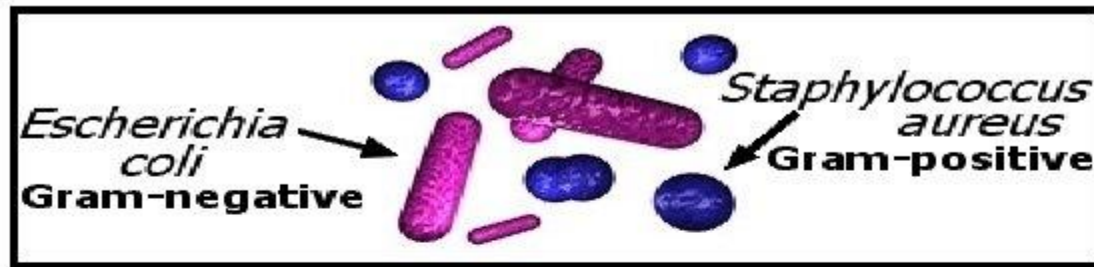
生化試驗

1. 革蘭氏染色鏡檢

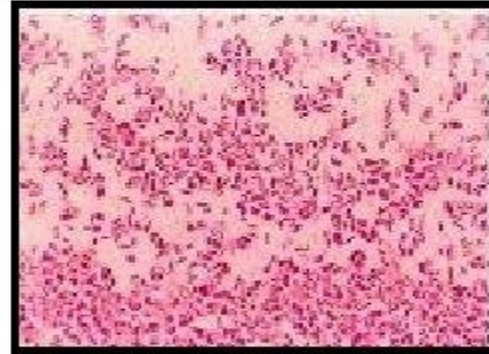
- ↓ 鉤取適當菌量，與滴在載玻片上的無菌生理食鹽水混合，製成薄抹片，自然風乾固定
- ↓ 初染：抹片用哈克氏結晶紫液染1分鐘後，水洗(< 5秒)
- ↓ 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。
- ↓ 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出，再以水洗。
- ↓ 複染：用複染液複染30秒鐘，水洗。
- ↓ 然風乾
- ↓ 鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌



<https://slidetodoc.com/medical-microbiology-lab-3-by-assistant-lecturer-zainab/>



Staphylococcus aureus



Escherichia coli

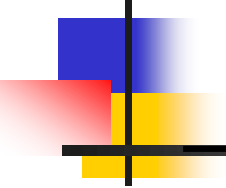
<https://slidetodoc.com/medical-microbiology-lab-3-by-assistant-lecturer-zainab/>

2. 觸酶試驗 (Catalase test) :

- ↓ 自MLA培養基上鉤菌塗抹於載玻片上，
- ↓ 加3%**過氧化氫**溶液1~2滴，觀察有無**氣泡**產生。
- ↓ 產生氣泡者，為正反應；不產生氣泡者，為負反應。
- ↓ 金黃色葡萄球菌為**正反應**。

3. 凝固酶試驗 (Coagulase test) :

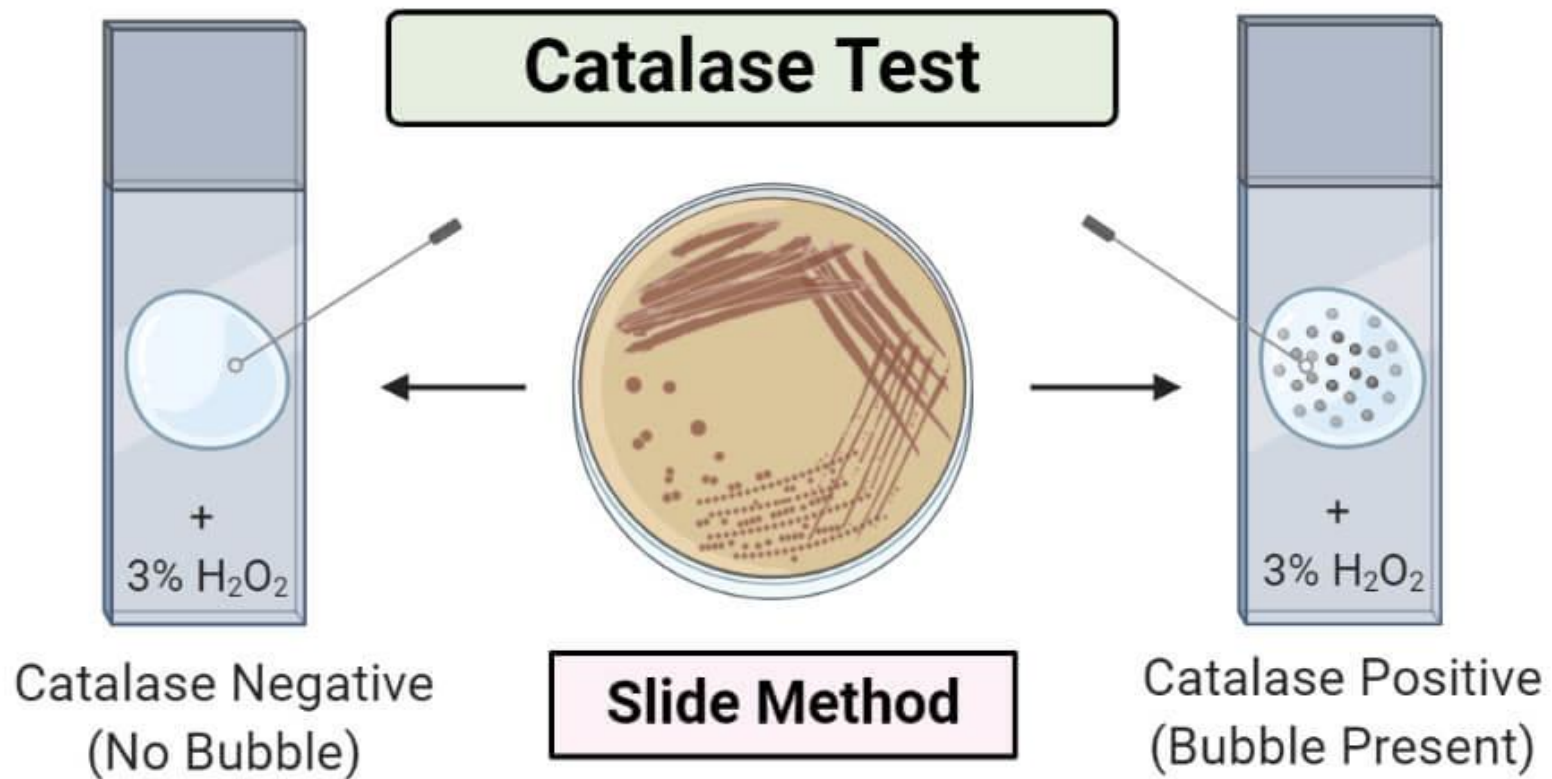
- ↓ 自MLA培養基上鉤菌至含**BHI培養液**0.2 mL之試管中，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 18~24hr，
- ↓ 加入凝固酶血漿0.5 mL，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 6hr，每隔1小時觀察有無凝塊之形成，
- ↓ 若無凝塊形成時，應繼續培養至24hr觀察之，
- ↓ 每組檢體應各做一正負對照組作為對照依據，
- ↓ 金黃色葡萄球菌為**正反應**。



腦心浸出培養液 (Brain heart infusion broth, BHI)

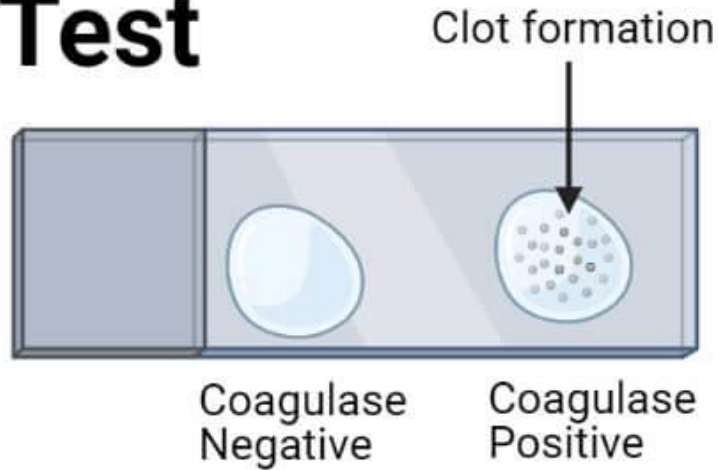
項次	配方	添加量
1	牛腦浸出物(calf brain infusion)	200 g
2	牛心浸出物(beef heart infusion)	250 g
3	胨蛋白朊(proteose peptone)	10 g
4	氯化鈉	5 g
5	磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	2.5 g
6	葡萄糖(dextrose)	2.0 g
7	蒸餾水	1000 mL

121°C, 15', pH 7.4 ± 0.2



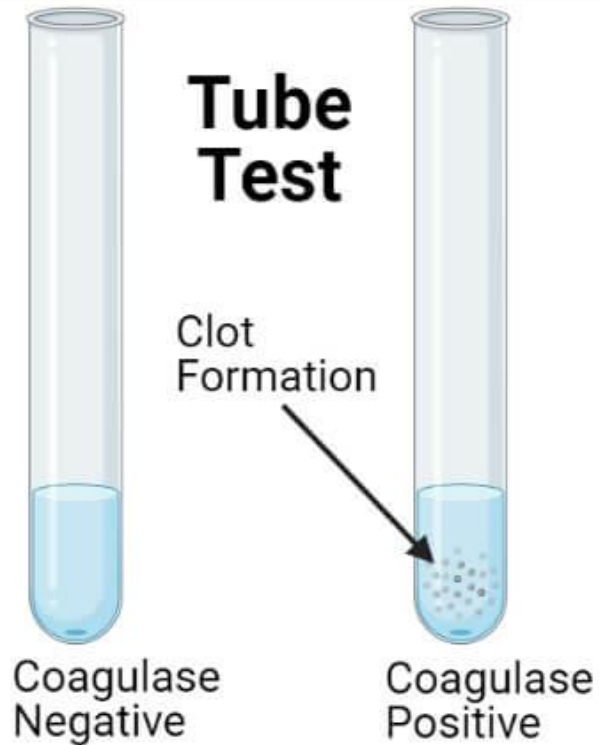
<https://microbenotes.com/catalase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/>

Coagulase Test



Slide Test

Tube Test



<https://microbenotes.com/coagulase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/>

大腸桿菌之檢驗 (Test of *Escherichia coli*)

鑑別試驗：

- ↓ 10倍稀釋檢液於30°C, 48 hr，
- ↓ 以無菌接種環取一環耳劃線培養於馬康奇培養基，於35°C, 24 hr
- ↓ 觀察所形成菌落之生長狀態，取馬康奇培養基上紅色或淡粉紅色菌落，
- ↓ 劃線培養於L-EMB培養基，於35°C, 24 hr。
- ↓ 反射光下有金屬光澤 (Metallic sheen)，於透射光下為藍黑色。

革蘭氏染色鏡檢：Gram (-)

伊紅亞甲藍培養基

(Levine's eosin methylene blue agar, L-EMB)

項次	配方	添加量
1	蛋白朊 (Peptone)	10 g
2	乳糖 (Lactose)	10 g
3	磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	2 g
4	洋菜 (Agar)	15 g
5	伊紅 Y (Eosin Y)	0.4 g
6	亞甲藍 (Methylene blue)	0.065 g
7	蒸餾水	1000 mL

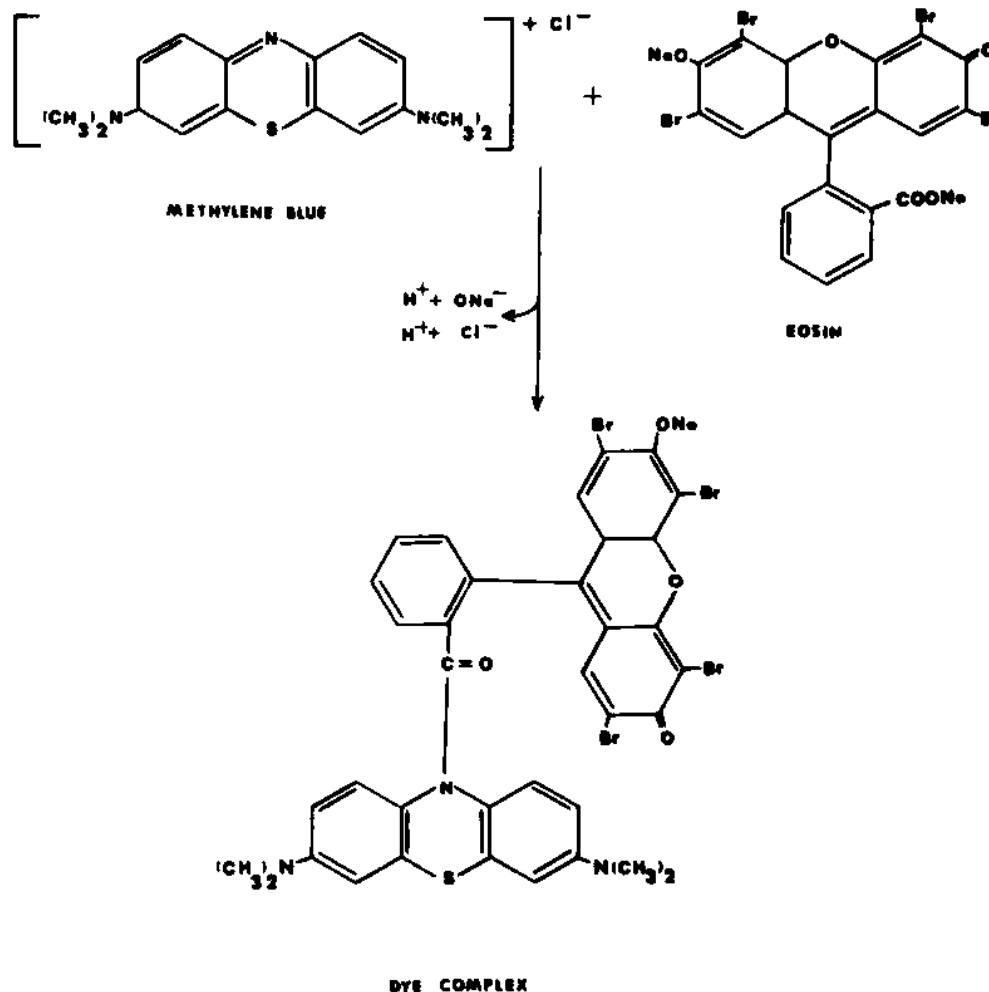
121°C, 15', pH 7.0 ± 0.2



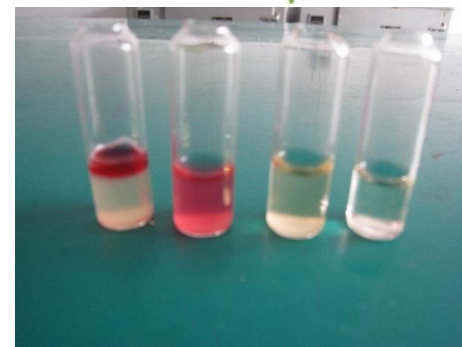
https://www.researchgate.net/figure/E-coli-colony-morphology-on-MacConkey-agar-plate-Presumptive-identification-of-E-coli_fig2_319130632



https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211221.pdf



Proposed mechanism of complexing of eosin and methylene blue under **acidic** conditions.



大腸桿菌陽性者，應符合下
表所列之結果 (IMViC)

試驗或基質	正反應 (+)	負反應 (-)	大腸桿菌之反應
Indole 試驗	紅色	原色	+/-
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
歐普氏試驗	粉紅色	原色	-
檸檬酸鹽利用試驗	混濁狀	澄清	-

綠膿桿菌之檢驗

(Test of *Pseudomonas aeruginosa*)

鑑別試驗：

分離培養：

↓ 10倍稀釋檢液於30°C, 48 hr，

↓ 以無菌接種環取一環耳劃線培養於馬康奇培養基及溴化十六烷基三甲銨培養基上，於35°C, 24 hr

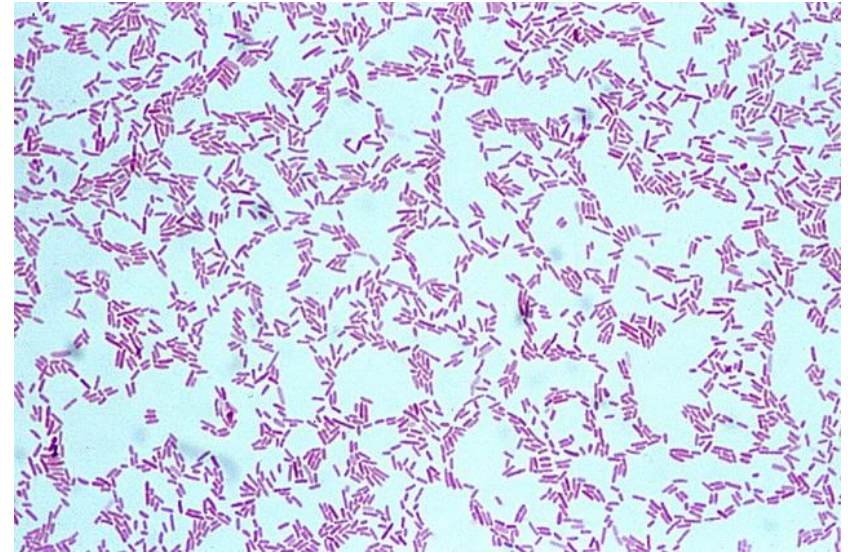
↓ 若在馬康奇培養基菌落呈現白色菌落且在溴化十六烷基三甲銨培養基上有菌落生長，則可能為綠膿桿菌。



溴化十六烷基三甲銨培養基 (Cetrimide agar)

項次	配方	添加量
1	胰化明膠 (Pancreatic digest of gelatin)	20 g
2	氯化鎂 (MgCl_2)	1.4 g
3	硫酸鉀 (K_2SO_4)	10 g
4	洋菜 (Agar)	13.6 g
5	溴化十六烷基三甲銨 ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$)	0.3 g
6	蒸餾水	1000 mL

118°C, 15', pH 7.2 ± 0.2



<https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1418859086>

https://www.researchgate.net/figure/Figure2-Show-Pseudomonas-aeruginosa-colony-on-cetrimide-agar_fig2_308596767

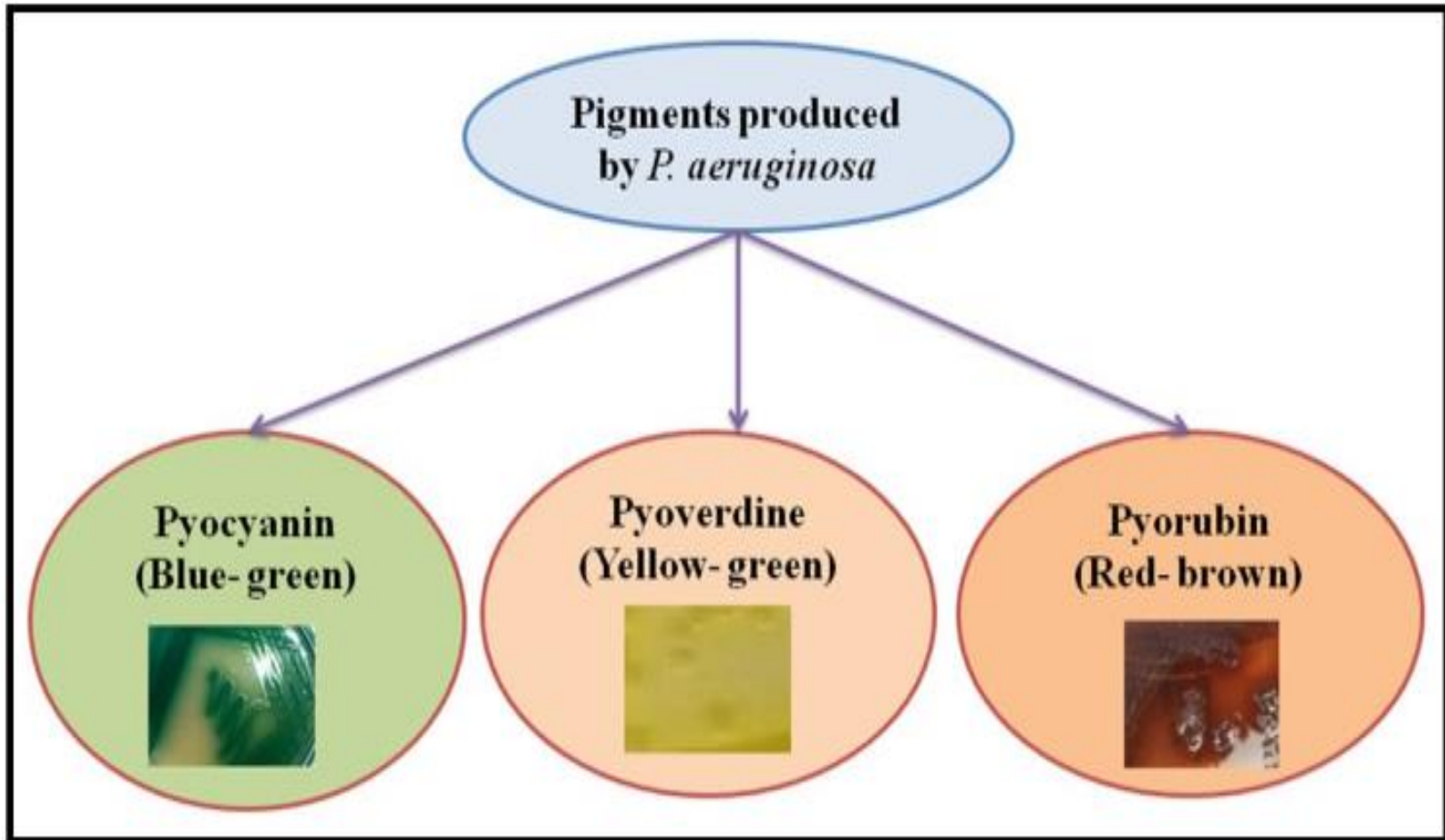


Fig. Pigments produced by *P. aeruginosa*

Annals of Phytomedicine 8(2): 28-42, 2019

初步試驗：

- ↓ 自馬康奇培養基或溴化十六烷基三甲銨培養基上鉤菌，進行革蘭氏染色(Gram stain), Gram (-)
- ↓ 三糖鐵斜面培養基試驗和氧化酶試驗(oxidase test)，結果為正反應者，則應進行生化試驗。



三糖鐵培養基 (Triple sugar iron agar, TSI)

項次	配方	添加量
1	聚蛋白胨 (Polypeptone)	20 g
2	氯化鈉	5 g
3	乳糖 (Lactose)	10 g
4	蔗糖 (Sucrose)	10 g
5	葡萄糖 (Glucose)	1 g
6	硫酸銨亞鐵 [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.2 g
7	硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.2 g
8	酚紅 (Phenol red)	0.025 g
9	洋菜 (Agar)	13 g
10	蒸餾水	1000 mL

118°C, 15', pH 7.3 ± 0.2

Result

Reaction on TSI			Result	Example
Butt color	Slant color	H ₂ S		
Red	Red	Negative	Alk/Alk/- (No action on sugars)	Non fermenter e.g. <i>Pseudomonas</i>
Yellow	Red	Negative	A/Alk/- (Glucose fermented without H ₂ S)	LNF e.g. <i>Shigella</i>
Yellow	Red	Positive black in butt	A/Alk/+ (Glucose fermented with H ₂ S)	LNF e.g. <i>Salmonella</i> & <i>Proteus</i>
Yellow	Yellow	Negative	A/A/- (three sugars are fermented)	LF e.g. <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>



<https://www.slideshare.net/anwarsh148/enterobacteriaceae-ii-biochemical-reaction-2>

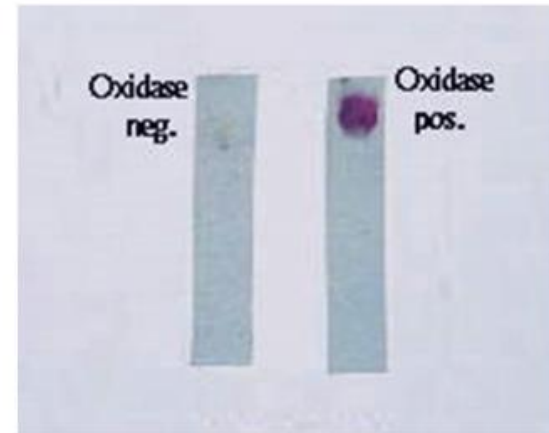
Oxidase Test

Principle:

Tetramethyl p-phenylene diamine hydrochloride
(oxidase reagent)
colourless

Cytochrome oxidase enzyme

Indophenol
(Purple colour)
within 1-2 min



<https://quizlet.com/36699920/lab-tests-for-gram-negative-rods-flash-cards/>

<https://leaked-video.live/lp/skip-lp/index-new.html?tag=500067&tag1=ADK&tag2=14920667&tag3=500067&tag4=ADK&clickid=3olz1x38t2kpxkohr0&country={country}&affid=500067&subid=14920667&as=adk>

生化反應可參照下表所列結果判定



生化試驗	正反應	負反應	綠膿桿菌反應
斜面	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) ^a
底部	紅色(鹼性)	黃色(酸性)	(+) ^a
產氣	培養基有裂縫	培養基完整	(-) ^a
硫化氫	黑色	非黑色	(-) ^a
42°C生長試驗	有落菌生長	無落菌生長	(+) ^a
檸檬酸鹽試驗	混濁	澄清	(+) ^a
丙二酸鹽試驗	藍色	綠色	(+) ^a
精氨酸脫酸酶試驗	紫色	黃色	(+) ^a
顏色	粉色或紅色	無變化	(+) ^a
氣泡	有	無	(+) ^a
螢光產生試驗	有(水溶性)	無	(+)
色素產生試驗	有(紅色)	無	(+)

a：表示為有可能是綠膿桿菌

白色念珠菌之檢驗 (Test for *Candida albicans*)

鑑別試驗：
分離培養

生化試驗

1. Gram (-)
2. 發芽管實驗
3. corn meal agar

(芽生孢子、菌絲、假菌絲、及厚膜孢子 (chlamydospores))

取檢體 1 g 或 1 mL，加入 MLB 培養液，
作成 10 倍稀釋檢液

32.5 ± 2.5°C，培養至少 20 小時

以無菌接種環取一環耳，劃線培養於
沙氏葡萄糖氯黴素瓊脂培養基

32.5 ± 2.5°C，培養 24~48 小時

選取白色至米色、表面奶油狀隆起之菌落

生化試驗或市售生化檢測套組、鑑定系統

依試驗結果判定白色念珠菌

沙氏葡萄糖氯黴素瓊脂培養基 (Sabouraud dextrose chloramphenicol agar)

項次	配方	添加量
1	葡萄糖(dextrose)	40.0 g
2	胃消化動物組織 (peptic digest of animal tissue)	5.0 g
3	胰消化乾酪素(pancreatic digest of casein)	5.0 g
4	氯黴素(chloramphenicol)	0.050 g
5	洋菜(agar)	15.0 g
6	蒸餾水	1000 mL

121°C, 15', pH 5.6 ± 0.2

生化試驗

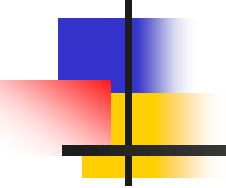
1. Gram (-)

2. 發芽管實驗 (Germ tube test) :

- ↓ 將一接種環酵母菌落與血清(胎牛或馬血清) 0.5~1.0 mL 共置於小試管中。
- ↓ 於 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中培養1.5~2 hr 或於 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養箱中培養3hr。
- ↓ 取一滴血清，顯微鏡觀察發芽管係源自芽生孢子(blastospore) 之圓柱形細絲，於發芽點無任何收縮，且細絲上並無明顯的膨脹。

3. 含1%聚山梨醇酯80之**玉米粉瓊脂**培養基培養試驗 (Culture on corn meal agar with 1% polysorbate 80)

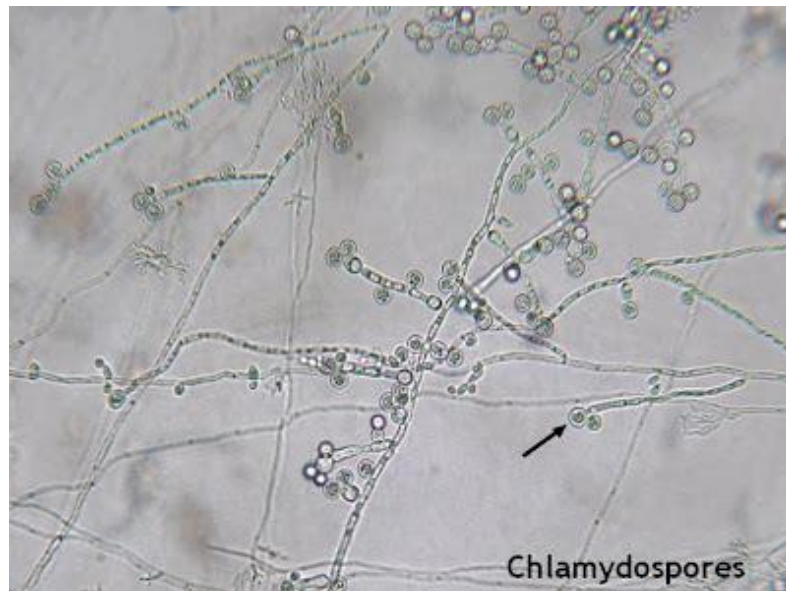
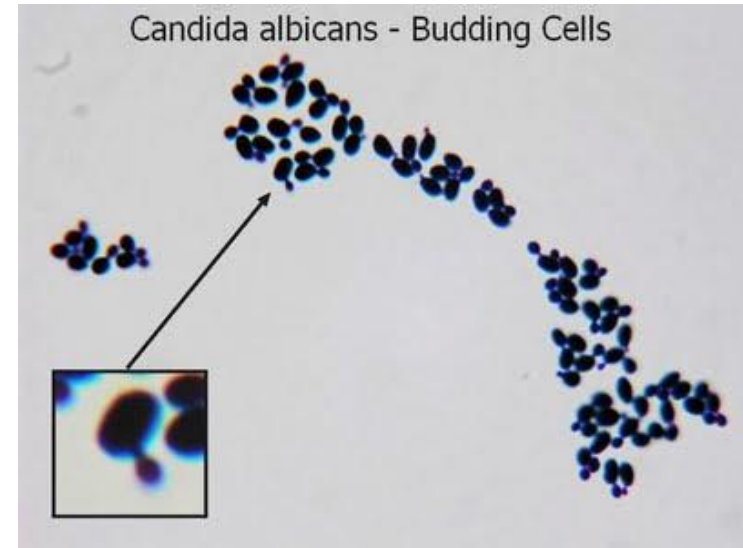
- ↓ 用無菌接種環取一環耳酵母菌落，於含1%聚山梨醇酯80之玉米粉瓊脂培養基畫線，將無菌蓋玻片覆蓋於接種線上方， $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ，3天。
- ↓ 於培養24小時後，打開培養皿上蓋，**鏡檢** (100 ~ 400x)
- ↓ 是否產生菌絲(hyphae)、**假菌絲** (pseudohyphae) 及 **厚膜孢子** (chlamydospores)
- ↓ 菌絲末端或短側枝上產生高折射率的**大厚壁厚膜孢子**。

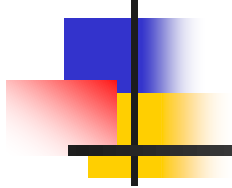


含1%聚山梨醇酯80之玉米粉瓊脂培養基 (Corn meal agar with 1% polysorbate 80)

項次	配方	添加量
1	Infusion from corn meal	50.0 g
2	洋菜(agar)	15.0 g
3	聚山梨醇酯80 (polysorbate 80)	10.0 g
4	蒸餾水	1000 mL

121°C, 15', pH 5.6 ± 0.2





參考資料

1. 化粧品中微生物檢驗方法 109年7月28日 第2次修正
2. 化粧品中白色念珠菌之檢驗 111 年 4 月 21 日
3. BAM Chapter 23: Methods for Cosmetics, FDA, US
4. ISO 11930 Cosmetics — Microbiology —
Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product 2019
5. 中華藥典 第9版

A decorative graphic in the top-left corner consisting of a black crosshair. The horizontal bar is a gradient from black to light grey. The vertical bar is solid black. There are three overlapping squares: a blue one at the top-left, a red one at the bottom-left, and a yellow one at the bottom-right.

- **How to create serial dilutions**

<https://www.youtube.com/watch?v=FdzKgotzjC4>

- **How to prepare spread plates**

https://www.youtube.com/watch?v=FwW_2ii1Zoo

謝謝

敬請指教

