

食品微生物之檢驗方法－生菌數之檢驗
Methods of Test for Food Microorganisms-
Test of Standard Plate Count (Aerobic Plate Count)

1. 適用範圍：本方法適用於食品中生菌數之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以平板計數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 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
 - 2.2.7. 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。
 - 2.2.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.10. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
 - 2.2.11. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.12. 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。
 - 2.2.13. 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。
 - 2.2.14. 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。
 - 2.2.15. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
 - 2.2.16. pH 試紙：範圍 6-8。
 - 2.2.17. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、氫氧化鈉、葡萄糖(glucose)及油酸聚醇山梨酯(polysorbate 80, Tween 80)均採用試藥級；蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、酵母抽出物(yeast extract)及洋菜(agar)均採用微生物級。
 - 2.2.18. 1N 氫氧化鈉溶液之配製：
稱取氫氧化鈉 4 g，加入無菌水溶解使成 100 mL。
 - 2.2.19. 稀釋液之配製：
 - 2.2.19.1. 生理食鹽水：

取氯化鈉 8.5 g，溶於蒸餾水 1000 mL 中，分裝於稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.19.2. 磷酸鹽緩衝液 (Butterfield's phosphate-buffered dilution water)：

取磷酸二氫鉀 34 g，溶於蒸餾水 500 mL，以 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.2，再加蒸餾水使成 1000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘，貯存於冰箱中，作為原液。使用時，取原液 1.25 mL，加入蒸餾水使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.19.3. 0.1% 蛋白胨稀釋液 (0.1% peptone diluent)：

取蛋白胨 1 g，溶於蒸餾水使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.1。

2.2.20. 平板計數培養基 (Plate count agar, PCA)，亦稱標準方法培養基 (Standard method agar)

胰化蛋白胨(tryptone) 5 g
酵母抽出物(yeast extract)..... 2.5 g
葡萄糖(glucose)..... 1 g
洋菜(agar)..... 15 g
蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，分裝於適當之容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0 ± 0.2。

2.3. 檢液之調製

2.3.1. 固態檢體：將檢體切碎混合均勻後，取 50 g，加入稀釋液 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之檢體：以已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎後，混合均勻，取 50 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

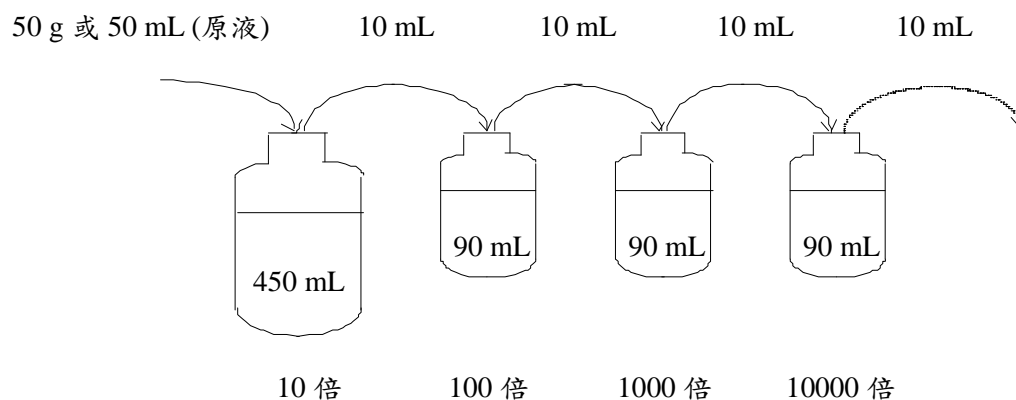
2.3.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取 50 mL，作為原液，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5°C，18 小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(置於 45°C 以下之水浴中，可在 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依 2.3.1. 節，製成 10 倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於 -20°C。

2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等，經攪拌均勻

後，取 50 g，以下步驟同 2.3.1.節之操作。

- 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 加至稀釋液 90 mL 中，依序作成 100 倍、1000 倍、10000 倍等一系列稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



- 註： 1. 除肉製品使用 0.1% 蛋白胍稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液，其次為生理食鹽水。
2. 檢體總量不足 50 g (mL) 時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成 10 倍稀釋檢液。
3. 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。

2.4. 生菌之培養

- 2.4.1. 將稀釋檢液及(或)原液充分振搖，混合均勻。
2.4.2. 各吸取各稀釋檢液及(或)原液 1 mL 分別置入培養皿中，各檢液至少做二重複。
2.4.3. 另吸取稀釋液 1 mL 置入培養皿中，作為空白對照組(二重複)。
2.4.4. 2.4.2. 節及 2.4.3. 節之各培養皿中倒入冷卻至 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 之平板計數培養基(PCA) 12~15 mL，搖動混合，自檢液之調製至此步驟應於 15 分鐘內完成。
2.4.5. 將 2.4.4. 節之培養基平板靜置，待培養基凝固後，倒置於 35°C 培養 48 ± 2 小時。

2.5. 生菌之計算

- 2.5.1. 經培養後，選取 25~250 個菌落之兩個平板來計數，其生菌數之表示方式為 CFU/g 或 CFU/mL。
2.5.2. 若各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數平板之菌落數為 25~250 個，則應以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(附表：樣品編號 1)；但若有兩種稀釋倍數之

平板之菌落數在 25~250 個之間時，則應依下列公式計算之，但生菌數結果表示時應將該數字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)，使其有效數為兩位。(附表：樣品編號 2)。

$$\text{生菌數(CFU/g 或 CFU/mL)} = \left[\left(\frac{Aa + Ab}{2} \right) \times A + \left(\frac{Ba + Bb}{2} \right) \times B \right] \times \frac{1}{2}$$

Aa、Ab：A 稀釋倍數各平板內之菌落數。

Ba、Bb：B 稀釋倍數各平板內之菌落數。

A、B：稀釋倍數。

- 2.5.3. 各稀釋倍數之菌落數均小於 25 個時，則以最低稀釋倍數之兩個平板菌落數平均值乘其稀釋倍數。並註明其為估計值(附表：樣品編號 3)。
- 2.5.4. 平板中菌落數大於 250 個時，則先計數平板中菌落分佈其代表性之一部份，再計算生菌數，而以估計值表示(附表：樣品編號 4)。
- 2.5.5. 擴散菌落，擴散菌落可分為 3 種形式：
- (1)鏈狀菌落，不能明顯分離，似乎由一堆細菌分裂生長而成。
 - (2)細菌生長介於培養基及培養皿底部間之一層水氣中。
 - (3)細菌生長於培養基邊緣或表面上之一層水氣上。
- 2.5.5.1. 平板內產生擴散菌落時應以下述之方法計數。(附表：樣品編號 5)擴散菌落所覆蓋面積(包括被擴散菌落造成之抑制生長範圍)超過整個平板面積之 1/2 時或者被擴散菌落造成之抑制生長範圍超過 1/4 時，應不予計數，而記錄為”擴散菌落”。
- 2.5.5.2. 擴散菌落形成鏈狀時，若僅一條則應視為一個菌落，若有兩條以上存在時，應視其鏈源處之不同，分別計數之。若為彼此分開而形成大菌落時，亦應予以計數。
- 2.5.6. 各稀釋倍數均無菌落生長者，則生菌數應小於 1 乘以最低稀釋倍數並註明估計值(附表：樣品編號 6)。
- 2.5.7. 若二重複平板之菌落數，其中一片在 25~250 個之間，另一片大於 250 個時，兩者均應計數(附表：樣品編號 7)。
- 2.5.8. 若二稀釋倍數之菌落數，各有一片在 25~250 個之間，另一片大於 250 個或小於 25 個時，四片皆計數，並依 2.5.2.節公式計算之(附表：樣品編號 8)。
- 2.5.9. 當二稀釋倍數之菌落數，其中 1 稀釋倍數之 2 重複平板之菌落數均在 25~250 之間，另 1 稀釋倍數之 2 重複平板之菌落數，一片在 25~250 之間，另一片大於 250 個或小於 25 個時，四片

皆計數，並依公式計算之(附表：樣品編號 9 及 10)。

2.5.10. 確證被污染者或依其他理由認為不適當者，應不得計算之。

附表、生菌數計算舉例說明(2 平板/稀釋倍數)

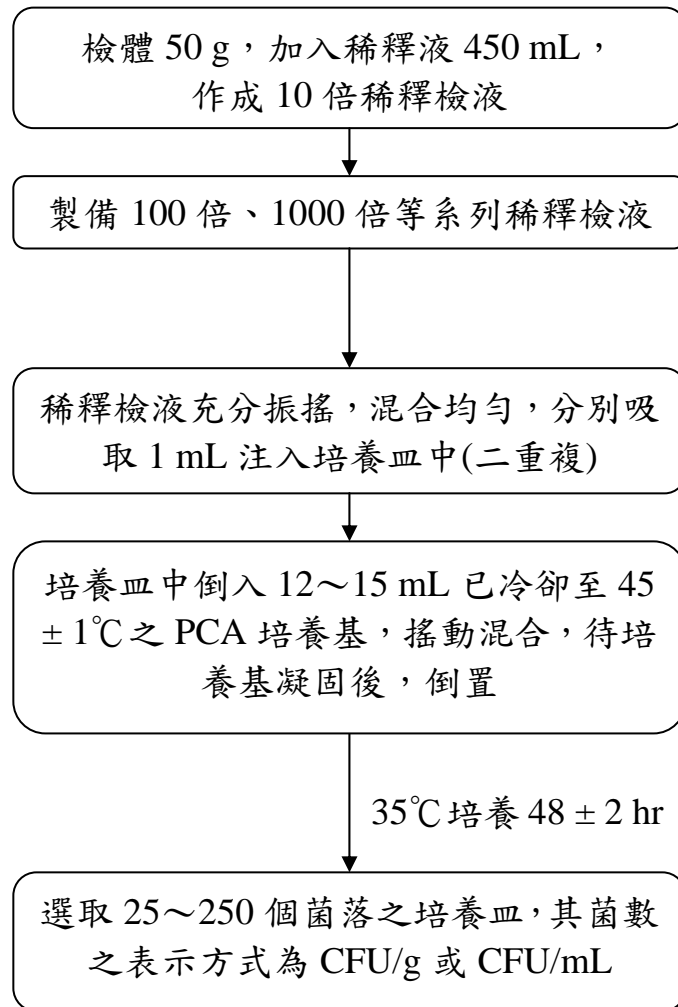
樣品編號	菌落數			CFU/ g ^(a)	計算依據
	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000		
1	TNTC ^(b)	<u>175</u> ^(c)	16	190000	2.5.2
	TNTC	<u>208</u>	17		
2	TNTC	<u>224</u>	<u>25</u>	250000	2.5.2
	TNTC	<u>245</u>	<u>30</u>		
3	18	2	0	1600*	2.5.3
	14	0	0		
4	TNTC	TNTC	<u>523</u>	5100000*	2.5.4
	TNTC	TNTC	<u>487</u>		
5	TNTC	<u>245</u>	<u>35</u>	290000	2.5.5
	TNTC	<u>230</u>	擴散菌落		
6	0	0	0	<100*	2.5.6
	0	0	0		
7	TNTC	<u>245</u>	23	260000	2.5.7
	TNTC	<u>278</u>	20		
8	TNTC	<u>225</u>	<u>21</u>	270000	2.5.8
	TNTC	<u>255</u>	<u>40</u>		
9	TNTC	<u>210</u>	<u>18</u>	230000	2.5.9
	TNTC	<u>240</u>	<u>28</u>		
10	TNTC	<u>260</u>	<u>30</u>	270000	2.5.9
	TNTC	<u>230</u>	<u>28</u>		

(a) 星號(*)表示估計值。

(b) TNTC：菌落太多無法計數，菌落數明顯地多於 250。

(c) 劃有底線的數字表示用於計數。

2.6. 檢驗流程圖



2.7. 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。