

食品微生物之檢驗方法－綠膿桿菌之檢驗(草案)

Methods of Test for Food Microorganisms-Test of *Pseudomonas aeruginosa*

1. 適用範圍：本方法適用於包裝飲用水及盛裝飲用水中綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)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. 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。
 - 2.2.6. 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。
 - 2.2.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.8. 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 2.2.6.節之薄膜過濾裝置者。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.11. 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。
 - 2.2.12. 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。
 - 2.2.13. 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。
 - 2.2.14. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
 - 2.2.15. pH 試紙：範圍 6-8。
 - 2.2.16. 試藥：離胺酸鹽酸鹽(L-lysine · HCl)、氯化鈉、木糖(xylose)、蔗糖(sucrose)、乳糖(lactose)、酚紅(phenol red)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)、硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、康斯菌素(kanamycin)及奈利啶酸(nalidixic acid)均採用試藥級，酵母抽出物(yeast extract)、即溶脫脂奶粉(skim milk)、營養肉羹(nutrient broth)及洋菜(agar)均採用微生物級。

2.2.17. 培養基

2.2.17.1. M-PA-C 洋菜培養基(M-PA-C agar)

離胺酸鹽酸鹽(L-Lysine · HCl)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	2.0 g
氯化鈉	5.0 g
木糖(xylose)	1.25 g
蔗糖(sucrose)	1.25 g
乳糖(lactose)	1.25 g
酚紅(phenol red)	0.08 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.8 g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	5.0 g
硫酸鎂(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	1.5 g
康斯菌素(kanamycin)	0.008 g
奈利啶酸(nalidixic acid)	0.037 g
洋菜(agar)	12.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌至沸騰，使培養基完全溶解後，繼續加熱 1 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.1 ，分裝於培養皿中。

2.2.17.2. 牛乳洋菜培養基(Milk agar)

混合液 A

即溶脫脂奶粉 (skim milk)	100 g
蒸餾水	500 mL

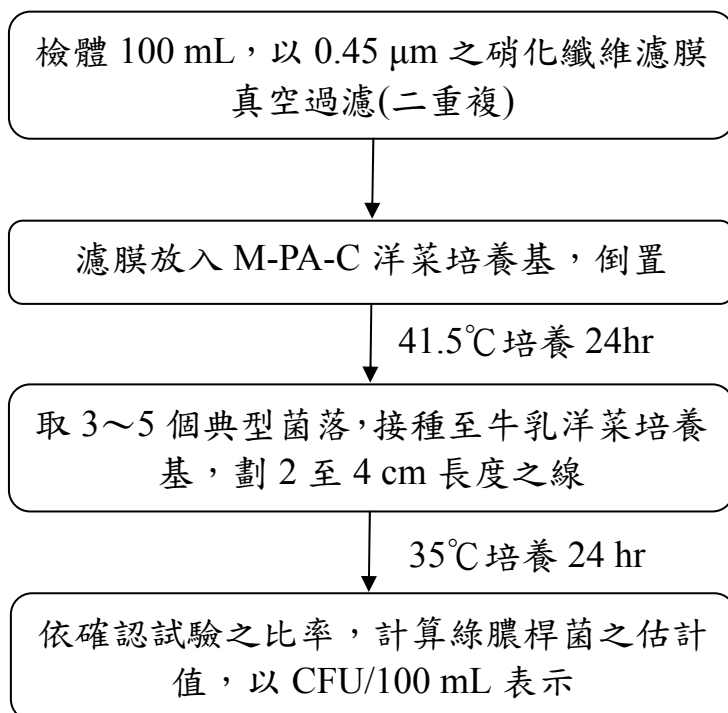
混合液 B

營養肉羹(nutrient broth)	12.5 g
氯化鈉	2.5 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

混合液 A 完全溶解後，於 115°C 滅菌 20 分鐘；混合液 B 完全溶解後，則於 121°C 滅菌 15 分鐘，待冷卻至 55°C，於無菌狀況下混合，分裝於培養皿中。

- 2.3. 取樣：用已滅菌之容器或無菌袋盛取檢體，取檢體 100 mL 過濾；若污染情形嚴重時，則可採 10 mL，每一檢體至少做二重複。
- 2.4. 過濾：檢體以 0.45 μm 之硝化纖維濾膜真空過濾。
- 2.5. 培養：經 2.4 節過濾後之薄膜，取出放置於 M-PA-C 洋菜培養基上，倒置，於 41.5°C 培養 24 小時。
- 2.6. 觀察：經培養後，觀察有否菌落生成，若有直徑在 0.8 至 2.2 mm，呈扁平狀，中央呈褐色至墨綠色，邊緣光亮之菌落，為典型菌落。

- 2.7. 確認試驗：挑選 3~5 個典型菌落進行確認試驗，將分離之典型菌落接種至牛乳洋菜培養基，劃 2 至 4 cm 長度之線，於 35°C 培養 24 小時。如能水解牛乳之酪蛋白(casein)而呈黃至綠色之擴散者，即為綠膿桿菌。
- 2.8. 計數：按照確認試驗所得結果，依確定之比率計算綠膿桿菌之估計值，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，應以傳統方法為準。