

食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms -Test of *Escherichia coli*

1. 適用範圍：本方法適用於食品中大腸桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以三階三支進行培養，配合MPN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 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 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. 顯微鏡：放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.8. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g者，靈敏度為5 mg。
 - 2.2.9. 精密天平：靈敏度為0.001 g。
 - 2.2.10. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.11. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.12. 加熱器。
 - 2.2.13. 振盪器(Shaker)。
 - 2.2.14. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.15. 吸管(Pipette)：已滅菌，1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5及10 mL吸管應有0.1 mL刻度。
 - 2.2.16. 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。
 - 2.2.17. 培養皿：已滅菌，內徑約90或100 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。
 - 2.2.18. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
 - 2.2.19. 試管：16×150 mm試管或其他適用者。
 - 2.2.20. 發酵管(Durham fermentation tube)：內徑7×20 mm或其他適當規格，使用時倒置於16×150 mm之試管內。

- 2.2.21. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
- 2.2.22. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌，或可拋棄式者。
- 2.2.23. pH 試紙：範圍 6~8。
- 2.2.24. 試藥：
亞甲藍(methylene blue)、膽汁鹽 3 號(bile salts No.3)、葡萄糖(dextrose)、乳糖(lactose)、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、伊紅 Y (eosin Y)、磷酸氫鉍鈉、硫酸鎂、檸檬酸鈉(sodium citrate · 2H₂O)、氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)、結晶紫(crystal violet)、草酸鉍(ammonium oxalate)、碘化鉀、碘(KI)、沙黃 O (safranin O)、對-二甲胺基苯甲醛(*p*-dimethylaminobenzaldehyde)、甲基紅(methyl red)、 α -萘酚(α -naphthol)、無水乙醇、氫氧化鈉、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、乙醇、戊醇(amy alcohol)及鹽酸均採用試藥級。蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、酵母抽出物(yeast extract)、胰化蛋白胨(peptone)、緩衝蛋白胨粉末(buffered peptone-water powder)及洋菜採用微生物級。
- 2.2.25. 試劑：
- 2.2.25.1. 稀釋液
- 2.2.25.1.1. 生理食鹽水：取氯化鈉 8.5 g 溶於蒸餾水 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.2.25.1.2. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water, BPBW)：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 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.2.25.1.3. 0.1% 蛋白胨稀釋液(Peptone diluent, 0.1%)：取蛋白胨 1 g 溶於蒸餾水 1000 mL，取適量分裝於稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0±0.2。
- 2.2.25.2. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)
- 2.2.25.2.1. 哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)
溶液 A：取結晶紫 2 g 溶於 95% 乙醇 20 mL 中。
溶液 B：取草酸鉍 0.8 g 溶於蒸餾水 80 mL 中。
將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。
- 2.2.25.2.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g 置於研鉢中，經研磨 5~10 秒鐘後，加蒸餾水 1 mL 研磨，續加蒸餾水 5 mL 研磨，再加蒸餾水 10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水中，將此溶液注入褐色瓶，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。

2.2.25.2.3. 哈克氏(Hucker's)複染液(複染劑)

取沙黃 O 2.5 g 溶於 95 % 乙醇 100 mL 中，供作複染原液。使用時，取原液 10 mL 加蒸餾水 90 mL，作為複染液。

2.2.25.3. 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)

取對-二甲氨基苯甲醛 5 g 溶於戊醇 75 mL 中，再徐徐加入濃鹽酸 25 mL，混合均勻後應呈黃色，並保存於 4°C 冰箱中。

2.2.25.4. 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)

將甲基紅 0.1 g 溶於 95 % 乙醇 300 mL 中，加蒸餾水至全量為 500 mL。

2.2.25.5. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagents, VP reagents)

溶液 A：取 α -萘酚 5 g 溶於無水乙醇 100 mL 中。

溶液 B：取氫氧化鉀 40 g 溶於蒸餾水 100 mL。

2.2.26. 培養基

2.2.26.1. 硫酸月桂酸胰化蛋白腓培養液(Lauryl sulfate tryptose broth, LST)

胰化蛋白腓(tryptose)	20 g
乳糖(lactose)	5 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	2.75 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_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 10 mL 注入裝有發酵管的試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8±0.2。

2.2.26.2. EC 培養液(EC Broth)

胰化蛋白腓(tryptose)	20 g
乳糖(lactose)	5 g
膽汁鹽 3 號(bile salts No. 3)	1.5 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.5 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	4 g
氯化鈉(NaCl)	5 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取 8 mL 注入裝有發酵管的試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.2.26.3. 伊紅亞甲藍培養基(Levine's eosin methylene blue agar, L-EMB)

蛋白朊(peptone) 10 g

乳糖(lactose) 10 g

磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) 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

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.1±0.2。培養基注入培養皿前應搖動混合，搖動時應避免氣泡產生。每培養皿注入約 20 mL，凝固後打開皿蓋約 1/2~1/4，使培養基表面乾燥。

2.2.26.4. 平板計數培養基(Plate count agar, PCA)

胰化蛋白朊(tryptone) 5 g

酵母抽出物(yeast extract) 2.5 g

葡萄糖(dextrose) 1 g

洋菜(agar) 15 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，取 12~15 mL 分裝於試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2；滅菌後作成斜面培養基。

2.2.26.5. 胰化蛋白朊或色胺酸培養液(Tryptone or tryptophane broth)

胰化蛋白朊(tryptone)或胰化酪蛋白(trypticase) 10g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.2.26.6. 甲基紅—歐普氏培養液(MR-VP broth)

緩衝蛋白朊粉末(buffered peptone-water powder) 7 g

葡萄糖(dextrose) 5 g

磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) 5 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.2.26.7. 柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's citrate broth)

磷酸氫銨鈉(NaNH₄HPO₄·4H₂O) 1.5 g

磷酸二氫鉀(KH_2PO_4 , monobasic)	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

加熱溶解後，分取 10 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.7±0.2。

2.3. 檢液之調製

2.3.1. 檢體之處理

2.3.1.1. 固態檢體

先適當切碎，混合均勻後，稱取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以無菌之攪拌均質器攪拌。初以低速攪拌數秒鐘，再以高速攪拌，攪拌總時間不超過 2 分鐘，或將檢體置入無菌袋中，加入適量之稀釋液後，以鐵胃搓揉 2 分鐘，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.2. 粉狀、粒狀或其它易於粉碎之檢體

以已滅菌之藥勺或其他方便使用的器具加以粉碎並混合均勻。稱取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1. 節之操作。

2.3.1.3. 液態檢體

搖勻後，取 50 mL 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1. 節之操作。

2.3.1.4. 需解凍之冷凍檢體，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃

先置於冷藏之溫度下解凍(2~5°C，18 小時以內)；此外亦可使用較高的溫度快速解凍(45°C 以下水浴 15 分鐘)，解凍時應經常搖動檢體以幫助檢體之解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。稱取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1. 節之操作。

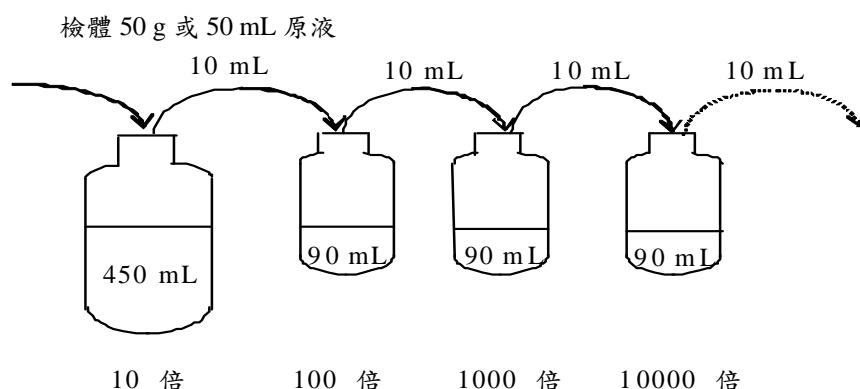
2.3.1.5. 不需解凍之冷凍檢體，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品

應速先行使其成適當小塊，稱取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1. 節之操作。

2.3.1.6. 液態及濃稠液態檢體，如布丁、煉乳

經適當攪拌均勻後，稱取 50 g 加入稀釋液 450 mL，以下步驟同 2.3.1.1. 節之操作。

2.3.2. 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% 蛋白胨稀釋液外，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. 鑑別試驗：

2.4.1. 推定試驗

將 2.3. 節之檢體原液或稀釋檢液充分振搖，混合均勻後，分別自原液或 10 倍稀釋檢液起之三個連續稀釋倍數檢液中吸取 1 mL 接種於裝有 LST 培養液 10 mL 的試管中，每一稀釋倍數接種 3 支(3 階 3 支)，自檢液之調製至此步驟應於 15 分鐘內完成，於 35°C 培養 24±2 小時，觀察是否產氣；未產生氣體者繼續培養 24 小時。仍無氣體產生者，即為大腸桿菌陰性；產生氣體者則疑為大腸桿菌陽性。

2.4.2. 鑑別試驗

2.4.2.1. 由 2.4.1. 節產生氣體^(註)之每一試管中取一接種環量之培養菌液接種於 EC 培養液中，於 45.5°C 有蓋水浴箱中培養 24±2 小時，觀察是否產生氣體，未產生氣體者繼續培養 24±2 小時。仍無氣體產生即為大腸桿菌陰性，產生氣體者疑似大腸桿菌陽性。

2.4.2.2. 由 2.4.1. 節產生氣體之每一試管中取一接種環量之培養菌液，在 L-EMB 培養基表面劃線後，於 35°C 培養 18~24 小時，觀察所形成菌落之形態，典型大腸桿菌菌落中央呈黑色，扁平，帶有或不帶有金屬光澤。自每一片 L-EMB 培養基上取 2 個可疑菌落移殖於 PCA 培養基斜面上，35°C 培養 18~24 小時，以進行形態確認及生化試驗；若未

出現典型菌落，則再自每一片 L-EMB 培養基上鉤取比較可疑之菌落，接種至 PCA 培養基斜面上，並於 35°C 培養 18~24 小時，以備生化試驗。

註：輕搖試管後，若發酵管內之培養液可為氣泡所取代，則判為產氣。

2.4.3. 確定試驗：

2.4.3.1. 革蘭氏染色

- (1) 取 18~24 小時培養之菌株，於載玻片上製作薄抹片，風乾或微熱固定。
- (2) 初染：將已固定之抹片用哈克氏結晶紫液染 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% 乙醇洗至不再有藍紫色褪出時(約 30 秒鐘)，再以水沖洗。
- (5) 複染：用哈克氏複染液複染 30 秒鐘，水洗。
- (6) 自然風乾。
- (7) 鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。大腸桿菌為革蘭氏陰性，無芽胞，球狀或短桿狀。

2.4.3.2. 吲哚試驗(Indole test)

自 PCA 培養基斜面上鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液中，於 35°C 培養 24±2 小時後加入柯瓦克氏試劑 0.2~0.3 mL，輕輕搖動後靜置 10 分鐘，上層呈現紅色者，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。

2.4.3.3. 歐普氏試驗(VP test)

自 PCA 培養基斜面上鉤菌接種於 MR-VP 培養液中，於 35°C 培養 48±2 小時後，取 1 mL 培養液至另一已滅菌之試管中，加入歐普氏試劑溶液 A 0.6 mL 及歐普氏試劑溶液 B 0.2 mL 後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，靜置 2 小時後觀察結果，呈現粉紅色者，為正反應(+); 否則為負反應(-)。大腸桿菌為負反應。

2.4.3.4. 甲基紅試驗(MR test)

將 2.4.3.3. 節剩餘之 MR-VP 培養液於 35°C 再培養 48±2 小時後，加入甲基紅指示劑 5 滴，輕輕搖勻，培養液呈紅色，則為正反應(+); 否則為負反應(-)。大腸桿菌為正反應。

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

自 PCA 培養基斜面上鉤菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養

液中，於35°C培養96小時後，呈現混濁狀者，為正反應(+)；維持原澄清狀者，則為負反應(-)。大腸桿菌為負反應。

2.4.3.6. 乳糖產氣試驗(Gas production from lactose)

自PCA培養基斜面上鉤菌接種於LST培養液中，於35°C培養48±2小時，產生氣體者為正反應(+);未產生氣體者為負反應(-)。大腸桿菌為正反應。

2.5. 判定

2.5.1. 大腸桿菌陽性者，應符合下表所列之結果：

試驗或基質	正反應	負反應	大腸桿菌之反應
革蘭氏染色	陽性(深紫色)	陰性(粉紅色)	-
吲哚試驗	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	-
乳糖產氣試驗	氣體產生	無氣體產生	+

2.5.2. 最確數(Most probable number, MPN)：

由2.5.1.節判定為大腸桿菌陽性菌落，反推回確實產氣且含大腸桿菌之EC培養液產氣試管數，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)。

附表：最確數表

正反應試管數			MPN/m L (g)	95%信賴界 限		正反應試管數			MPN/mL (g)	95%信賴界 限	
0.10 mL	0.01 mL	0.001 mL		下限	上限	0.10 mL	0.01 mL	0.001 mL		下限	上限
0	0	0	< 3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

說明：

- (1)若稀釋倍數為 10、100、1000 倍【即每管 LST 培養液中含 0.1、0.01、0.001 mL (g)之檢體】，且 LST 培養液均產氣(正反應試管數 3-3-3)，經接種至 EC 培養液、劃線培養於 L-EMB 培養基及鑑別試驗後，確認含大腸桿菌之產氣 EC 培養液試管數為 3-1-0，對照 MPN 數應為 43，即該檢體大腸桿菌數為 43 MPN/mL (g)。
 - (2)若為原液及稀釋倍數 10、100 倍【即每管 LST 培養液中含 1、0.1、0.01 mL (g)之檢體】，而 EC 培養液之正反應試管數經鑑別試驗，含有大腸桿菌之試管數為 3-1-0，則該檢體大腸桿菌數為 $43 \div 10 = 4.3$ MPN/mL (g)。
 - (3)若稀釋倍數為 100、1000、10000 倍，而結果同上時，則該檢體大腸桿菌數為 $43 \times 10 = 4.3 \times 10^2$ MPN/mL (g)，其餘類推。
- 2.7. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

檢驗流程圖

