

不同培養基測定總菌落數的比較

林明滢¹ 王復德² 王永衛²

台北榮民總醫院 1 感染管制委員會 2 內科部感染科

總菌落數檢查之目的在於檢測樣本中生存之好氧及兼性厭氧異營細菌、酵母菌及黴菌等總微生物之數目。美國公共衛生學會建議用於水質微生物檢測的方法，為傾倒平板法，使用(tryptone glucoseextract agar ; TGEA) 培養基。本研究主要在探討使用 TGEA 與各臨床微生物實驗室常用之培養基，對不同的標準品管菌是否會造成菌落生長數量的差別。測試菌株：分別有金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)共三種，每個標準菌分別重複進行十次；另外並以臨床常見檢體進行測試。使用培養基分別為(TGEA、Mueller-Hinton II agar; M-H II)、(tryptone soy agar; TSA)、(nutrient agar; NA)。所有培養之菌落數先以 log 10 轉換，以 TGEA 培養基的菌落數作為比較的基準，再進行成對 t 檢定(pair-t test)、線性迴歸統計分析。不論何種標準品管菌株，接種量為 1mL 於不同培養基經傾倒平板法培養 48 小時後，菌落數經 log 10 轉換後，TGEA 與 M-H II 的一致度為 0.93(95% CI=0.86-0.96)，另外與 TSA、NA 分別為 0.96(95% CI=0.92-0.98)、0.94(95% CI=0.88-0.97)。而環境監測檢體，呼吸治療裝置潮溼器用水，血液透析用水，奶水，果汁冷飲，於上述四種培養基的菌落數，經成對 t 檢定，亦皆無統計上差異，三項資料顯示微生物實驗室中常見的培養基 M-H II、TSA、NA 可適用於呼吸治療裝置潮溼器用水、血液透析用水、奶水、果汁冷飲的總菌落數測定。(感控雜誌 2001;11:289-98)

關鍵詞:環境微生物、微生物培養方法、總菌落數

前 言

總菌落數檢查之目的在於檢測樣本中生存之好氧及兼性厭氧異營細菌、酵母菌及黴菌等總微生物之數目，以了解飲水、礦泉水等水源的消毒效果或食物被微生物污染之情形[1]院內感染環境微生物監測中，若樣品來源不是處於無菌狀態時，大部份都會應用到總菌落數的定量方法，來評估物品受微生物污染之嚴重度，在常見的許多醫院環境檢查項目，如血液透析用水、飲水機飲用水、餐具或食品微生物檢測等皆會進行此檢驗方法。

依據美國公共衛生學會建議，用於水質微生物檢測的標準方法為傾倒平板法(pour plate method)，使用葡萄糖胰蛋白月朮萃取培養基(tryptone glucoseextract agar; TGEA)，培養時間為 48 小時，培養溫度為 35°C，主要是計數菌落形成的數量(colonies forming unit;CFU)[2]。台灣地區各醫院的臨床微生物實驗室很少會常規的準備此成份的培養基，一般較常用的培養基有 5%羊血培養基(5% sheepblood agar plate; BAP)、大豆胰蛋白培養基(tryptone soy agar; TSA)、滋養培養基(nutrient agar;NA)，而用於抗生素敏感性試驗的 Mueller-Hintonmedium 亦是常備品。在繁雜的工作及貯存空間不足的考量下，有些檢驗同仁會提出是否可以上述常備培養基來取代 TGEA。本研究主要在探討使用 TGEA 與各臨床微生物實驗室常用之培養基，對不同的標準品管菌及環境檢體是否會造成菌落生長數量的差別，以增加臨床微生物實驗室的方便性。

材料與方法

一、測試菌株：以微生物檢驗室常用的藥物敏感性品管菌為主，分別為金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC25923; SA)、大腸桿菌(*Escherichia coli*, ATCC-25922; EC)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC-27853; PA) 共三種。每種菌的濃度配製成 McFarland 0.5(約 10^7 - 10^8 CFU/mL)，再使用生理食鹽水，依 10 倍稀釋至菌量介於 10^1 - 10^3 之間，同一管菌液同時接種於不同的培養基，每個標準菌分別重複進行十次。

二、使用培養基分別為：1.TGEA，24 公克/公升 (BBL, Becton Dickinson Microbiology system, Cockeysville, MDUSA)、2.M-H II，38 公克/公升(BBL, Becton Dickinson Microbiology system,Cockeysville, MD USA)、3.TSA，37 公克/公升(Biotec laboratories,Sufflok, United Kingdom)、4.NA，28 公克/公升(Biotec laboratories, Sufflok, United Kingdom)。所用培養基皆於實驗室內，以二次去離子水配製，再以 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘。並計算自行配製的各種培養基所需成本(包括培養基粉末、人力、儀器設備之折舊費用)。

三、臨床環境監測常見檢體分別有呼吸治療裝置潮溼器用水、血液透析用水、奶水、果汁冷飲等。

四、總菌落數偵測方法：1.傾倒平板法，加 1mL 菌液或臨床檢體於無菌空白培養皿，而後加入已滅菌 15-20mL 冷卻至 45-50°C 培養基，前後左右各轉六次以上混合均勻，待凝固以後，倒置放於 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培養箱，培養 48 ± 2 小時[2]。

五、統計方法：所有培養之菌落數先以 \log_{10} 轉換，以 TGEA 培養基的菌落數作為比較的基準。再以 Spss v8.0 統計軟體計算平均數及標準差並進行成對 t 檢定(pair-ttest)、線性迴歸統計分析與基數資料一致度檢定。

臨床常見檢體之培養菌落數若為 0，即以 1 CFU/mL 呈現，以便於進行菌落數轉換為 \log_{10} 後進行線性迴歸分析[3-5]。

結 果

本研究使用四種的培養基，針對三種品管菌株進行總菌落數的偵測，在 *E. coli* 方面，M-H II、TSA 與 NA 與 TGEA 比較，其生長菌落數經成對 t 檢定，皆無統計學上的差異；在 *P. Peruginosa* 方面，NA 的生長菌落數較 TGEA 少，且有統計學上的差異；至於 *S. aureus*，在 M-H II 生長的菌落數比 TGEA 多且有統計學差異，其餘則無差別(表一)。

各種培養基生長的菌落數經 \log_{10} 轉換後，進行線性迴歸分析，以 TGEA 與 M-H II 比對，發現有很強的正相關，相關係數 $r=0.8649$ ，斜率為 0.925，與 y 軸的截距為 +0.165，一致度檢定的相關係數(ri)為 0.93，其 95 信賴區間介於 0.86-0.96，代表兩者對菌落數的生長無差別。其餘 TGEA 與 TSA，TGEA 與 NA 的迴歸比較亦有相同的正相關及一致度。(圖一、圖二、圖三)

在進行臨床檢體於不同培養基的比較，呼吸治療裝置潮溼器用水 13 件，血液透析用水 45 件，奶水 10 件，果汁冷飲 5 件，共 73 件，其中同時接種於 TGEA 與 M-H II 培養基有 73 件，依不同檢體種類進行成對 t 檢定，皆無統計學上的差異(表二)。同時接種 TGEA 與 TSA 或 NA 各有 13 件，不區分檢體種類，進行成對 t 檢定，TGEA 之平均值及標準差分別為 3.54、0.422，TSA 為 3.48 ± 1.43 、NA 為 3.44 ± 1.46 ，與 TGEA 培養基的菌落數之成對 t 檢定皆無顯著差異。

本研究選擇的各種培養基其成份都含有胺基酸、氮化合物、碳水化合物以作為細菌生長的來源，培養基廠商建議原始用途如表三[6]，於實驗室自行配製的成本以 TGEA 每片 10 元最便宜，TSA 每片 11.3 元最昂貴，每片成本的差距僅 1.3 元(表四)。

討 論

本研究結果中，不論何種標準品管菌株，接種量為 1mL 於不同培養基經傾倒平板法培養 48 小時後，菌落數經 log10 轉換後，M-H II、TSA、NA 分別與 TGEA 進行線性迴歸分析，均呈現很強的正相關，相關係數 r 分別為 0.8649、0.9352、0.9358，其斜率亦介於+0.925-+1.009，與 Y 軸截距接近 0。TGEA 與 M-H II 的一致度為 0.93(95%CI=0.86-0.96)、另外與 TSA、NA 分別為 0.96(95% CI=0.92-0.98)、0.94(95%CI=0.88-0.97)(圖一~三)。在基數資料一致度檢定時，當 95 信賴區間的下限高於 0.75 時，其資料的一致度是被接受。而環境監測檢體，如呼吸治療裝置潮溼器用水、血液透析用水、奶水、果汁冷飲，於各種培養基的菌落數，經成對 t 檢定，亦皆無統計上差異(表二)，三項資料顯示微生物實驗室中常見的培養基 M-H II、TSA、NA 都可適用於呼吸治療裝置潮溼器用水、血液透析用水、奶水、果汁冷飲的總生菌測定。至於水質檢測，由於飲水中含有餘氯，依環保署民國 88 年 7 月 12 日之公告使用培養基仍以 TGEA 為主，故進行水質檢測時為符合環保署要求，仍建議使用 TGEA 為宜。

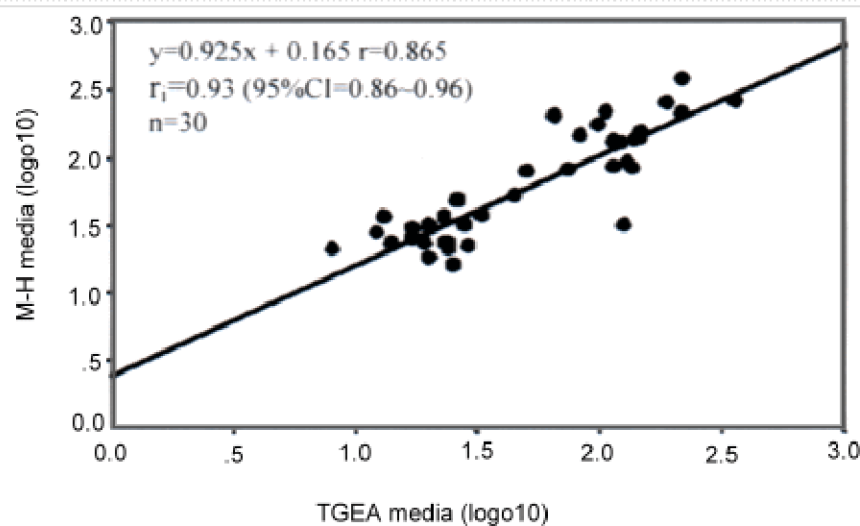
檢測方法中每片培養皿所須加入 15-20mL 的培養基，依經驗每一公升可配 60-70 片，於分析成本時，是以每公升 60 片計算，各種培養基於實驗室自行配製的成本以 TGEA 每片 10 元最便宜，TSA 每片 11.3 元最昂貴，不過每片成本的差距僅 1.3 元，故於選擇培養基時，成本的考量不是最大因素(表四)，雖然各醫院購買培養基粉末的費用不盡相同，但對每片培養皿的成本影響不大。另外購買現成配製好的培養基不適用傾倒平板法。研究中未將 *Mycobacterium* spp.及 Moldform 等環境微生物納入，因這類微生物培養時間需較長，一般在 48 小時的培養不易形成菌落。至於 *Streptococcus* 所需營養較不同，一般在 TGEA 亦不易生長良好。本研究未將兼性厭氣菌及厭氧菌納入分析，是因考量培養環境在好氧狀態且不含 5% CO₂，本來即無法提供這些微生物的生長，故未納入。在比較不同培養基總菌落數生成的一致性，進行 30 次比對在統計學上是可被接受，未來若檢體數更多時，其參考性將更高。

本研究中未使用 5%羊血培養基進行比較，因傾例平板法是先加入檢體後再加入已滅菌溫熱的培養基，而 5%羊血培養基配製過程較為複雜，因羊血相當營養易於配製中受污染，另外亦不容易進行菌落計數，故未納入比較。

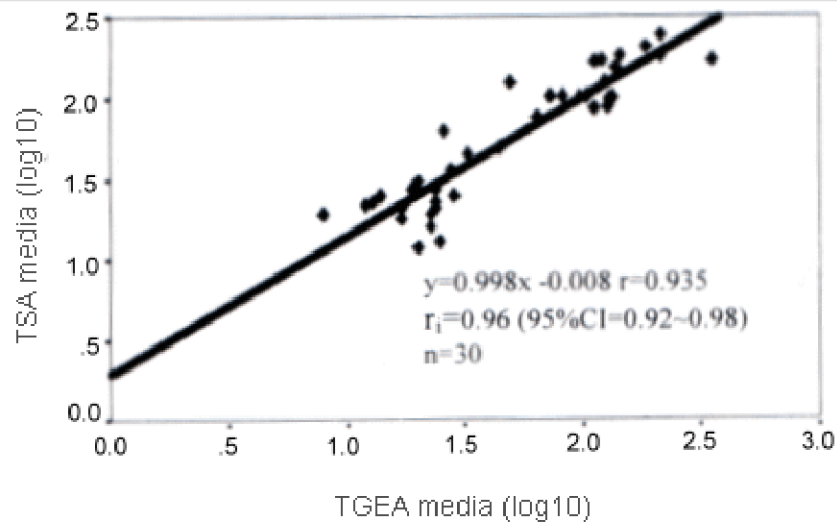
實驗室進行總菌落數測定時，大部份是使用 9 公分直徑的培養皿，依此面積而言，若菌落數目超過一定數量時，常會形成菌落過多而無法計數清楚，故常會利用稀釋的方法將樣本在單位體積內的數目稀釋，降低至可以計數或可單獨分離的程度[4]。在細菌計數方面的稀釋通常是以 10 倍體積連續稀釋，因此稀釋過程中須特別注意，稀釋前樣本須已完全均勻混合，以免影響實驗結果的正確性。常用的稀釋液為 1.磷酸緩衝液；2.生理食鹽水；3.peptonewater(0.1%；1 公克 peptone 加入 1000mL 實驗用水)，一般不直接以蒸餾水做為稀釋液，因蒸餾水對微生物而言是屬於低張溶液，會使活的微生物脹破，而使計數的總生菌落數偏低[7]。

比對 M-H II 與 TGEA 培養基的成分，於 M-H II 的酪蛋白(casein)含量比 TGEA 高 12.5 公克，其蛋白質、胺基酸含量較高，若微生物可利用酪蛋白作為主要能量來源時，在 MH II 的生長菌落數會較佳，是否酪蛋白造成 SA 之生長菌落較多，有待進一步探討。細菌的生長必須處於有適當養分之環境，但若處於養分較低的情形下，細菌為適應環境的挑戰，將會改變一項或多項新陳代謝機轉以求存活。菌落計數的基本假設是每一活細胞都可長成一菌落，是以菌落的數目來估計定量體積樣本中的

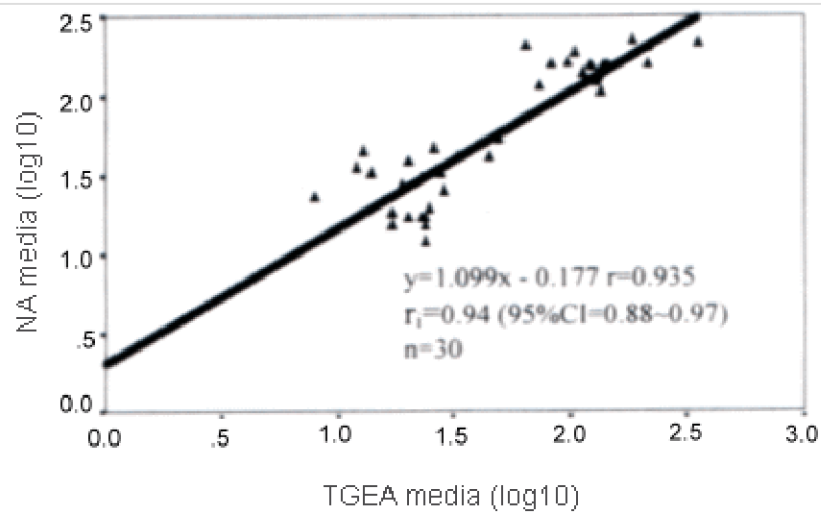
活菌數，不過要特別注意培養基及培養條件，由於這些因素對菌落的生成有相當的影響。此種方法並非直接測定樣本中的活菌數，故其求出的活菌數單位是以菌落形成單位(CFU)來表示。曾有數個研究指出有一群細菌在飲水、湖水、地下水或冷卻水塔水，以特殊 Acridineorange 染色於顯微鏡下觀察有活菌存在，但卻因培養基的成份無法提供適當的養分而無法形成菌落，例如 *Vibriospp.*、*Salmonella spp.*、*Legionella spp.*、*Campylobacterspp.*等[8-10]。1988 年 Byrd 等人的研究指出有些飲水中的微生物是無法被總生菌檢測法培養出來，如 *Klebsiella pneumoniae*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Enterobacteraerogenes*、*Streptococcus faecalis*、*Micrococcus flavus* 等細菌於無菌蒸餾水 4-10 天直接觀察活菌的檢測可見細菌的存活，卻無法於培養基中形成菌落[8]。而 1986 年 McFeters 等人亦發現在飲水中有些受傷的大腸桿菌屬細菌於大腸桿菌屬檢測法中無法被偵測出，其原因有飲水中含有餘氯、其他的殺菌劑、低濃度的金屬如銅或鋅、極端的溫度及 pH 值，或有些偵測培養基含有膽鹽等因素[11]。由於目前醫院的環境檢體，如呼吸治療裝置潮溼器用水、血液透析用水、奶水、果汁冷飲是不含餘氯、殺菌劑或其他上面所提之原因，因此總菌落數不受這些因素影響。



圖一 標準菌於 TGEA 培養基與 M-H II 培養基生長菌落數迴歸線及一致度



圖二 標準菌於 TGEA培養基與 TSA培養基生長菌落數迴歸線及一致度



圖三 標準菌於 TGEA 培養基 NA 培養基生長菌落數迴歸線及一致度

表二 臨床檢體於 TGEA 與 M-H II 之菌落數

檢體及菌落數 培養基	呼吸治療裝置	血液透析用水	奶水	果汁冷飲
	平均值±標準差 (n)	平均值±標準差 (n)	平均值±標準差 (n)	平均值±標準差 (n)
Tryptone glucose extract agar	3.60 ± 1.67 (13)	1.93 ± 0.64 (45)	1.23 ± 0.43 (10)	2.61 ± 1.29 (5)
Mueller-Hinton II agar	3.62 ± 1.63 (13)	1.86 ± 1.05 (45)	1.02 ± 0.41 (10)	2.83 ± 1.70 (5)
成對 t 檢定 p 值	0.919	0.514	0.257	0.594

*p-value 以 TGEA 培養基之菌落數為基準進行成對 t 檢定

表三 各種培養基成份表

培養基-用途	成份	公克
Tryptone glucose extract agar 用於進行奶水、食物、酪農業、水及其他環境微生物衛生監測	pancreatic digest of casein	5.0
	beef extract	3.0
	dextrose	1.0
	agar	15.0
Mueller-Hinton II agar 用於進行紙錠擴散藥物敏感測試	beef extract	2.0
	acid hydrolysate of casein	17.5
	starch	1.5
	agar	17.0
Tryptone soy agar 保留菌培養、細菌增菌	tryptone	15.0
	soy peptone	5.0
	NaCl	5.0
	agar	12.0
Nutrient agar 20 世紀初期用於水、污水、糞便、及其他環境微生物衛生監測	peptone	5.0
	beef extract	3.0
	NaCl	8.0
	agar	12.0

表四 各種培養基成本比較

培養基	每瓶 500 公克 配製培養基數量	元 / 片
Tryptone glucose extract agar	1,250	10.0
Mueller-Hinton II agar	789	11.0
Tryptone soy agar	810	11.3
Nutrient agar	1,071	10.7

* 含培養基、培養皿及配製人力成本

誌 謝

本研究為台北榮民總醫院民國 88 年院內研究補助計劃，計劃編號為 88-200。感謝敏盛醫院鍾清如醫檢師的部份實驗協助。

參考文獻

1. Aerobic plate counts. In bacteriological analytical manual of the division of microbiology center for Food Safety and Applied Nutrition US Food and Drug Administration. 6th ed. 1984; 1-50.
2. American Public Health Association. Section 9215A and B. In Standard methods for the examination of water and wastewater: 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1995: 45-67.
3. Jackson RW, Osborne K, Barnes G et al: Multiregional evaluation of the SimPlate heterotrophic plate count method compared to the standard plate count agar pour plate method in water. Appl Envir Microbiol 2000; 66: 453-3.
4. 郭英調：臨床研究手冊。台北：合慶國際圖書有限公司 2000. p24.
5. Townsend DE, Naqui A: Comparison of Sim-Plate total plate count test with plate count agar method for detection and quantitation of bacteria in food. J of AOAC International 1998; 81: 563-9.

6. Power DA, McCuen PJ: Manual of BBL products and laboratory procedure 6th ed. Becton Dickinson Microbiology systems. 1988: 202-89.
7. 林明澄：總生菌數檢驗方法介紹。感控雜誌 1999; 9: 49-55.
8. Gurijala KR, Alexander M: Role of sublethal injury in decline of bacterial populations in lake water. Appl Envir Microbiol 1988; 54: 2859-61.
9. England AC, Fraser DW, Mallison DC, et al: Failure to predict culture results from disinfectant-treated air conditioning cooling towers. Appl. Environ. Microbiol. 1982;43: 240-4.
10. Byrd JJ, Xu HS, Colwell RR: Viable but nonculturable bacteria in drinking water. Appl Envir Microbiol 1991; 57: 875-8.
11. McFeters GA, Kippin JS, Lechevallier MW: Injured coliforms in drinking water. Appl Envir

Evaluation of the use of different culture media for the total plate colony count.

Ming-Yin Lin¹, Wang-Wai Wong², Benjamin IT Kou², Fu-Der Wang¹

¹ Nosocomial Infection Control Committee, ² Division of Infectious Disease, Department of Medicine, Taipei Veteran General Hospital

Total plate colony count, or total plate counting (TPC), is a method employed to estimate the bacterial or fungal loads of drinking water, food samples, or other liquids used in the medical care of patients. The standard method of American Public Health Association for the TPC is to use the pour-plate method on tryptone glucose extract agar (TGEA). We studied the feasibility of replacing the TGEA with other culture media commonly used in the clinical microbiology laboratory. The same protocol was used to measure the recovery of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* in Mueller-Hinton II agar (M-H II), tryptone soy agar (TSA), and nutrient agar (NA). The results were compared with those of the TGEA that were performed simultaneously. Each medium was repeatedly tested ten times for each of the three organisms, and also tested with moisturizing solutions for ventilators (13 specimens), milk (10), cold drinks (5), and dialysis fluids (45). All 73 of these specimens were tested simultaneously in TGEA and M-H II, and 13 in TGEA and TSA or NA. The colony counts were first converted to log₁₀ values. Paired t test, linear regression analysis and the agreement of intra-class correlation coefficient (ri) were used to compare the results generated by 4 culture media. The study showed that M-H II, TSA, and NA all produced comparable results by the agreement test (ri=0.93, 0.96, 0.94, respectively). Our results suggest that M-H II, TSA, and NA may be suitable as the alternatives to TGEA for the TPC of dialysis fluids, milk, cold drinks, and the moisturizing solutions for ventilators. (Nosocom Infect Control J 2001;11:289-98)

Key words: environment microorganisms、culture method、total plate count