

總生菌檢驗方法介紹

林明澄

台北榮民總醫院感染管制委員會

前言

於環境衛生之生物性監測的方法中，其偵測或計數的微生物常是指標微生物而不是臨床上常見的致病菌，環境中的物品，除非已經由滅菌處理，否則不論是自來水、食物或其它物品，都可能含有各種不同種類的微生物，各物品或水中的微生物組成相當複雜，常因水樣或物品的不同而微生物的種類亦有所不同，至今仍無一種單一的方法、單一的培養基或單一培養溫度，可將物品或水樣中的微生物做到完全的培養及分離。由於無法由單一培養溫度及時間得到最高的菌落數目，所以初期進行總生菌培養時須依培養基的種類，做數種培養溫度及培養時間的組合調整，以求出最佳的檢驗結果。

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生菌數的測定方法，許多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。總生菌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，以了解樣本被污染之情形。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（colony forming unit; cfu）來表示。

一般於實驗室進行總生菌數測定時，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，常會無法計數清楚，因此於進行此測定方法時，會利用稀釋的方法，以方便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。在實驗室內常用來稀釋樣本方法是連續稀釋法（serial dilution），稀釋的倍數通常是以 10 倍的體積連續稀釋，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. peptone water（0.1%；1 公克 pepton 加入 1,000mL 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。

傾倒平板法 (pour plate method)

一、原理

將定量的待測樣品放入培養皿中，再

加入未凝固之瓊脂培養基，混合後，待瓊脂培養基凝固，於定溫下培養一定時間。

二、操作步驟

1. 進行無菌培養皿編號，每稀釋倍使用二個培養皿，每個樣品進行三稀釋倍（ 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} ），共六個培養皿（如流程圖）。
2. 以 Pipet 接裝無菌 1mL blue tip 或使用 1mL 無菌吸管。
3. 各吸 1mL 樣品原液至 2 個無菌培養皿。
4. 取 1mL 樣品原液加至 9mL 稀釋液（ 10^{-1} ）。
5. 各吸 1mL 稀釋（ 10^{-1} ）樣品至 2 個無菌培養皿；其餘類推。
6. 加已冷卻至 45-50 °C 約 15 ~ 20mL

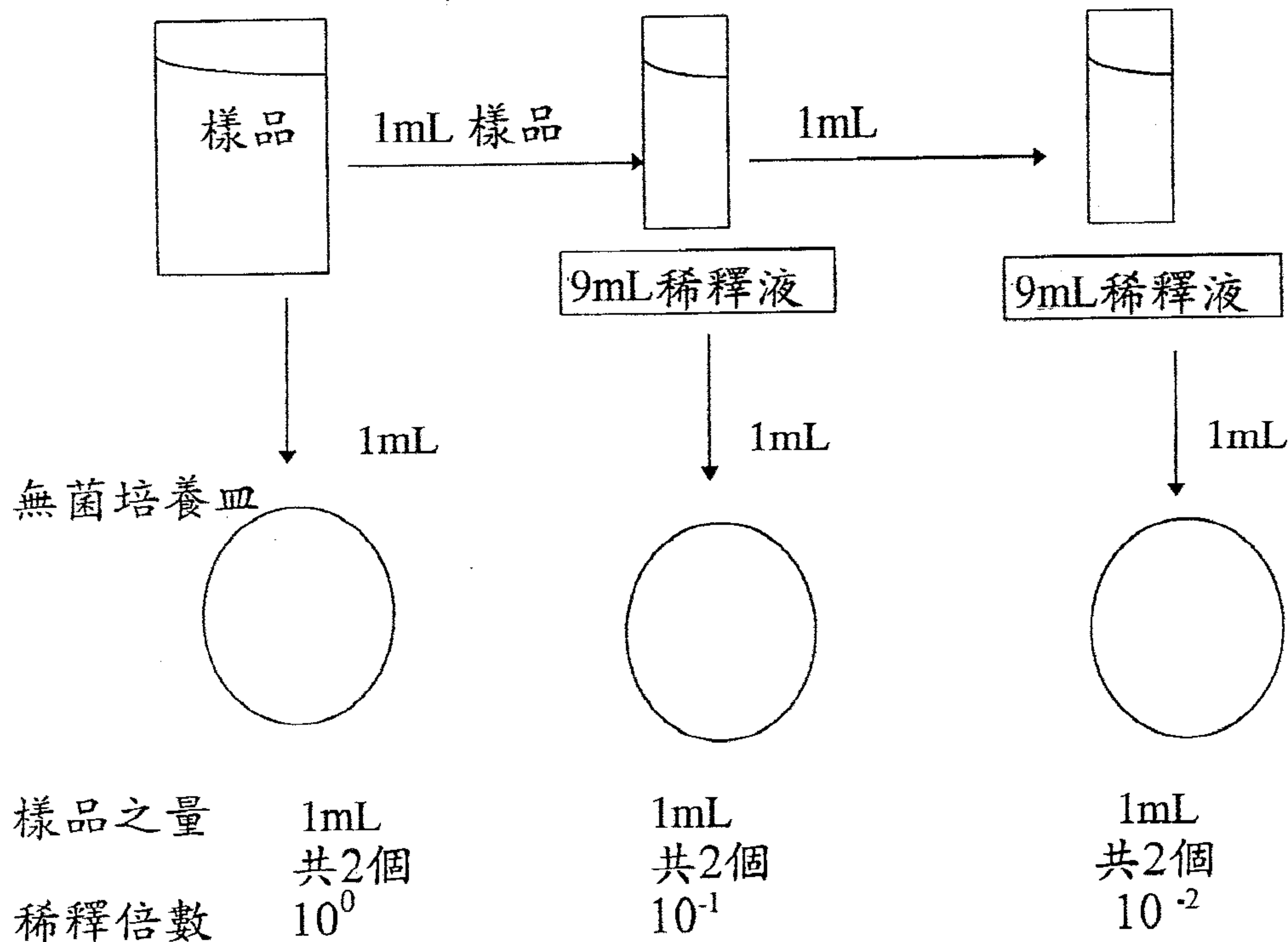
培養基（如 standard method agar、trypticase soy agar、nutrient agar …等）至含樣品培養皿內。

7. 於室溫凝固後，置於 35-37 °C 的溫箱中。
8. 48 小時後，計算總生菌數。

三、注意事項

1. 樣品混合時，要將培養皿前後左右各旋轉六下。
2. 加入樣品水樣後，須於 20 分鐘內加入培養基（最好在 10 分鐘內）。
3. 每個稀釋倍數至少要有二個培養皿。
4. 剩餘之培養基不可再滅菌使用。
5. 培養基若觀察有沉澱或混濁時，須丟棄不可再使用。
6. 以下因素會影響傾倒平板法，導致觀

總生菌數流程圖



察的菌落數偏低。

- (1)微生物通常是擠在一起，不容易被振盪分開。
- (2)培養基無法提供所有微生物生長之養分。
- (3)培養的溫度。
- (4)培養的時間。
- (5)培養環境的含氧量。
- (6)微生物本身的生理特性。

塗抹平板法 (spread method)

一、原理

將稀釋好的樣品定量放在已配製凝固的瓊脂培養基表面，利用角度約 120° 的三角玻璃彎棒在培養基表面塗抹均勻，於定溫下培養一定時間。

二、操作步驟

1. 進行無菌培養皿編號，每稀釋倍使用二個培養皿，每個樣品進行三階稀釋倍 (10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})，共六個培養皿 (如流程圖)。
2. 取事先配製完成的含 15 ~ 20mL 培養基的培養皿。
3. 各吸 0.2mL 樣品原液至 2 個無菌培養皿。
4. 取 1mL 樣品原液加稀釋液至 9mL 稀釋液 (10^{-1})。
5. 各吸 0.2mL (10^{-1}) 樣品至 2 個無菌培養皿；其餘類推。
6. 將玻璃棒置於酒精中，取出過火滅菌，待冷卻後使用。
7. 已滅菌之彎曲玻璃棒放在培養皿上使樣品均勻分佈於培養基表面。
8. 室溫凝固後，置於 35-37 °C 的溫箱

中。

9. 48 小時後，計算總生菌數。

三、注意事項

1. 使樣品均勻分佈的方法為：
 - (1) 玻璃棒不動，旋轉培養皿使樣品分散。
 - (2) 培養皿不動，只用玻璃棒將樣品分散。
2. 已配培養皿的表面必須乾燥不含水份，以免樣品無法附著。可事先放於 42 °C 的烤箱中或無菌操作台內讓培養皿表面乾燥。
3. 放置之樣品量以不超過 0.5mL 為宜，以免樣品量過多，無法完全被培養基附著，致使生長的菌落因水份的存在而游動或無法呈現單獨的菌落以供計數。

濾膜過濾法 (membrane filter method)

一、原理

利用樣品微生物於過濾的過程中，使用孔徑較微生物小的濾膜，而可停留在濾膜的上方，之後將濾膜放置於適當的培養基中培養，於定溫下培養一定時間，即可得知在濾過的樣品中微生物的數目。

二、操作步驟

1. 裝置過濾設備。
2. 每個樣品進行適當的三階稀釋倍 (如 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})。
3. 將各樣品 (包括已稀釋過的水樣) 各 100mL 分別過濾不同的濾膜。
4. 以無菌攝子將濾膜取下置於已配製完成的 5 公分的培養皿。

5. 置於 35-37 °C 的溫箱中。
6. 48 小時後，計算總生菌數。

濾膜的要求：

1. 濾膜的直徑約 47-50mm，厚度 0.8mm，吸收各種培養基的量約 $2.0 \pm 0.2\text{mL}$ ，至少 70% 的濾膜表面應有孔隙存在，且濾膜浮於水面上時，濾膜應均勻溼潤，不可有任何小點或空隙仍處於乾燥狀態。
2. 濾膜上不可含有任何一種刺激或抑制微生物生長的物質，並且不能有任何直接或間接會影響培養基中微生物指示系統變化的物質。
3. 濾膜及其襯墊濾紙於 121 °C，10 分鐘的滅菌過程中不會受到破壞。測試其滅菌效果時，可將此濾膜加入足量的 tryptone glucose extract broth，並置於 tryptone glucose extract agar 培養皿上，37 °C 培養 24 小時，觀察有無微生物生長來確定之。
4. 生長在濾膜的菌數，當以五次重複的平均值，不少於在直接接種於瓊脂培養皿上菌數算術平均數目的 90%，此時表示濾膜不具任何抑制性物質存在。
5. 每次使用新購濾膜時，要與原先使用的濾膜進行相對觀察，如濾膜形狀、柔軟度、殺菌後濾膜的邊緣是否正確。另外對相同的微生物，長在濾膜上菌落大小是否正確，是否仍有正常的顏色變化，濾膜上的格子線是否會影響微生物生長情形，菌落在濾膜上的分佈是否均勻。

三、注意事項

1. 適用容量大的液體的樣品（如無菌注射液、無菌液體藥品）。
2. 由於濾膜的直徑只有 5 公分，進行濾膜法計算總菌落數，每個濾膜上最適當之菌落密度為 20 ~ 200。若菌落很小且不擁擠，最高的菌落數為 300 亦接受。
3. 使用前須準備過濾的裝置及濾膜。安裝過濾裝置時，注意抽吸管與 pump 的安裝方式，以免將樣品倒吸至馬達，而使馬達損壞。

總生菌數的判讀

1. 選擇菌落數介於 25 ~ 250 的稀釋倍計算菌落數，以該稀釋倍，二個培養皿的菌落數求平均，再乘以稀釋倍數（表一，範例一）。
2. 若一個介於 25 ~ 250，另一個超過 250 時，則取二個平均值，再乘以稀釋倍數（表一，範例二）。
3. 若原液或最低稀釋倍數二個培養皿的菌落數皆小於 25，則報告 $<25/\text{mL}$ 或 $<25x$ 最低稀釋倍數，或二者求平均，但備註其為估計值（表一，範例三）。
4. 各稀釋倍數的培養皿均無生長，則報告 $<1x$ 稀釋倍數，並註明為估計生菌數（表一，範例四）。
5. 所有培養皿的菌落都大於 250 個，則報告 $>250x$ 最高稀釋倍數（表一，範例五）。
6. 若二個稀釋倍數中有三個培養皿菌落都介於 25 ~ 250 個之間，則取四個值求平均，再乘以稀釋倍數（表一，範例

六)。

7. 若二個稀釋倍數中有三個培養皿或各有一個培養皿菌落介於 25 ~ 250 個之間，另一培養皿有擴散菌時，則取三個值求平均，再乘以稀釋倍數（表一，範例七、八）。

8. 擴散菌之覆蓋面積大於培養基 1/4 時，不予計數，若擴散菌成鏈狀時，一條代表一個菌落。二條代表二個菌落。

總生菌數操作注意事項

1. 計算菌落時可使用低倍放大鏡。
2. 如果培養時間很長，必須注意培養基

在培養箱中水份蒸發的問題，可在保溼培養箱中做長時間培養，或以塑膠袋封口來保持培養皿中培養基的溼度，一般培養過程中水份的散失不可以超過 15%。

3. 如果含微生物樣品不慎打翻，必須以含有殺菌效果的消毒劑衛生紙至少覆蓋 15 分鐘以後，才可將衛生紙移除，並依照感染性廢棄物的處理方法處理。

4. 總生菌數測定方法的優缺點比較請參考表二。

表一 總生菌結果判讀範例範例

範 例	樣品稀釋後之各培養皿的菌落計數			發報告方式
	1:100	1:1,000	1:10,000	
1	TNTC	<u>175</u>	16	190,000
	TNTC	<u>208</u>	17	
2	TNTC	<u>245</u>	23	260,000
	TNTC	<u>278</u>	20	
3	<u>18</u>	2	0	1600*
	<u>14</u>	0	0	
4	0	0	0	<100*
	0	0	0	
5	TNTC	TNTC	<u>523</u>	5,100,000* 或 >2,500,000
	TNTC	TNTC	<u>487</u>	
6	TNTC	<u>224</u>	<u>25</u>	250,000
	TNTC	<u>245</u>	<u>30</u>	
7	TNTC	<u>225</u>	<u>21</u>	270,000
	TNTC	<u>255</u>	<u>40</u>	
8	TNTC	<u>245</u>	<u>35</u>	290,000
	TNTC	<u>230</u>	spreader	

註：底線代表總生菌數計數的選取範圍

表二 總生菌數測定方法之優缺點比較

檢測方法	優點	缺點
傾倒平板法	1.加入的檢體為 0.1 ~ 2mL。 2.誤差度較塗抹平板法小。	1.菌落較小，長的較慢。 2.菌落因長在培養基內，不容易被次培養。 3.菌落易被誤認為氣泡。
塗抹平板法	1.菌落長在表面，容易次培養。 2.菌落可長的較大。 3.操作容易。 4.費用較便宜。	1.加入檢體量較少，只有 0.1 ~ 0.5mL，故誤差度較大。 2.培養皿表面須事先烤乾。
濾膜過濾法	1.可測量大量水樣檢體 (ex:100mL) 2.樣品中菌落數極少時，過濾法有濃縮效用，故可提高檢測的準確性。	1.過濾的樣品中菌落數須介於 1 ~ 10cfu/mL 之間。 2.接種的濾膜面積較小。 3.污染較高或菌落數較多的樣品不宜使用此方法。 4.濾膜裝置較昂貴。 5.須事先評估濾膜的效能。

結 語

一般進行總生菌數測定初期，初期檢測時，其檢測頻率要較為密集，待檢驗結果持續在標準範圍內，即可考慮將檢測頻率降低。基於實驗過程的品管，若檢驗是由同一人員操作，至少 10 % 的樣品必須重複測試，以了解分析的精密度。若由兩位以上的人員進行分析工作時，至少每月對呈陽性的樣品做平行測試分析，以監測不同分析員間之分析結果。

單次的總生菌數的檢測結果不合格時，須再複查一次再確定之。總生菌的數量甚高或比參考標準值高出很多時，代表該樣品受到污染，工作人員即要思考其原

因並且加以改善。院內感染環境微生物監測的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，僅檢查一次的結果並不一定保證其安全性，因此仍須實地的觀察物品或水樣相關環境的整潔情況，以確保這些物品的安全性，以免造成不必要的感染傳播。

參考文獻

1. Aerobic plate count. In 6th ed. bacteriological analytical manual of the division of microbiology center for Food Safety and Applied Nutrition US Food and Drug Administration. 1984; 1-50
2. The bacteriology of water. In Topley & Wilson's: Principles of bacteriology, virology and immunity 8th ed volume 1, a division of Hodder & Stoughton, London, 1990; 244-64

3. American public health association. Standard methods for the examination of water and wastewater: microbiological examination. 18th ed. 1993. Chapter 9, 1-39
4. Ginsburg W: Improved total count techniques. Proc 1st Annu. Water quality technol. Conf. American water works assoc., Pa-per No VIII
5. Klein DA, Wu S: Stress: a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments.
6. Water pollution and water quality control In Herman K, Michael B.: Handbook of environmental health and safety principles and practices. 3rd ed Vol II 1996. Chapter 7 509-607
7. Reasoner DJ, Geldreich EE: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Enviro Microbiol 1985;49:1-5