

大腸桿菌群檢驗方法介紹

林明澄

台北榮民總醫院感染管制委員會

前言

大腸桿菌群 (coliform) 檢測可適用於家庭用水、工業用水或其它食品的衛生指標，檢測方法主要是測定衛生品質的好壞，其次才著重於數量的多寡，檢測範圍較一般致病菌的範圍更廣泛，大腸桿菌群的密度與微生物污染程度成正比，目前測定此群細菌之有無已成為檢測水中或食物是否受腸道微生物污染的指標方法。

大腸桿菌群的定義，指革蘭氏染色陰性，好氧或兼性厭氧的不產芽胞桿菌，並且能在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 48 ± 1 小時，發酵乳糖 (lactose) 並產生氣體 (CO_2) 之細菌群。此群微生物的名稱是依測定方法而來，不是依生物學系統性分類方法進行鑑別，所以分屬於不同種，至少含有 4-10 種，故以大腸桿菌群統稱。此群微生物一般存在溫血動物中的腸道及糞便，臨床上腸內桿菌屬如 *E. coli*、*E. freundii* (*Citrobacter freundii*)、*Aerobacter aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*)、*Aerobacter aloacae*、*Enterobacter* spp.、*Citrobacter* spp.、*Klebsiella* spp. ……等皆屬之，雖然綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、*Aeromonas* spp. 可發酵乳糖但不屬於此群細菌。一般可利用乳糖的革蘭氏陰氏性

桿菌，通常是細菌的質體 (plasmids) 上帶有可分解乳糖的基因，由於質體位於細菌染色體之外，可經由細菌間的接觸而將質體傳給不同種的革蘭氏陰性桿菌。

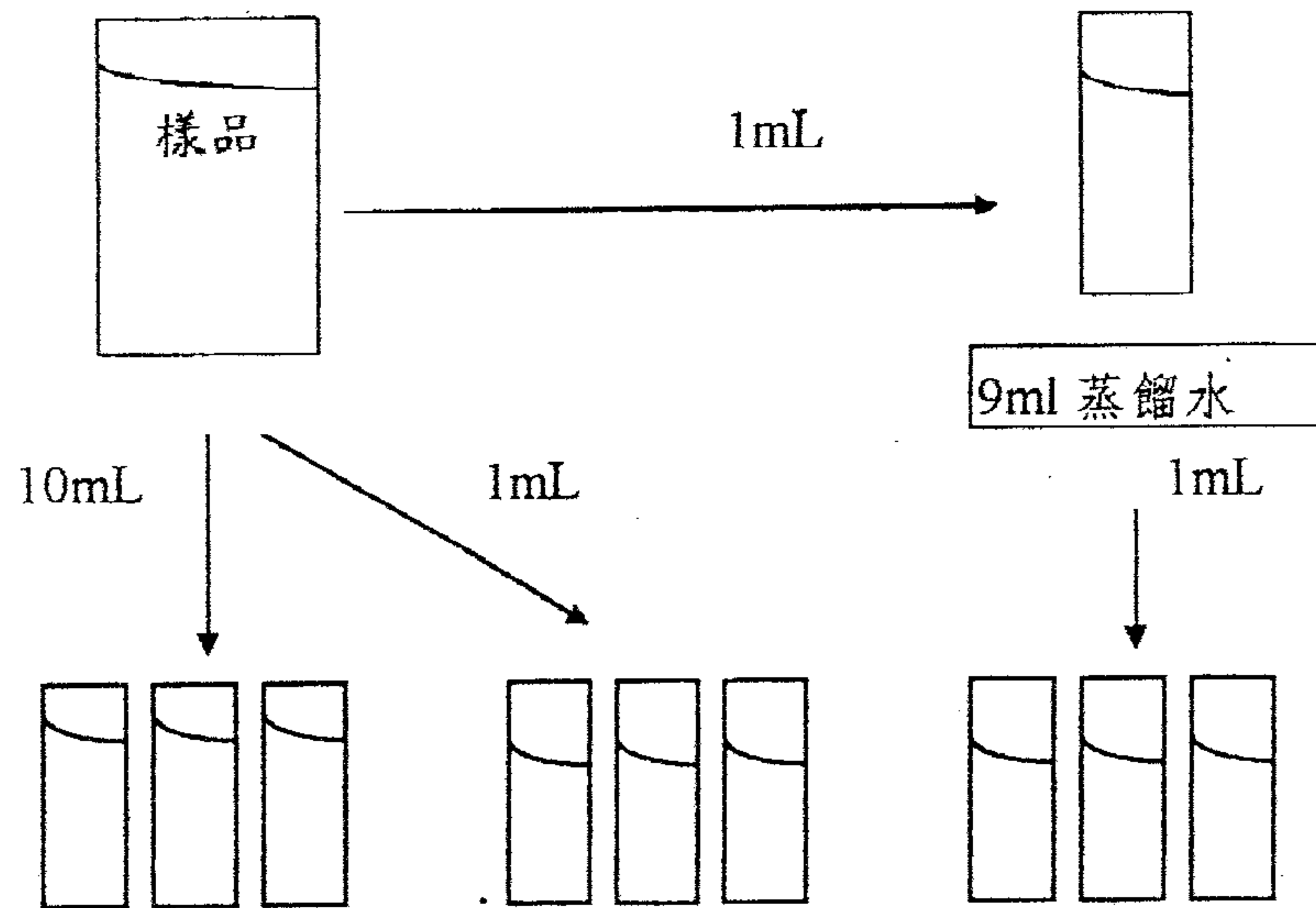
飲用水設備維護管理辦法中第七條規定公私場所設置供公眾飲用之連續供水設備，以自來水為水源者，經設備處理後水質，應每隔三個月檢測大腸桿菌群及總菌落數。其它項目仍應符合飲用水水源標準及飲用水水質標準 (若飲用水設備出水溫度在 90°C 以上者，免定期檢驗水質)。單一細菌水樣大腸桿菌群密度標準為 $\leq 6.0/100\text{mL}$ (多管醱酵法) 或 ≤ 6.0 菌落 / 100mL (濾膜過濾法)。而各類食品衛生標準，如乳品類、冰類及飲料類、嬰兒食品類、冷凍食品類的大腸桿菌群密度標準皆為陰性，唯一例外的食品是冷凍生食用牡蠣，其標準為 $\leq 230/100 \text{ mg}$ 。

大腸桿菌群測定

壹、乳糖多管醱酵法 (參考圖一)

一、原理：

指應用不同體積或不同稀釋倍數之水樣或食品等，以檢測醱酵乳糖大腸桿菌群存否及平均密度之方法，為估計懸浮於溶液中活菌數的一種方法，又稱為最大可能數測試法，估算 100mL 容量中存在之大腸桿菌群數目，所產生之結果以「最大可



BGLB broth 之濃度	2x	1x	1x
容量	10mL	9mL	9mL
樣品之量	10mL	1mL	1mL
	共3管	共3管	共3管
稀釋倍數	1	10^{-1}	10^{-2}

圖一 多管發酵法流程圖

能數」(most probable number; MPN)

表示，屬於定量測定方法。

二、操作步驟

(一)推測試驗 (presumptive test)

1. 樣品標示編號

2. 進行 lauryl sulfate tryptose

broth(LST) 試管編號，每個樣品進行三稀釋倍 (10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})，每稀釋倍 3(或 5) 管，共 9(或 15) 管

3. 以 10mL 吸管各取吸 10mL 樣品原液加至 3 管 10mL LST(10^0

，2 倍濃度)

4. 混合均勻

5. 以 pipet 接裝無菌 1mL blue tip 或 1mL 無菌吸管 (須定量)

6. 各吸 1mL 樣品原液至三管 9mL LST(10^{-1})，混合均勻

7. 取 1mL 樣品原液加至 9mL 稀釋液，混合均勻

8. 各吸 1mL 稀釋樣品至 3 管 9mL LST(10^{-2})，混合均勻

9. 置於 35-37 °C 的溫箱中，48 ± 2 時，觀察結果，若為陽性則進行確

認試驗

(二) 確認試驗 (confirmed test)

1. 將推測試驗陽性的試管混合均勻
2. 使用直徑 3 mm 的接種環 (loop) 將試驗陽性的試管，次培養於 2% brilliant green lactose bile broth (BGLB) 試管內，混合均勻
3. 置於 35-37 °C 的溫箱中
4. 48 小時後，觀察結果

三、結果判讀

1. 推測試驗 (LST) 醱酵乳糖陽性時肉湯呈黃色，產氣體則於 Durham tube 內會有空氣或氣泡。
2. 若未呈黃色而有產生氣體時，亦要次培養至 BGLB 試管內。
3. 確認試驗 (BGLB) 陽性時肉湯由綠色變為黃色，產氣體於 Durham tube 內會有空氣或氣泡。

四、大腸桿菌群指標密度 (Coliform index) 計算公式；陶姆斯 (H. A. Thomas, Jr.) 公式：

最大可能數 (MPN/100mL) =

$$\frac{\text{醱酵為陽性之管數} \times 100}{\sqrt{\text{醱酵為陰性之水樣 (mL)} \times \text{接種之全部水樣 (mL)}}$$

五、實例介紹

(一) 進行三稀釋倍 (10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})，每稀釋倍數測試三管，其檢測結果分別為 10^0 陽性 2 管、 10^{-1} 陽性 1 管、 10^{-2} 陽性 1 管，其大腸桿菌群指標密度為何？

說明： 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 各三管，代表加入樣品量為 3 管 10

mL、3 管 1mL、3 管 0.1 mL，樣品總量為 33.3mL，陽性樣品量為 21.1mL，陰性樣品量為 12.2mL，依計算公式， $MPN = 4 \times 100 / \sqrt{(12.2 \times 33.3)} = 400/20.15 = 19.95$ 。

(二) 進行飲水檢測分別接種 10mL 樣品至 10 管培養肉湯，檢測結果為 4 管陽性，其大腸桿菌群指標密度為何？
說明：10 管 10mL 代表加入樣品總量為 100mL，陽性樣品量為 40mL，陰性樣品量為 60mL，依計算公式， $MPN = 4 \times 100 / \sqrt{60 \times 100} = 400/77.46 = 5.16$ 。

六、注意事項：

1. 當推測試驗陽性時，以接種環取 LST 內的菌液時，避免取到表面的菌膜 (pellicle)。
2. 飲用水樣品量，可採加入量為 10 管 10mL，5 管 20mL 或 1 管 100mL，其它用水或食品則是進行三個稀釋倍數，每個稀釋倍數 3 ~ 5 管。
3. 此方法接種的體積都很大，所以於接種樣品時須特別留意培養基與樣品體積的比率，以免培養基濃度不足而影響檢測結果。因此在製備培養基時要考慮體積與濃度的最終關係，才可維持培養基各成份最終濃度不變。(表一)
4. 本方法除了做大量檢測樣品測定外，其估測得到的活菌數正確數並不

高。

5. 若於接種前樣品未混合均勻，而有菌落群聚，可能會使MPN值低估。

6. 陽性結果可以依公式計算或查MPN表，MPN表是以波以松分

佈 (Poisson distribution) 推算出。(表二)

7. 測定方法的精確度依測定管數的多寡而定。

表一 不同樣品體積與培養基濃度對照表

樣品體積 (mL)	培養肉湯體積 (mL)	總體積 (mL)	100mL 培養基的重量倍數	BGLB 營養基 (40gm/1000mL)
1	10	11	1.0	40
10	10	20	2.0	80
10	20	30	1.5	60
20	10	30	3.0	120
100	50	150	3.0	120
100	20	120	6.0	240

表二 三階三管及三階五管最大可能數 (MPN) 陽性對照表

每稀釋倍數 3 管 (10mL、1mL、0.1mL)		每稀釋倍數 3 管 (10mL、1mL、0.1mL)		每稀釋倍數 5 管 (10mL、1mL、0.1mL)		每稀釋倍數 5 管 (10mL、1mL、0.1mL)	
測定結果	大腸桿菌群指標密度	測定結果	大腸桿菌群指標密度	測定結果	大腸桿菌群指標密度	測定結果	大腸桿菌群指標密度
1-0-0	3.6	3-0-0	28.6	1-0-0	2.0	3-2-0	13.8
1-0-1	7.2	3-1-0	45.7	1-0-1	4.0	3-2-1	16.6
1-1-0	7.3	3-1-1	58.4	1-1-0	4.0	4-0-0	13.6
1-1-1	11.0	3-2-0	76.0	1-1-1	6.0	4-1-0	17.6
1-2-0	11.3	3-2-1	95.0	1-2-0	6.1	4-1-1	21.2
2-0-0	9.5			2-0-0	4.5	4-2-1	25.7
2-0-1	14.3			2-0-1	6.8	5-0-0	28.6
2-1-1	19.8			2-1-1	9.2	5-1-1	38.0
2-3-0	27.0			2-3-0	11.8	5-2-1	44.8
				3-0-0	8.0	5-3-1	58.2
				3-1-0	10.8	5-4-1	78.0
				3-1-1	13.6	5-4-3	113.4

貳、濾膜法

一、原理：

用特製過濾介質（孔徑較微生物小的濾膜 0.45μ ），使樣品微生物於過濾過程中，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，檢驗水中革蘭氏染色陰性，好氧或兼性厭氧的不產芽胞桿菌之方法，屬於定量測定方法。

二、操作步驟

1. 標示樣品編號。
2. 裝置過濾設備並接上抽氣幫浦。
3. 以滅菌鑷子夾起無菌濾膜放在過濾裝置之有孔平板上，小心將漏斗固定。
4. 開啟抽氣開關，將水樣過濾。
5. 水樣過濾後，以 20 ~ 30mL 無菌稀釋液沖洗漏斗。
6. 沖洗後，解開真空裝置，將漏斗移開。
7. 儘速以鑷子夾起濾膜放置在培養基上，並避免產生氣泡。
8. 置於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 的溫箱中。
9. 24 ± 2 小時後，觀察結果。

三、判讀

1. 該群細菌在含有乳糖的 Endo-agar，於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 小時會產生紅色色系具金屬光澤菌落及陽性的 (ONPG) β -galactosidase 半乳糖甘酶和具陰性的細胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase) 反應。
2. 選擇具金屬光澤的粉紅至暗紅色菌落來計算大腸桿菌群菌落數。藍色

、白色、無色的菌落或缺乏金屬光澤的菌落均判定為非大腸桿菌群。

3. 若將 100mL 水樣分成多個樣品分別濾膜，於濾膜上所生長的菌落都合併計算。
4. 每張濾膜以能產生 50 個大腸桿菌群菌落，且總菌落數以不超過 200 個菌落為最適宜。
5. 若濾膜上之大腸桿菌與非大腸桿菌群之總菌落數超過 200 或濾膜上之菌落無法計算時，以「太多無法計算」來表示之，並重新採檢再驗。

四、計算公式

$$\text{大腸桿菌群密度 (cfu/100mL)} = \frac{\text{所有選取大腸桿菌群菌落數} \times 100}{\text{所過濾水樣體積 (mL)}}$$

五、實例介紹

- (一) 各別取樣品以 10mL、1mL 及 0.1 mL 分三次過濾，結果在三個濾膜上總生菌數分別為 130、25、3，大腸桿菌群菌落計數分別為 45、9 及 < 1 ，請問大腸桿菌群指標為何？

說明：由於加入樣品 10mL 濾膜上的總生菌數 (200cfu 以內) 及大腸桿菌群 (50cfu 以內) 的菌落數目符合計數的理想範圍，故選擇 10mL 水樣計算其密度，1mL 及 0.1mL 的結果就不考慮。依計算方式為 $(45 \text{ 菌落數} \times 100) / 10\text{mL} = 450\text{cfu}/100\text{mL}$ 。

- (二) 取樣品 100mL，分成 50mL、30mL、20mL 過濾時，在三個濾

膜上的大腸桿菌群菌落計數分別為 4、2、1，其大腸桿菌群指標為何？

說明：由於各濾膜之大腸桿菌皆小於 50cfu，故將三個濾膜上的大腸桿菌群菌落數加總，依計算方式為 $((4 + 2 + 1) \times 100) / (50 + 30 + 20)\text{mL} = 7\text{cfu}/100\text{mL}$ 。

(三)取樣品 500mL 過濾一個濾膜上，檢測結果濾膜上有大腸桿菌群菌落 10，其大腸桿菌群指標為何？

說明：將個濾膜上的大腸桿菌群菌落數除以樣品總體積，依計算方式為 $(10 \times 100) / 500\text{mL} = 2\text{cfu}/100\text{mL}$ 。

(四)取樣品 10mL 過濾一個濾膜上，檢測結果濾膜上有 40 個大腸桿菌群菌落，但其總生菌數為 286 個，其大腸桿菌群指標為何？

說明：依計算方式為 $(40 \text{ 菌落數} \times 100) / 10\text{mL} = 400\text{cfu}/100\text{mL}$ ，但因為總生菌數超過 200 個以上，此時大腸桿菌群報告應為 $> 400\text{cfu}/100\text{mL}$ 。若檢測飲用水或食品時，已超過參考標準值很多，可直接發報告而不必重新採檢再驗。若是檢測其它樣品時，須依其參考標準值再決定是否重新採檢再驗。

六、注意事項：

1. Endo-agar，保存 2 ~ 8 °C 不透光的容器或黑暗中，使用期限以不

超過兩週為限。

2. 為提高偵測率，檢驗飲用水或無菌輸液時可過濾 100mL 至 500mL 或更多水樣的體積。
3. 水樣過濾後再以無菌水沖過濾器，主要是將附著於管壁的細菌亦沖到濾膜上。
4. 當水樣體積少於 20mL 時，可加入 10mL 無菌稀釋液再過濾。
5. 每過濾 10 件水樣，須過濾一次 100mL 的無菌水當做對照組，來檢測是否遭受污染。
6. 濾膜過濾檢測方法的再現性比乳糖多管醱酵法高。濾膜法較多管醱酵法有效，因為提供特殊的培養基。
7. 適用於原水、飲用水、海水、及經處理的廢水等水樣，但不適合用於只經一級處理、高混濁度及含有其它干擾物質（如毒性物質）的水樣（如一次處理廢水）。
8. 另外對含高量非大腸桿菌群細菌的水樣亦不合適。
9. 抽氣幫浦，壓差最好在 138 ~ 207kPa 者。

參、大腸桿菌群乳糖醱酵簡易測定法

一、原理：

指應用一定體積之水樣或食品等，檢測利用乳糖大腸桿菌群存在與否。其所檢測之結果以陽性或陰性來表示，屬於定性測定方法。

二、操作方法：

(一)初步試驗

1. 標示樣品編號
2. 加 100mL 樣品到 50mL 含 3 倍

濃度培養肉湯 (如 PA broth 或 LST) 內

3. 培養 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ，24 ~ 48 小時

(二) 確認試驗

將產酸的試瓶以接種環次培養至含 BGLB 的試管中，培養 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ， 48 ± 1 小時，若仍呈陽性，則確定之。

三、判讀

陽性產酸時，肉湯由紫色變為黃色，輕搖瓶子時有氣泡產生即為產氣。

四、注意事項：

1. 此方法主要是乳糖多管醱酵法的簡化，優點是可同時間偵測較多量的樣品。
2. 與濾膜法比較，若水中的非大腸桿菌群細菌量很大時，以致濾膜法無法計數時，以此方法檢測會有較大的偵測率。
3. 若有陽性時而須要定量時，可再進一步執行多管醱酵法或濾膜法的檢測。
4. 建議用於常規檢驗，以偵測飲用水管線，或處理過程中的安全性。

五、肉湯的成份

PA broth 成份	重量 (g)	Lauryl tryptose broth 成份	重量 (g)
beef exact	3.0	tryptose	20.0
peptone	0.50	lactose	5.0
lactose	7.46	KHPO ₄	2.75
tryptose	9.83	K ₂ HPO ₄	2.75
KHPO ₄	1.35	NaCl	5.0
K ₂ HPO ₄	1.35	sodium lauryl sulfate	0.1
NaCl	2.46	蒸餾水	1000mL
sodium lauryl sulfate	0.05		
bromcresol purple(指示劑)	0.0085		
蒸餾水	1000mL		

肆、產色素物質測定法 (chromogenic substrate coliform test)

一、原理：

利用大腸桿菌群細菌具有水解產色物質的特性，含有酵素 (β -D-galactosidase) 會水解產色物質 (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; ONPG) 成為黃色 o-nitrophenol，其於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ，24 ~ 48 小時的顏色變化，以檢測大腸桿菌群細菌存否及平均密度，有定性及定量的方法。

二、操作方法

(一) 多管醱酵法

1. 樣品標示編號
2. 進行 ONPG 試管編號，每個樣品進行 5 ~ 10 試管
3. 以 10mL 吸管各吸取 10mL 樣品原液至 10mL ONPG 的試管中 (2 倍濃度)，混合均勻
4. 置於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 的溫箱中，24 ± 2 小時，觀察結果，若為陽性則進行確認試驗

(二) 定性法

1. 樣品標示編號
2. 於試瓶中先加入含有 ONPG 培養

肉湯培養基 (含量 100mL , 即是 0.1 倍 1000mL 培養基重量)

3. 加入 100mL 樣品混合均勻

4. 培養 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 小時

三、判讀

1. 顏色呈黃色代表陽性，若為無色代表陰性，若培養 24 小時的結果未明顯，須再培養 4 小時。

2. 若顏色變化未完全，可在判讀前先混合再判讀。

3. 對顏色變化不確認時，可與含標準濃度的 o-nitrophenol 的試管比對，顏色若較深或相等即代表陽性結果。

四、注意事項：

1. 此方法適於檢測飲用水或含大腸桿菌群較少的樣品。

2. 避免將含有 ONPG 的試管或培養基曝露於陽光下。

3. 此方法比乳糖醱酵法對大腸桿菌群的偵測較具選擇性，其特異性較佳。

4. 非大腸桿菌群的細菌，*Aeromonas* spp. 或 *P. aeruginosa* 會水解小量的 ONPG，由於所需作用時間較長，在 28 小時內檢測結果仍會呈陰性。但當菌落數超過 $10^4/\text{mL}$ 時就會在 28 小時呈陽性結果。

5. 不建議採用此方法證實乳糖醱酵法的推測試驗陽性菌，或濾膜法的陽性菌落，會因非大腸桿菌群 ONPG 陽性菌 (如 *P. aeruginosa*、*Aeromonas* spp. 等) 的干擾，而造成偽陽性。

6. 採用此檢測方法的初期，須與傳統

的乳糖醱酵法進行比對測試，以評估對不同來源樣品的效益。

結 語

傷寒桿菌、副傷寒桿菌、沙門氏桿菌、痢疾桿菌等引起腸道感染的法定傳染病細菌，其生長的條件、存活環境及生存期長短與大腸桿菌群相似，因此當水源或食品大腸桿菌群陽性時，被引起腸道性症狀之細菌污染的機會亦相對提高。在偵測社區群體腸道感染的調查中，為有效評估不同水處理步驟的效益，亦可檢查自來水送到各家庭，工作場所之輸水系統的大腸桿菌群指標，以了解是否微生物有再生長或因為水管內或管路末端流速較慢的管路系統是否有沈澱物堆積。

當偵測出有大腸桿菌群陽性時，並不須特別去鑑別那種微生物，因為只要出現大腸桿菌群陽性，即代表此水或物品可能已不安全且不符合衛生條件了。近來台灣已發生數起痢疾桿菌引起社區群體感染的事件，經調查大部份是因為飲水來源受到化糞池或下水道的污染；造成的原因可歸類為 1) 井水與化糞池的距離未達安全標準 (15 公尺以上)；2) 井水與化糞池的距離達安全標準，但水井附近的水溝有裂痕，有污水滲入地下水之虞；3) 儲水池可能受廁所旁邊的排水溝的污水污染；4) 水源餘氣量偏低 (低於 0.5ppm)；5) 自來水與地下兩種水源的蓄水池水泥塔出水管互通相接，僅以一閘閥開關控制。為了飲用水及食品的衛生安全，我們仍須定期進行，飲用水與食品的總生菌數及大腸桿菌群的檢測，以確保社會大眾的健康。

參考文獻

1. Mehlman IJ, Andrews WH, Wentz BA BA: Coliform bacteria In. Bacteriological analytical manual of the division of microbiology center for Food Safety and Applied Nutrition 6th ed. US Food and Drug Administration. 1984.
2. The bacteriology of water. In: Topley & Wilson's: Principles of bacteriology, virology and immunity 8th ed volume 1, London, Hodder & Stoughton, 1990. 244-64.
3. American public health association. Standard methods for the examination of water and wastewater: microbiological examination. 18th ed. 1993. 1-39
4. 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. 509-607
5. Edberg SC, Allen MJ, Smith DB et al: National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* form drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 1595-8
6. Edberg SC, Smith DB: Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria form a public water supply. Appl Environ Microbiol 1989; 55: 380-4
7. Edberg SC, Allen MJ, Smith DB et al: Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* form source water by the defined substrate technology. Appl Environ Microbiol 1989; 56: 366-70
8. Grabow. WOK, Preez MD: Comparison of m-Endo LES, MacConkey and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. Appl Environ Microbiol 1979; 38: 351-7
9. Jacobs NJ, Zeigler WL, Reed FC: Comparison of membrane filter, multiple fermentation tube and presence absence techniques for detecting total coliforms in small community water systems. Appl Environ Microbiol 1986; 51: 1007-11
10. Rice EW, Geldreich EE, Read EJ: The presence-absence coliform test for monitoring drinking water quality. Pub Health Rep 1989; 104: 54-9