

# 水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法

## — 酵素色質性 (Chromocult) 培養基/濾膜法

中華民國 92 年 9 月 4 日環署檢字第 0920064601 號公告

自中華民國 92 年 12 月 4 日起實施

NIEA E237.50B

### 一、 方法概要

本方法係以 0.45  $\mu\text{m}$  孔徑之濾膜過濾水樣，同時檢測水中大腸桿菌群及大腸桿菌。上述細菌在酵素色質性 (Chromocult) 培養基上，於  $35\pm 1^\circ\text{C}$  培養  $24\pm 2$  小時之後，非屬大腸桿菌之大腸桿菌群 (Coliform group) 會形成紅色菌落，大腸桿菌 (*E. coli*) 則會形成藍綠色至紫色菌落，因此由後者菌落數可計算大腸桿菌數目，而前、後者之菌落數總和即可計算大腸桿菌群之數目。

方法之原理是在培養基內添加蛋白胍、山梨醇 (Sorbitol)、焦葡萄糖酸鹽 (Pyruvate) 等營養物質使大腸桿菌群能快速生長，以硫酸十七基鈉 (Tergitol 7) 抑制革蘭氏陽性細菌、西蘇羅錠 (Cefsulodin) 抑制產氣單胞桿菌及假性單胞桿菌、以 Salmon-GAL 與具大腸桿菌群專一性的半乳糖甘酶 (Galactosidase) 反應產生紅色菌落及以 X-GAL 與具大腸桿菌專一性的尿甘酸化酶 (Glucuronidase) 反應產生深藍色至紫色菌落。

### 二、 適用範圍

本方法適用於飲用水水質、飲用水水源水質、海域水質、地下水、放流水及地面水體等水樣之大腸桿菌群及大腸桿菌檢測。但不適用於高濁度及含有干擾物質之水樣之檢測。

### 三、 干擾

- (一) 水樣中含有抑制或促進大腸桿菌群及大腸桿菌生長之物質或遭受上述菌類污染時會影響水樣之檢測結果。
- (二) 檢測使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進大腸桿菌群及大腸桿菌生長之物質時會影響水樣之檢測結果。
- (三) 懸浮微粒過高或含有膠體的水樣易造成濾膜孔隙阻塞，影響水樣檢測結果之判讀。

(四) 檢測使用之玻璃器皿及設備若遭受大腸桿菌群或大腸桿菌污染時會影響檢測之結果。

#### 四、設備及材料

- (一) 量筒：使用 100、500 及 1000 mL 之量筒。
- (二) 吸管：使用 1、5 及 10 mL 之滅菌玻璃吸管或無菌塑膠吸管，準確度應達 0.1 mL。
- (三) 稀釋瓶：使用 100、250、500 及 1000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品作為樣品之稀釋用。
- (四) 三角錐瓶：使用 250、500、1000 及 2000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品作為培養基及稀釋水之製作用。
- (五) 採樣容器：一般使用 100、250 及 500 mL 無菌之玻璃或塑膠製有蓋容器，使用市售無菌袋亦可。
- (六) 培養皿：硼矽玻璃或可拋棄式塑膠製培養皿。其大小以 60×15 mm、50×12 mm 或其他適當大小者。
- (七) 過濾裝置：能耐高溫高壓滅菌之玻璃、塑膠、陶瓷或不鏽鋼等材質構成之無縫隙漏斗，以鎖定裝置或重力固定於底部。
- (八) 抽氣幫浦：水壓式或吸氣式，壓力差最好在 138 至 207 kPa 者。
- (九) 濾膜：使用無菌且材質為纖維酯 ( Cellulose ester )，直徑 47 mm、孔徑 0.45  $\mu\text{m}$  且有格子記號的無菌濾膜，能使水中大腸桿菌 ( 群 ) 完全滯留者。
- (十) 吸收襯墊：不含亞硫酸根離子之圓形濾紙，直徑約為 48mm 並具有足夠的厚度能吸收 1.8~2.2 mL 培養液者。
- (十一) 鑷子：前端圓滑內側無波紋，使用前浸泡於 70% 酒精再以火燄燃燒滅菌。
- (十二) 水浴槽：溫度能維持在 50°C 左右者。
- (十三) 培養箱：溫度能維持在 35±1°C 者。

- (十四) 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能者。
- (十五) 紫外光滅菌燈：可作為設備材料滅菌之用者。
- (十六) 菌落計數器：用於菌落數之計算，以暗視野且有放大裝置者為佳。
- (十七) 天平：能精秤至 0.01 g 者。
- (十八) 高壓滅菌釜：用於稀釋瓶、過濾裝置等不能乾熱滅菌之材料及用具之滅菌。能以中心溫度 121°C（壓力約 15 lb/in<sup>2</sup> 或 1 kg/cm<sup>2</sup>）滅菌 15 分鐘以上者。
- (十九) 烘箱：用於玻璃器皿等用具之乾熱滅菌，溫度能維持在 160°C 達 2 小時或 170°C 達 1 小時以上者。

## 五、試劑

本方法所使用的化學藥品均為試藥級，培養基為微生物級製品。

### (一) 酵素色質性 (Chromocult) 培養基

蛋白朊 (Peptones)	3.0g
丙酮酸鈉 (Sodium pyruvate)	1.0g
色氨酸 (Tryptophan)	1.0g
山梨醇 (Sorbitol)	0.1g
硫酸十七基鈉 (Tergitol 7)	0.32g
氯化鈉	5.0g
磷酸氫二鈉	2.2g
磷酸二氫鈉	2.7g
瓊脂	10.0g
6-氯-3-吲哚酚-β-D-半乳糖吡喃糖苷 (6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside)	0.2 g

5-溴-4-氯-3-吲哚酚--β-D-尿苷酸環己基銨鹽  
(5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β--D-glucuronic acid  
cyclohexylammonium salt) 0.2 g

依上述配方秤取各成分，加入 1 L 的蒸餾水，煮沸溶解後（註：此培養基不可高溫高壓滅菌），置於 44 至 46°C 之水浴槽待溫度下降至恆溫後加入抗生素萬古黴素（Vancomycin）及西蘇羅錠（Cefsulodin）（配製方法：各取 5 mg 素萬古黴素與西蘇羅錠加入 4 mL 的去離子水），培養基最終 pH 為 6.95±0.2 培養基混搖均勻，分裝於直徑 50 mm 的培養皿中，每個培養皿加入約 4~6 mL 的培養基，凝固後避光保存於冰箱中備用，分裝後之培養基保存期限為 14 天。可依檢測需要量依比例適量配製。

## （二）無菌稀釋液

1、地面水、地下水、飲用水及水源水質檢測稀釋用。配製方法如下：

- (1) 磷酸二氫鉀儲備溶液：取 3.4 g 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 溶於 50 mL 的蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1.0 M 氫氧化鈉 (NaOH) 溶液調整其 pH 值為  $7.2 \pm 0.5$ ，然後加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中備用。
- (2) 氯化鎂儲備溶液：取 8.1g 氯化鎂 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 先溶於少量蒸餾水，俟完全溶解後，再加蒸餾水至全量為 100 mL，保存於冰箱中備用。
- (3) 分別取 10 mL 氯化鎂儲備溶液和 2.5 mL 磷酸二氫鉀儲備溶液，再加入蒸餾水至全量為 2000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，作為無菌稀釋液備用。保存期限為一個月。

2、海水或含鹽水樣品檢測稀釋用：

磷酸二氫鈉	0.58 g
磷酸氫二鈉	2.50 g
氯化鈉	8.50 g

依上述配方稱取各成分，溶解於 1 公升的蒸餾水中混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，儲存於冰箱中備用。滅菌後之 pH 值為 7.4±0.2。

## 六、採樣與保存

- (一) 採集水樣時，應使用清潔並經滅菌之玻璃或塑膠容器或市售無菌採樣袋。且於採樣時應避免受到污染。水樣若含有餘氯時，無菌容器中應加入適量之硫代硫酸鈉（120 mL 的水樣中加入 0.1 mL、10% 的硫代硫酸鈉可還原 15 mg/L 的餘氯）。
- (二) 水樣運送及保存時應維持在 0~5°C，並於採樣 8 小時內進行檢測。
- (三) 水樣體積以能做完所須檢測量為主，但不得少於 200 mL。

## 七、 步驟

- (一) 水樣在進行檢測或稀釋之前必須劇烈搖晃 25 次以上，以使樣品充分混搖均勻。
- (二) 水樣體積之選擇取決於預期的大腸桿菌（群）的密度。飲用水水樣以 100 mL 全量過濾。其他樣品則視水樣中大腸桿菌（群）可能濃度範圍進行水樣稀釋步驟。使用無菌吸管吸取 10 mL 之水樣至 90 mL 之無菌稀釋液中，形成 10 倍稀釋度之水樣，混搖均勻。而後自 10 倍稀釋度水樣以相同操作方式進行一系列之 100、1000 倍等稀釋度水樣，並混搖均勻。進行上述稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。各稀釋度水樣之稀釋步驟如圖一所示。
- (三) 以無菌鑷子夾起無菌濾膜，放在無菌過濾裝置之有孔平板上，小心將漏斗固定。將過濾裝置接上抽氣幫浦。加入適量無菌稀釋液，以測定過濾裝置是否配置妥當。
- (四) 檢測飲用水或水源水質時，可過濾 100 mL 或更多的水樣體積。其他水樣視大腸桿菌（群）可能濃度範圍，以無菌吸管吸取 10 mL 的原液及（或）各稀釋度水樣至無菌過濾器中過濾。過濾後，再以 20 至 30 mL 之無菌稀釋液沖洗漏斗二至三次。每個稀釋度水樣均需進行兩重複。
- (五) 沖洗過濾後，解開真空裝置，將漏斗移開，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於培養基上。濾膜應與培养基完全貼合，避免產生氣泡。培養皿倒置於 35±1°C 的恆溫培養箱中培養 24±2 小時。
- (六) 過濾不同稀釋度水樣時，應更換無菌過濾器（漏斗）。亦可將過濾器（漏斗）以火烤或紫外線滅菌 2 分鐘以上之後重複使用。
- (七) 計算並記錄各稀釋度培養皿中所產生的紅色、藍色及紫色菌落數。

若上述之菌落過多造成判讀困難，則以”大腸桿菌群菌落太多無法計數”(Total coliform too numerous to count ;TC TNTC) 表示。若藍色及紫色菌落過多造成判讀困難，則以”大腸桿菌菌落太多無法計數”(E. coli too numerous to count ;EC TNTC) 表示。

#### 八、 結果處理 (計算實例請參照表一)

(一) 選取菌落數介於 20 至 60 間之同一稀釋度的兩個培養皿，計算其菌落數，以菌落數 (CFU)/100mL 表示之。計算公式如下：

$$\text{大腸桿菌菌落數 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所選取培養皿之藍色及紫色菌落數總合}}{\text{所選取培養皿之實際水樣體積總合}} \times 100$$

$$\text{大腸桿菌群菌落數 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所選取培養皿之紅色、藍色及紫色之菌落數總合}}{\text{所選取培養皿之實際水樣體積總合}} \times 100$$

(二) 培養皿之菌落數不在 20 至 60 個菌落之間時，則依菌落數實際數目以下列方式處理：

- 1、若原液及各稀釋度水樣中僅有一個稀釋度的一個培養皿菌落數在 20 至 60 個之間，仍依上述公式計算之。
- 2、若僅原液有菌落產生，且少於 20 個，應依上述公式計數菌落數；若原液培養皿中均無菌落生長，則菌落數以小於 1 表示。
- 3、若各培養皿之菌落數均不在 20 至 60 個之間，則選取最接近 60 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿，依上述公式計算之。

(三) 數據表示：若計算所得之菌落數小於 1，以”<1”表示；菌落數小於 100 時，以整數表示 (小數位四捨五入)。菌落數大於 100 以上時，取兩位有效數字，並以科學記號表示，例如菌落數為 142 時以  $1.4 \times 10^2$  表示之，菌落數為 155 時以  $1.6 \times 10^2$  表示之，菌落數為 18900 時以  $1.9 \times 10^4$  表示之。

(四) 檢測報告必須註明採樣時間、接收水樣時間、樣品編號、開始和結束培養時間及各稀釋度的原始數據。

#### 九、 品質管制

- (一) 微生物採樣及檢測人員應具備微生物基本訓練及知識。
- (二) 進行微生物檢測時，所用的盛裝器具均應經滅菌處理。
- (三) 每次採樣時，應製備一組運送空白樣品。
- (四) 每批次或每十個水樣須進行一次試劑空白樣品分析。
- (五) 新購入之培養基均須以已知的大腸桿菌群、大腸桿菌及非大腸桿菌群之菌株作測試，以確保數據品質。
- (六) 應記錄所有稀釋度水樣的原始數據，以備查核之用。
- (七) 每個稀釋度水樣至少須進行二重複。
- (八) 滅菌釜、恆溫箱、水浴槽及冰箱等設備應定期校正以確保數據品質。
- (九) 不定期以胰蛋白大豆瓊脂培養基測試濾膜、稀釋水等是否為無菌。
- (十) 本方法培養所得之細菌可能具有感染性，檢測後之培養基及器皿應經高溫高壓滅菌始得以一般事業廢棄物處理。
- (十一) 使用紫外光燈作滅菌時，檢測人員應小心避免暴露於紫外線之照射。

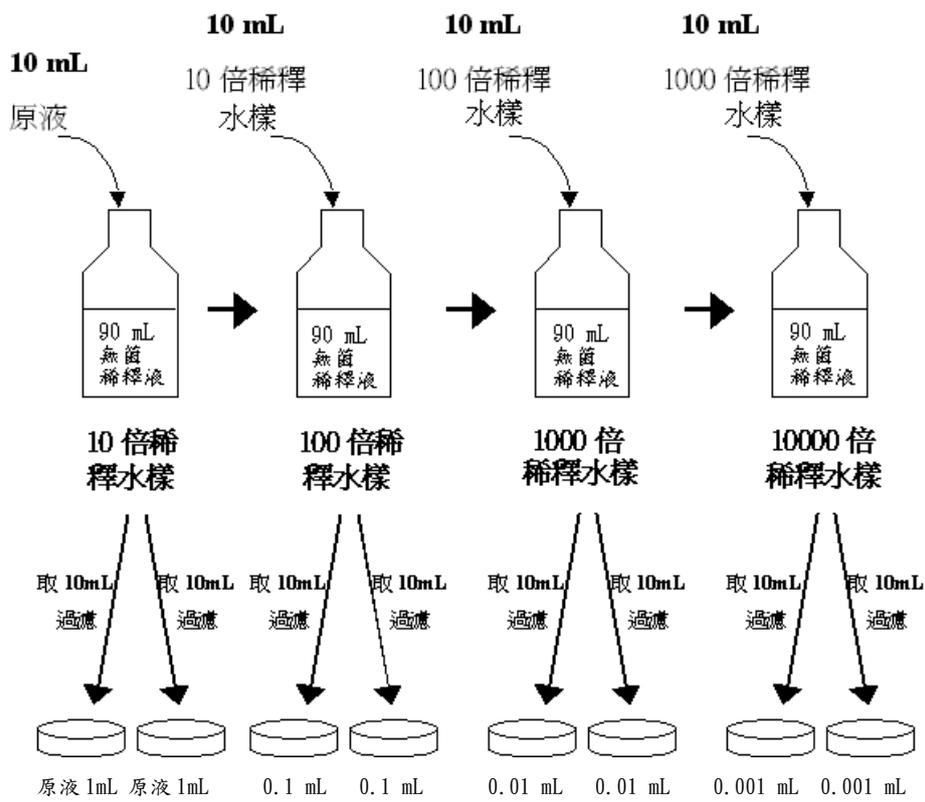
#### 十、精密度及準確性

以酵素色質性 (Chromocult) 培養基篩選大腸桿菌群及大腸桿菌，挑選培養基上產生藍色的菌落 102 株，以 VITECK 菌種鑑定系統進行驗證，結果大腸桿菌的鑑出率大於 87%，顯示偽陽性小於 13%。而挑選培養基上產生紫紅色及粉紅色的菌落 103 株，以 m-ENDO agar 進行驗證，屬於大腸桿菌群比率大於 85%，顯示偽陽性小於 15%，另挑選培養基上透明及黃色菌落，經 m-ENDO agar 進行驗證，非屬於大腸桿菌群之比率大於 80%，即偽陰性 < 20%。

#### 十一、參考資料

- (一) USEPA EPA-600-R-00-013 February 2000 Membrane Filter Method for the Simultaneous Detection of Total *Coliforms* and *Escherichia coli* in Drinking Water

- (二) Brenner, K. p. , Rankin, C. C. Roybal, Y. R. , Stelma JR. , G. N. , Scarpino, P. V. , and A. P. , Dufour. 1993. New medium for the simultaneous detection of total *coliform* and *E. coli* in water. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3534-3544.
- (三) Freier, T. A. , and P. A. , Hartman. 1987. Improved membrane filtration media for enumeration of total *coliform* and *E. coli* form sewage and surface waters. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1246-1250.



圖一 各稀釋度水樣之稀釋步驟

表一、大腸桿菌（群）計算實例說明

培養皿中之藍色菌落					結果表示 (CFU/100 mL)	參考
100 mL	10 mL	1 mL	0.1 mL	0.01 mL		
TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	<u>75 ; 70</u>	6 ; 7	1 ; 0	$7.3 \times 10^3$	八、(一)
TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	<u>21 ; 17</u>	3 ; 4	0 ; 0	$1.9 \times 10^3$	八、(二) 1
TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	<u>90 ; 85</u>	11 ; 9	$8.8 \times 10^4$	八、(二) 3
<u>12 ; 10</u>	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	11	八、(二) 2
<u>0 ; 0</u>	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	<1	八、(二) 2

註：TNTC 表示菌落數太多，無法計數

劃底線數字表示選用之數據