水中總菌落數檢測方法－混合稀釋法

中華民國 94 年 11 月 30 日環署檢字第 0940097070 號公告
自公告日起實施
NIEA E204.53B

一、方法概要

本方法係用以檢測能在胰化蛋白胨葡萄糖培養基（Tryptone glucose extract agar, TGE）或在培養皿計數培養基（Plate count agar,PCA）中生長並形成菌落之水中好氧及兼性厭氧異營菌。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水及地面水體、地下水體、廢水、污水之水質中總菌落數檢驗。

三、干擾

（一）水樣中含有抑制或促進細菌生長的物質。

（二）檢測使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進細菌生長物質。

（三）其他

四、設備

（一）量筒：一般使用 100、500 及 1000 mL 之量筒。

（二）吸管：一般使用 有 0.1mL 刻度之 1、5 及 10 mL 之滅菌玻璃吸管或市售無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管(Micropipet)。

（三）培養皿：90×15 或 100×15 mm 之滅菌玻璃培養皿或市售無菌塑膠培養皿，底面平滑無氣泡、刮傷或其他缺點者。

（四）稀釋瓶：一般使用 100 、250、500 及 1000 mL 可滅菌之硼矽玻璃製品。

（五）三角錐瓶：一般使用 500 及 1000 mL 之可滅菌硼矽玻璃製品。

（六）採樣容器：容量 120 mL 以上可滅菌之硼矽玻璃瓶或無菌塑膠製有蓋容器，或市售無菌袋。

（七）冰箱：溫度能保持在 0 至 5℃ 者。

（八）水浴槽：溫度能保持在約 50℃ 者。

（九）培養箱：溫度能保持在 35±1℃ 者。

（十）高壓滅菌釜：用於培養基和稀釋液等不能乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌。溫度能保持在 121℃（壓

力約 15 lb/in2 或 1 kg/cm2）、15 分鐘以上者。

（十一）乾熱滅菌器（烘箱）：用於玻璃器皿等用具之滅菌。溫度可維持在 160℃ 達 2 小時或 170℃ 達 1 小時以上者。

（十二）菌落計數器：適用於菌落之計算者。

（十三）天平：能精秤至 0.01 克者。

五、試劑

（一）培養基：可選取下列二者之一培養細菌。依下列配方配製培養基，或使用市售商品化的培養基均可。

1. 胰化蛋白胨葡萄糖培養基（Tryptone glucose extract agar,TGE）

葡萄糖（Glucose）	1.0 g
胰化蛋白胨（Tryptone）	5.0 g
牛肉抽出物（Beef extract）	3.0 g
瓊脂（Agar）	15.0 g
蒸餾水	1 L

經 121℃ 滅菌 15 分鐘。置於約 50℃ 的水浴槽中，避免凝結。可根據檢驗需求量，依配方比例配製培養基。

2.培養皿計數培養基（Plate count agar，PCA）

葡萄糖（Glucose）	1.0 g
胰化蛋白胨（Tryptone）	5.0 g
酵母抽出物（Yeast extract）	2.5 g
瓊脂（Agar）	15.0 g
蒸餾水	1 L

經 121℃ 滅菌 15 分鐘。置於約 50℃的水浴槽中，避免凝結。可根據檢驗需求量，依配方比例配製培養基。

（二）無菌稀釋液

1.磷酸二氫鉀溶液

取 3.4g 磷酸二氫鉀（KH_2PO_4）溶於 50 mL 之蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1.0 N 氫氧化鈉溶液調節其 pH 值為 7.2±0.5。然後加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中作為原液備用。

2.氯化鎂溶液

取 8.1 g 氯化鎂($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)，先溶於少量蒸餾水中，俟完全溶解後，再加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中作為原液備用。

分別取 10 mL 氯化鎂溶液和 2.5 mL 磷酸二氫鉀溶液

再加入蒸餾水至全量為 2,000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121℃ 滅菌 15 分鐘，作為無菌稀釋液備用。

六、採樣與保存

（一）盛裝水樣檢驗微生物之容器，應使用清潔並經滅菌之玻璃瓶或無菌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 水樣中加入 0.1 mL、10% 硫代硫酸鈉可還原 15 mg/L 餘氯）。

（二）飲用水採樣前應清潔手部，飲用水出水口以火烤或以 70% 酒精消毒。所採水樣應具有代表性，且在檢驗之前不再被污染。

（三）高溫飲用水應使用無菌玻璃瓶採樣，俟水樣冷卻至適當溫度後，始可置入 0~5℃ 之冰箱保存運送，以避免採樣瓶破裂。

（四）水樣應於採樣後 24 小時內完成檢驗，並置入培養箱中培養。

（五）水樣量須以能做完所需檢驗為度，但不得少於 100 mL。

七、步驟

（一）將已滅菌之培養基放入水浴槽內，溫度保持約在 50℃，以避免凝結。

（二）視水樣中微生物可能濃度範圍進行水樣稀釋步驟，使用無菌吸管吸取 10 毫升之水樣至 90 毫升之無菌稀釋液中形成 10 倍稀釋度之水樣，混合均勻，而後自 10 倍稀釋度水樣以相同操作方式進行一系列適當之 100、1,000、10,000 倍等稀釋水樣並混搖均勻，進行稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。稀釋方法如圖一所示。

（三）以 1 mL 無菌吸管吸取 1 mL 的原水及（或）各稀釋度水樣滴在培養皿內，每一稀釋濃度至少做二重複。

（四）將約 50℃ 培養基分別倒約 15 mL 至含原水及（或）稀釋度水樣的培養皿中，混搖均勻後靜置凝結。

（五）倒置培養皿於培養箱內，在 35±1℃ 培養 48±3 小時。

（六）計數各稀釋度培養皿中所產生的菌落數並記錄之，若菌落太多造成計數困難時，則以”菌落太多無法計數”（Too numerous to count；TNTC）表示。

步驟（二）~（四）須在無菌操作台內操作。

八、結果處理

（一）以含 30 至 300 個菌落之同一稀釋度的兩個培養皿計算其總菌落數，總菌落數以 菌落數 (CFU)/mL（Colony forming units/mL）表示之。計算公式如下：

$$\text{總菌落數（菌落數(CFU)/mL）} = \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取之實際體積總和}}$$

$$= \frac{X+Y}{(1.0/D) + (1.0/D)}$$

註：D：菌落數在 30 至 300 個之間的稀釋度

X、Y：D 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

（二）培養皿之菌落數不在 30 至 300 個菌落之間時，則依菌落數實際數目以下列方式處理：

1.若原水及各稀釋水樣中僅有一個稀釋度的一個培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則以上述八、(一)公式計算之。

2.若原水培養皿中均無菌落生長，則總菌落數以小於 1（＜1）表示；若僅原水有菌落產生且少於 30 個，亦應計數菌落數。

3.若各培養皿之菌落數均不在 30 至 300 個之間，則以最接近 300 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿以上述八、(一)公式計算。

4.若各稀釋度中有兩個稀釋度之培養皿的菌落數在 30 至 300 個之間，則以下列公式計算之

$$\text{總菌落數（菌落數(CFU)/mL）} = \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取之實際體積總和}}$$

$$= \frac{X_1+Y_1+X_2+Y_2}{(1.0/D_1)+(1.0/D_1)+(1.0/D_2)+(1.0/D_2)}$$

註：D_1、D_2：菌落數在 30 至 300 個之間的稀釋度

X_1、X_2：D_1稀釋度的兩個培養皿之菌落數

Y_1、Y_2：D_2稀釋度的兩個培養皿之菌落數

（三）若計算所得之總菌落數小於 1(含 0)，以”＜1”表示；總菌落數小於 100 時，以整數表示（小數位數四捨五入），總菌落數大於 100 以上時，只取兩位有效數字，並以科學記法表示，例如總菌落數為 142 時以 1.4 x 102 表示，總菌

落數 155 時以 1.6 x 102 表示，總菌落數為 18900 時以 1.9 x 104 表示。

（四）檢測紀錄須註明採樣時間、培養起始及終了時間、培養基名稱、培養溫度及各稀釋度的數據等相關資料。

九、品質管制

（一）微生物採樣人員及檢測人員應具備微生物基本訓練及知識。

（二）進行微生物檢驗時，所用的器具均應經滅菌處理。

（三）每批次採樣時，應進行野外及運送空白。

（四）每批次或每十個水樣需進行試劑空白實驗。

（五）應記錄所有稀釋度水樣的原始數據，以備查核之用。

（六）每個稀釋度水樣需至少進行二重複。

十、精密度及準確度

略

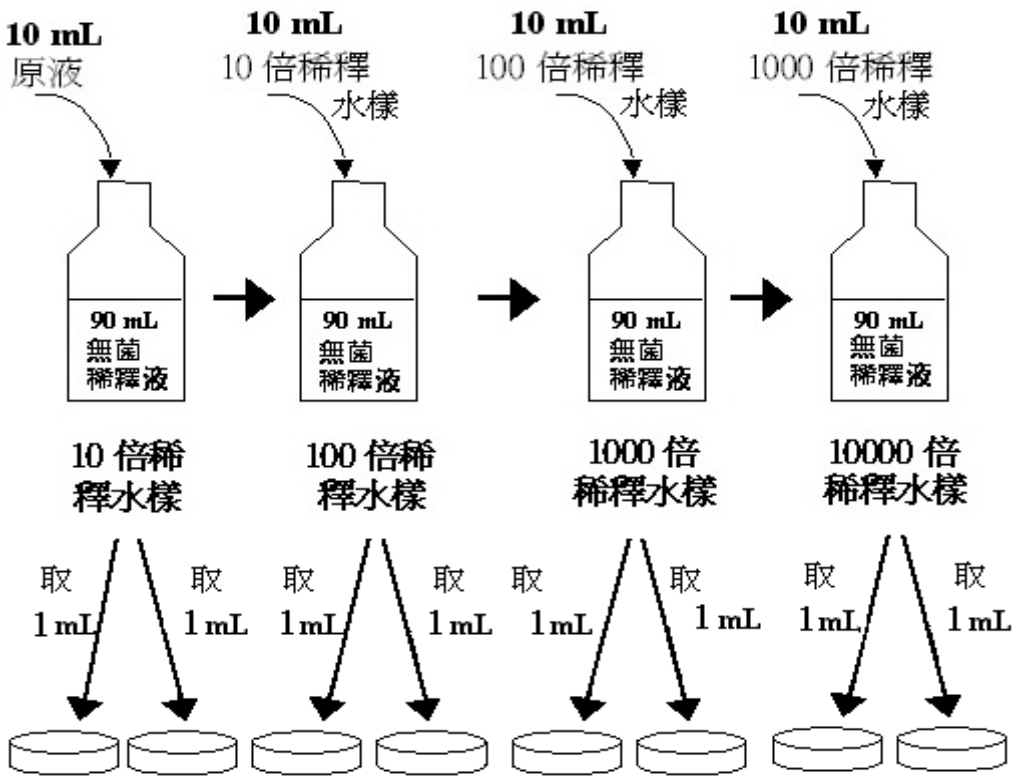
十一、參考資料

（一）U.S.A PHA-AWWA-WPCF.1998.Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th ed.American Public Health Assoc.,Washington,D.C.

（二） Van Soestbergan, A.A. & C.H.Lee.1969. Pour plates or streak plates.Appl.Microbiol.18:1092.

（三）Berry,J.M.,D.A.McNeill & L.D.Witter.1969.Effect of delays in pour plating on bacterial counts. J.Dairy. Sci. 52:1456.

（四）中華民國國家標準，1988，食品微生物之檢驗法-總菌落數之檢驗，CNS 10890 N6186。



圖一 水樣稀釋步驟

表一、總菌落數計算實例說明

培養皿中之菌落數				結果表示(菌落數(CFU/Ml))	參考
原水	稀釋 10 倍	稀釋 100 倍	稀釋 1000 倍		
TNTC；TNTC	156；162	17；19	1；0	$1.6x10^3$	八・(一)
TNTC；TNTC	59；53	6；4	0；0	$5.6x10^2$	八・(一)
310；298	29；25	3；4	0；0	$3.0x10^2$	八・（二）1
TNTC；TNTC	369；356	35；29	4；3	$3.2x10^3$	八・（二）1
25；24	1；2	0；0	0；0	25	八・（二）2
0；0	0；0	0；0	0；0	＜1	八・（二）2
TNTC；TNTC	321；311	27；29	3；4	$3.2x10^3$	八・（二）3
TNTC；TNTC	299；285	30；34	3；4	$2.9x10^3$	八・（二）4

註： TNTC 表示菌落太多，計數困難;畫底線數字表示用於計數