

水中總菌落數檢測方法－混合稀釋法

中華民國 102 年 4 月 16 日環署檢字第 1020030348 號公告
自中華民國 102 年 6 月 15 日生效

NIEA E204.55B

一、方法概要

本方法係用以檢測能在胰化蛋白朊葡萄糖抽出物培養基（Tryptone glucose extract agar; TGEA）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、放流水之總菌落數檢驗。

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。

四、設備及材料

- （一）量筒：100 至 1000 mL 之量筒。
- （二）吸管：有 0.1 mL 刻度之 1 及 10 mL 無菌玻璃吸管或無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管（Micropipet）。
- （三）培養皿：大小約 90 × 15 mm 之無菌玻璃培養皿或無菌塑膠培養皿。
- （四）稀釋瓶：100 至 1000 mL 能耐高溫高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- （五）錐形瓶：200 至 1000 mL 能耐高溫高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- （六）採樣容器：容量 120 mL 以上無菌之硼矽玻璃或塑膠有蓋容器，或市售無菌袋。
- （七）冰箱：溫度能保持在 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- （八）水浴槽：溫度能保持在 45 至 50°C ，且具有水循環裝置。
- （九）培養箱：溫度能保持在 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

- (十) 高壓滅菌釜：溫度能保持在 121°C（壓力約 15 lb/in² 或 1.05 kg/cm²）、15 分鐘以上。
- (十一) 高溫乾熱烘箱：如用於玻璃器皿等用具之滅菌，溫度須能保持在 170 ± 10°C 達 2 小時以上。
- (十二) 菌落計數器：用於菌落之計算。
- (十三) 天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精秤至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精秤至 0.001 g。
- (十四) 無菌操作檯：正壓式無菌操作檯或垂直循環負壓式無菌操作檯（Class II 生物安全櫃）。
- (十五) pH 計：精確度達 0.1 pH 單位。用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定時，應搭配表面電極（Surface probe）。

五、試劑

本方法所使用的化學藥品須為試藥級以上，培養基為微生物級製品。

- (一) 試劑水：導電度在 25°C 時小於 2 μmho/cm (μS/cm)。
- (二) 培養基：可選取下列二者之一。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. 胰化蛋白朊葡萄糖抽出物培養基 (Tryptone glucose extract agar; TGEA)

葡萄糖 (Glucose)	1.0 g
胰化蛋白朊 (Tryptone)	5.0 g
牛肉抽出物 (Beef extract)	3.0 g
瓊脂 (Agar)	12.0 g 至 15.0 g
試劑水	1 L

經 121°C 滅菌 15 分鐘。置於 45 至 50°C 的水浴槽中，存放不超過 3 小時。培養基滅菌後若凝固，可保存於 4 ± 2°C，保存期限為 14 天，只可再融化一次使用。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
胰化蛋白朊 (Tryptone)	5.0 g
酵母抽出物 (Yeast extract)	2.5 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g
試劑水	1 L

經 121°C 滅菌 15 分鐘。置於 45 至 50°C 的水浴槽中，不可存放超過 3 小時。培養基滅菌後若凝固，可保存於 4 ± 2°C，保存期限為 14 天，只可再融化一次使用。可根據檢驗需求量，依配方比例配製培養基。

(三) 無菌稀釋液

1. 磷酸二氫鉀儲備溶液

取 3.4 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 溶於 50 mL 之試劑水中，俟完全溶解後，以 1 N 之氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為 7.2 ± 0.1。然後加試劑水至全量為 100 mL，滅菌（過濾滅菌或 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上）後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2°C 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢測需求量，依比例配製。

2. 氯化鎂儲備溶液

取 8.1 g 六水氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 或 3.8 g 無水氯化鎂，先溶於少量試劑水中，俟完全溶解後，再加試劑水至全量為 100 mL，滅菌（過濾滅菌或 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上）後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2°C 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢測需求量，依比例配製。

3. 無菌稀釋液

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試劑水至全量為 2000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上，作為無菌稀釋液備用。如欲用於水樣稀釋，分裝之無菌稀釋液滅菌後體積須為 90 ± 2.0 mL。4 ± 2°C 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢測需求量，依比例配製。

六、採樣與保存

- (一) 盛裝水樣檢驗微生物時，應使用清潔並經滅菌之玻璃瓶、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，應使用內含硫代硫酸鈉錠劑之無菌採樣袋，或於無菌容器中加入適量之無菌硫代硫酸鈉以中和餘氯（採取加氯之廢水時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 10% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 15 mg/L。採取含氯之飲用水水樣時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 3% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 5 mg/L）。
- (二) 飲用水採樣前應清潔手部，出水口以火烤或以 70% 至 75% 酒精消毒。所採水樣須具有代表性。
- (三) 運送時水樣溫度應維持在小於 10°C 且不得凍結，實驗室內保存溫度應維持在 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (四) 水樣應於採樣後 24 小時內完成混合稀釋步驟（七、步驟（五）），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，溫度保持在 45 至 50°C，以避免凝結。
- (二) 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。
- (三) 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 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、1000、10000 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 1 所示（註 2）。
- (四) 以 1 mL 無菌吸管或微量吸管吸取 1 mL 的原液及（或）各稀釋度水樣滴在培養皿內。原液及（或）各稀釋度水樣均需進行二重複。
- (五) 將溫度介於 45 至 50°C 之培養基分裝至含原液及（或）各稀釋度水樣的培養皿中（厚度約 2 至 4 mm），混搖均勻後靜置凝結。
- (六) 倒置培養皿於培養箱內，在 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養 48 ± 3 小時（註 3）。

- (七) 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。但若各稀釋度培養皿之菌落數均超過 300 個，則不可記錄「菌落太多無法計數」，應選取最接近 300 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿進行菌落計數。
- (八) 步驟(三)至(五)須在無菌操作檯內操作。

八、結果處理

- (一) 若原液及各稀釋水樣中，僅有一個稀釋度的二重複培養皿之菌落數均在 30 至 300 個之間，則選取該稀釋度之兩個培養皿，以下列公式計算總菌落數，單位為 CFU/mL (Colony forming units/mL)：

$$\begin{aligned}\text{總菌落數(CFU/mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} \\ &= \frac{X + Y}{(1.0/D) + (1.0/D)}\end{aligned}$$

註：D：選取培養皿之稀釋度

X、Y：D 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

- (二) 若結果與八、(一)所述不符，則以下列方式計算總菌落數：
1. 若原液及各稀釋水樣中，僅有一個稀釋度的一個培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則選取該稀釋度之兩個培養皿，以上述八、(一)公式計算。
 2. 若原液培養皿中均無菌落生長，則總菌落數以「<1 CFU/mL」表示。若各培養皿之菌落數均小於 30 個，則選取菌落數最接近 30 個之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述八、(一)公式計算。
 3. 若各培養皿之菌落數均不在 30 至 300 個之間，則選取菌落數最接近 300 個之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述八、(一)公式計算。
 4. 若有兩個稀釋度的二重複培養皿之菌落數均在 30 至 300 個之間，或兩個稀釋度各有 1 個培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則選取兩個稀釋度共 4 個培養皿，以下列公式計算：

$$\begin{aligned} \text{總菌落數(CFU/mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} \\ &= \frac{X_1 + Y_1 + X_2 + Y_2}{(1.0/D_1) + (1.0/D_1) + (1.0/D_2) + (1.0/D_2)} \end{aligned}$$

註：D₁、D₂：選取培養皿之稀釋度

X₁、Y₁：D₁稀釋度的兩個培養皿之菌落數

X₂、Y₂：D₂稀釋度的兩個培養皿之菌落數

- (三) 數據表示：若計算所得之總菌落數小於 1(含 0)，以「<1 CFU/mL」表示；總菌落數小於 100 時，以整數表示（小數位數四捨五入），總菌落數為 100 以上時，只取兩位有效數字（四捨五入）。
- (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原始數據等相關資料。

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) 每批次採樣時，應進行運送空白。
- (三) 每 10 個樣品應執行 1 個方法空白樣品分析，若每批次樣品數少於 10 個，則每批次仍應執行 1 個方法空白樣品分析。
- (四) 用於結果計算之二重複數據，其對數差異值不可超出精密度管制參考範圍（計算方式參考「環境微生物檢測通則—細菌（NIEA E101）」），除非二重複之菌落數均小於 20。
- (五) 新購入之培養基，每批號均須進行培養基品質測試（測試方式詳見「環境微生物檢測通則—細菌（NIEA E101）」）。
- (六) 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處理。

十、精密度及準確度

略

十一、參考資料

American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed., Method 9215B, APHA, Washington, D. C., USA, 2012.

註 1：溶液如出現異物或混濁，則不可繼續使用。

註 2：水樣如須稀釋，建議於稀釋後 30 分鐘內完成檢測步驟，以免造成細菌死亡或增生，影響實驗結果。

註 3：培養箱底層應放置水盤，或將培養皿放置於密閉容器中培養，以避免培養前後培養基之水份散失超過 15%。

註 4：本文引用之公告方法名稱及編碼，以環保署最新公告者為準。

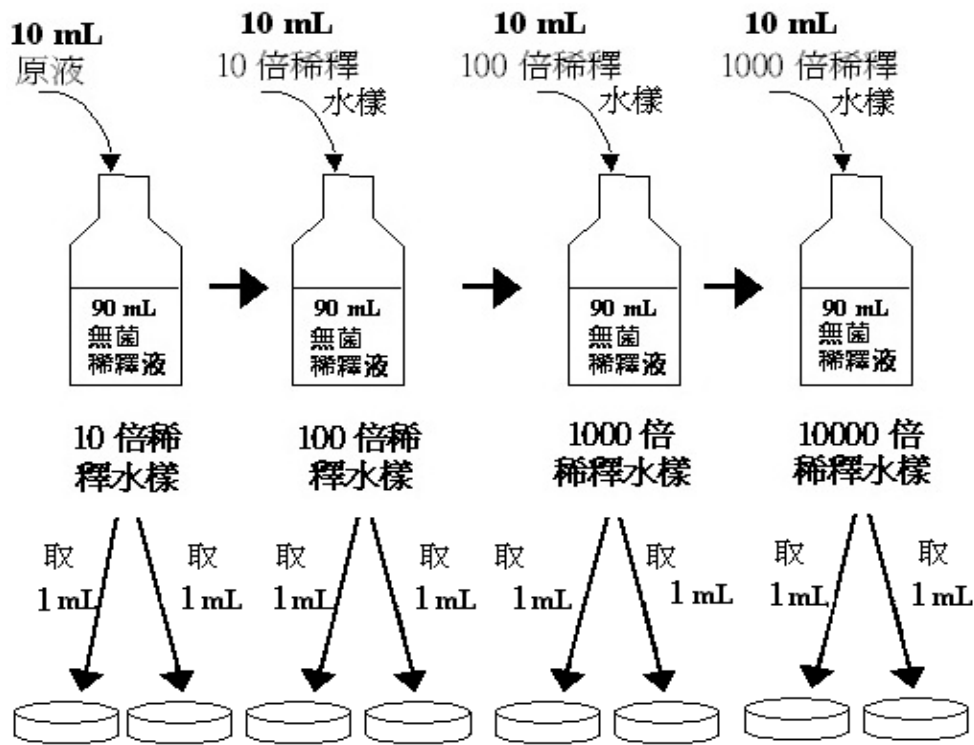


圖 1、水樣稀釋步驟

表 1、總菌落數計算實例說明

原液	培養皿中之菌落數			總菌落數 (CFU/mL)	參考
	稀釋 10 倍	稀釋 100 倍	稀釋 1000 倍		
TNTC ; TNTC	<u>156</u> ; <u>162</u>	17 ; 19	1 ; 0	1.6×10^3	八、(一)
TNTC ; TNTC	<u>59</u> ; <u>53</u>	6 ; 4	0 ; 0	5.6×10^2	八、(一)
<u>310</u> ; <u>298</u>	29 ; 25	3 ; 4	0 ; 0	3.0×10^2	八、(二) 1
TNTC ; TNTC	369 ; 356	<u>35</u> ; <u>29</u>	4 ; 3	3.2×10^3	八、(二) 1
<u>25</u> ; <u>24</u>	1 ; 2	0 ; 0	0 ; 0	25	八、(二) 2
<u>0</u> ; <u>0</u>	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	<1	八、(二) 2
TNTC ; TNTC	<u>321</u> ; <u>311</u>	27 ; 29	3 ; 4	3.2×10^3	八、(二) 3
TNTC ; TNTC	<u>299</u> ; <u>285</u>	<u>30</u> ; <u>34</u>	3 ; 4	2.9×10^3	八、(二) 4

註：TNTC 表示菌落太多，計數困難；畫雙底線數字表示用於結果計算