

水中糞便性大腸桿菌群檢測方法－濾膜法

中華民國 89 年 2 月 16 日 (89) 環署檢字第 08284 號公告

自中華民國 89 年 5 月 16 日起實施

NIEA E214.00C

一、方法概要

本方法係以濾膜過濾水樣，檢測水中糞便性大腸桿菌群 (Fecal coliform) 細菌。該群細菌在添加薔薇酸 (Rosolic acid) 的 M-FC 培養基上，於 $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培養 24 ± 2 小時會形成藍色菌落，由菌落數計算水中糞便性大腸桿菌群的數目。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水、湖泊、水庫、河川、溪流、井水、泉水、地下水、娛樂用水、海水及放流水等水樣之糞便性大腸桿菌群細菌之檢驗，但不適用於高濁度及含有干擾物質之水樣之檢驗。

三、干擾

- (一) 水樣中含有抑制或促進糞便性大腸桿菌群生長之物質。
- (二) 檢驗使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進糞便性大腸桿菌群生長之物質。
- (三) 濁度過高的水樣易造成濾膜孔隙阻塞，影響水樣檢驗結果之判讀。

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 1、5 及 10 mL 之滅菌玻璃吸管或無菌塑膠吸管，應有 0.1 mL 之刻度。
- (三) 稀釋瓶：一般使用 100、250、500 及 1000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (四) 三角錐瓶：一般使用 250、500、1000 及 2000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (五) 採樣容器：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。其大小為 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，能供減壓過濾者。
- (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：一般使用直徑 47 mm、孔徑 0.45 μm 且有格子記號的無菌濾膜，能使水中糞便性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 48 mm 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 44.5±0.5°C 者。
- (十三) 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能者。
- (十四) 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。
- (十五) 天平：能精稱至 0.01 g 者。
- (十六) 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/in² 或 1 kg/cm²）滅菌 15 分鐘以上者。
- (十七) 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) M-FC 培養基

每 1 公升之 M-FC 培養基含下列成份：

胰化蛋白朊	Tryptose or Biosate	10.0g
3號蛋白朊	Proteose peptone No.3	5.0g
酵母抽出物	Yeast extract	3.0g
氯化鈉	NaCl	5.0g
乳糖	Lactose	12.5g
3號膽鹽	Bile salts No.3	1.5g
苯胺藍	Aniline blue	0.1g
瓊脂	Agar	15.0g

或稱取 5.2 g 市售之 M-FC 培養基粉末溶於 100 mL 蒸餾水中，再加入 1 mL 以 0.2 M NaOH 配製的 1% 薔薇酸溶液 (Rosolic acid)，加熱至近沸騰 (註：本培養基不可高溫 高壓滅菌)。待冷卻至 45~50°C 後分裝於 5~7 mL 培養基於直徑 50 mm 的培養皿中。未用完之培養基可暗冷存於 4°C 之冰箱內，但以不超過一星期為限。亦可使用不含瓊脂配方的液體培養基和不含亞硫酸根離子的吸收襯墊，惟其保存期限為 96 小時。

(二) 無菌稀釋液

1、磷酸二氫鉀溶液

取 3.4 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 溶於 50 mL 的蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1.0 M NaOH 溶液調整其 pH 值為 7.2 ± 0.5 ，然後加蒸餾水定容至 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 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 先溶於少量蒸餾水，俟完全溶解後，再加蒸餾水定容至 100 mL，儲存於冰箱中備用。

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 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。

六、採樣與保存

- (一) 採取微生物檢測之水樣時，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。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) 水樣運送及保存之溫度應維持在 0~5°C。
- (三) 水樣應於採樣後 24 小時內完成檢測。
- (四) 採樣之水量以能做完所需檢測為度，但不得少於 200 mL。

七、步驟

- (一) 水樣量之選擇取決於預期的糞便性大腸桿菌群的密度。表一為各類水樣之建議過濾體積。
- (二) 視水樣中糞便性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 倍稀釋之水樣以相同操作方式進行一系列之 100、1000、10000 倍等稀釋水樣，並混搖均勻。進行上述稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。水樣稀釋步驟如附圖一所示。
- (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，以測定過濾設備是否裝置妥當。
- (四) 檢驗飲用水或水源水質時，可過濾 100 mL 或更多的水樣體積。其他水樣視糞便性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。每個稀釋度水樣均需進行二重複。
- (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。濾膜應與培養基完全貼合，避免產生氣泡。培養皿倒置於 44.5±0.5°C 的水浴槽培養 24±2 小時。過濾不同稀釋度水樣時，應更換無菌過濾器（漏斗），或將過濾器（漏斗）滅菌之後才可再使用。
- (六) 計算並記錄各稀釋度培養皿中所產生的藍色菌落。若藍色菌落或

雜菌過多造成判讀困難，則以”菌落太多無法計數”(Too numerous to count ; TNTC) 表示之。

八、結果處理 (計算實例請參照附表二)

(一) 選取菌落數介於 20 至 80 間之同一稀釋度的兩個培養皿，計算其菌落數，以菌落數 (CFU)/100 mL 表示之。計算公式如下：

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

(二) 培養皿之菌落數不在 20 至 80 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 80 個之間，則以上述公式計算之。
- 2、若僅原液有菌落產生，且少於 20 個，應循上述公式計算菌落數；若原液培養皿中均無菌落生長，則菌落數以小於 1 表示之。
- 3、若各培養皿之菌落數均不在 20 至 80 個之間，則選取最接近 80 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述公式計算。

(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 1.4×10^2 表示之，菌落數為 155 時以 1.6×10^2 表示之，菌落數為 18900 時以 1.9×10^4 表示之。

(四) 報告必須註明採樣時間、開始培養時間、培養基名稱及各稀釋度的原始數據。

(五) 培養所得之菌落可能具有感染性，應經高溫高壓滅菌之後才能丟棄。

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，應進行一組運送空白。
- (四) 每批次或每十個水樣須進行一次試劑空白。
- (五) 應記錄所有稀釋度之原始數據，以備查核之用。
- (六) 每個稀釋度水樣至少須進行二重複。
- (七) 培養溫度對檢驗結果有關鍵性的影響，須嚴格控制之，使溫度控制在 $44.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 之內。
- (八) 每批新配製的 M-FC 培養基均需進行空白試驗，如果發現有污染，該批檢驗結果不能採用。

十、精密度及準確度

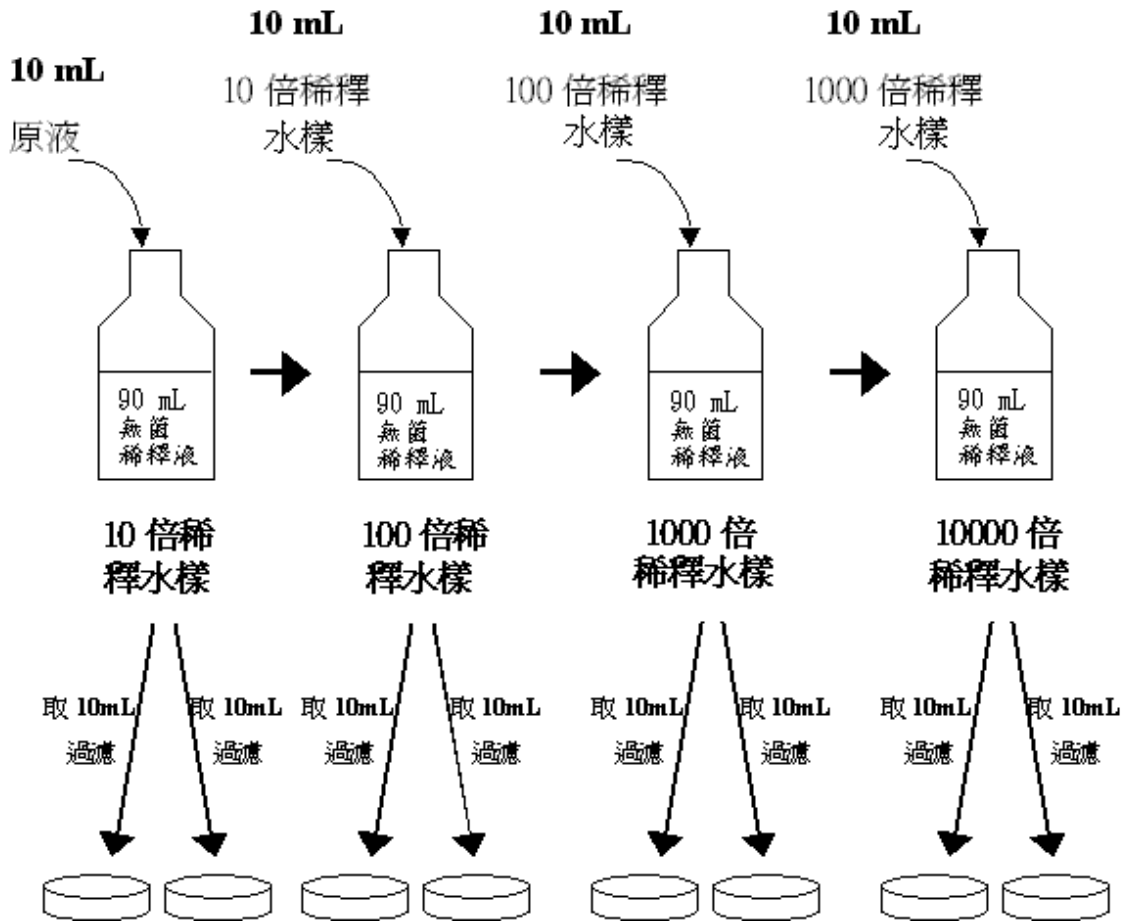
略

十一、參考文獻

- (一) American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. 9222 D Fecal Coliform Membrane Filter

Procedure APHA, Washington, D.C.

原液 1mL 原液 1mL 0.1 mL 0.1 mL 0.01mL 0.01mL 0.001mL 0.001 mL



圖一：水樣稀釋步驟

表一：糞便性大腸桿菌群濾膜法建議各類水樣之過濾體積

<u>水樣來源</u>	<u>建議之水樣體積 (mL)</u>					
	<u>原液 100</u>	<u>原液 50</u>	<u>原液 10</u>	<u>原液 1</u>	<u>0.1</u>	<u>0.01</u>
飲用水	×	×	×			
湖泊水庫	×	×	×			
井水泉水	×	×	×			
供水設備之入口		×	×	×		
海水及遊憩用水		×	×	×		
河水、農塘用水				×	×	×
暴雨逕流				×	×	×
經處理之放流水			×	×	×	
未經處理之放流水				×	×	×

表二、糞便性大腸桿菌群菌落數之計算實例說明

培養皿之原水樣體積					菌落數 (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	7.3×10^3	八、(一)
TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	<u>21 ; 17</u>	3 ; 4	0 ; 0	1.9×10^3	八、(二) 1
TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	<u>90 ; 85</u>	11 ; 9	8.8×10^4	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