

水中產氣單胞菌屬 (*Aeromonas spp.*) 細菌檢驗方法—濾膜法

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 E236.51B

一、方法概要

本方法是以 $0.45\ \mu\text{m}$ 孔徑之濾膜直接過濾水樣使水中的產氣單胞菌滯留在濾膜上，然後將濾膜置於含有 Vancomycin 的 Ampicillin-Dextrin Agar (ADA-V) 之選擇性培養基上，於 $35 \pm 1\ ^\circ\text{C}$ 的培養箱中培養 24 ± 2 小時，計算在濾膜表面上形成的菌落。凡在濾膜上形成典型亮黃色及非典型暗黃（淡黃）色的菌落均判定為產氣單胞菌。本培養基含有 Vancomycin 及 Ampicillin 兩種抗生素用來抑制非產氣單胞菌屬之細菌，大部分產氣單胞菌屬之細菌可以在本培養基中生長，並以糊精 (Dextrin) 作為細菌生長之碳源，同時以溴百里酚藍 (Bromothymol Blue) 作為其醱酵 Dextrin 產生酸之指示劑。黃色之菌落可以氧化酶測試 (Oxidase Test) 是否存在 Cytochrome c，以及其醱酵 Trehalose 的能力來作驗證，*Aeromonas* 屬之細菌為氧化酶測定陽性且具醱酵 Trehalose 的能力。

二、適用範圍

本方法適用於地面水體、地下水體、飲用水水質、飲用水水源水質及放流水等水樣之產氣單胞菌之檢測，但不適用於高濁度及含有干擾物質水樣之檢測。

三、干擾

- (一) 水樣若含有過多的膠體或懸浮微粒會阻塞濾膜孔隙，使水樣無法完全過濾，或是造成菌落擴散以致無法計數。
- (二) 水樣中含有抑制或促進產氣單胞菌屬細菌生長之物質，會影響水樣之檢測結果。
- (三) 檢驗使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進產氣單胞菌屬細菌生長之物質，會影響水樣之檢測結果。
- (四) 檢驗使用的玻璃器皿及設備若遭受產氣單胞菌屬細菌污染時會影響檢測之結果。

(五) 有些非產氣單胞菌屬之細菌但對 Ampicillin/Vancomycin 有抵抗性，而可在 ADA-V 培養基上生長，這些菌如果同時可以利用 Dextrin 產生酸也會形成黃色菌落，甚至菌本身就會產生黃色色素者，都會造成偽陽性的結果。另外腸球菌也會在 ADA 培養基上形成針頭大小的黃色菌落。

四、設備

- (一) 量筒：使用 100、500 及 1000 mL 之量筒，硼矽玻璃製，可高溫高壓滅菌者。
- (二) 吸管：使用 1、5 及 10 mL 之適合微生物實驗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 及 1000 mL 能耐高温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 能耐高温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：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 x 12 mm、50 x 12 mm 或其他適當大小者。
- (七) 過濾裝置：能耐高温高壓滅菌的玻璃、陶瓷、塑膠或不鏽鋼等材質構成之無縫隙漏斗，以鎖定裝置、磁力或重力固定於底部。
- (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 Cellulose Ester，直徑 47 mm、0.45 μm 孔徑且有格子記號的濾膜，能使水中產氣單胞菌完全滯留者。
- (十) 鑷子：前端平滑、內側無波紋，使用前浸泡於 70% 酒精，再以火焰燃燒滅菌。直式或是有彎曲角度者，以避免破壞濾膜。
- (十一) 水浴槽：溫度能維持在 50 $^{\circ}\text{C}$ 者，用於培養基配製時保持培養基的融溶。

- (十二) 培養箱：溫度能維持在 35 ± 1 °C 者。
- (十三) 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能者。
- (十四) 紫外光滅菌燈：可作為細菌滅菌之用者。
- (十五) 菌落計數器：用於菌落之計算，以暗視野且有放大裝置者為佳。
- (十六) 天平：能精秤至 0.01 g 者。
- (十七) 高壓滅菌釜：用於稀釋、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 1kg/cm²) 滅菌 15 分鐘以上者。
- (十八) 烘箱：用於玻璃器皿等之乾熱滅菌。溫度能保持在 160 °C 達 2 小時或 170 °C 達 1 小時以上者。
- (十九) 溫度計：經量測校正，能追溯至中華民國國家標準或 NIST 之標準者。
- (二十) 0.22 μ m 無菌針筒過濾器 (Sterile Syringe Filter)：用於抗生素 (Ampicillin 及 Vancomycin) 及 Trehalose 無菌過濾用。

五、試劑及材料

本方法中所使用的化學藥品均為試藥級，培養基為微生物級製品。

(一) 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 之蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1.0 N 氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為 7.2 ± 0.5 。然後加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中做為原液備用。

2、氯化鎂溶液：

取 8.1 g 氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，先溶於少量蒸餾水中，俟完全溶解後，再加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中做為原液備用。

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 °C 滅菌 15 分鐘，做為無菌稀釋液備用，未用完之無菌稀釋液可保存於冰箱中，保存時間以不超過一個月為限。

(二) 培養基：可選用市售培養基：

1、含 Vancomycin 之 Ampicillin-Dextrin Agar 培養基之配製：

(1) Dextrin Agar 培養基 (市售 m-Aeromonas Selective Agar, Havelaar, HIMEDIA, Indian)，組成成份 (每升)：

胰化蛋白胍 (Tryptose)	5.0 g
糊精 (Dextrin)	11.4 g
酵母抽出物 (Yeast extract)	2.0 g
氯化鈉 (NaCl)	3.0 g
氯化鉀 (KCl)	2.0 g
硫酸鎂 (MgSO ₄ 7H ₂ O)	0.1 g
氯化鐵 (FeCl ₃ 6H ₂ O)	0.06 g
溴百里酚藍 (Bromothymol Blue)	0.08 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g

(2) Ampicillin 無菌液：加 10 mg 的 Ampicillin 至 10 mL 的試劑水中，溶解後以 0.22 μm 之無菌濾膜過濾備用。本試劑需使用之前配製。

(3) Vancomycin 無菌液：加 2 mg 的 Vancomycin 至 10 mL 的試劑水中，溶解後以 0.22 μm 之無菌濾膜過濾備用。本試劑需使用之前配製。

將上述 Dextrin Agar 培養基成份加入於 1 公升的蒸餾水中，以 1 N NaOH 及 HCl 調節 pH 至 8.0，經 121 °C 高壓滅菌 15 分鐘，取出後置於 50 °C 的水浴槽中，再加入無菌的 Ampicillin 及 Vancomycin 溶液 (各 10 mL)。培養基加入上述成份混搖均勻後分裝於 50 mm 的培養皿中，每個培養皿約加入 4~6 mL 的培養基。凝固後保存於冰箱中備用。使用期限不得超過 14 天。

2、營養瓊脂培養基 (Nutrient Agar) 組成成份 (每升)：

蛋白胍 (Peptone)	5.0 g
牛肉抽出物 (Beef Extract)	3.0 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g

配製方法：

秤取上述各成份（重量依所欲製備培養基的體積而定）或用購得之混合粉末培養基（重量依各廠牌之說明而定），加入所需體積之蒸餾水或去離子水中，加熱使各成分完全溶解，放入高壓滅菌釜，經 121°C 滅菌 15 分鐘後，置於 50 °C 水浴槽，待冷卻至 50 °C，分裝 15-20 mL 培養基於 90×15 mm 或 100×15 mm 培養皿，室溫靜置凝固。

3、3% 硫代硫酸鈉：含 5 個水分子之試劑級硫代硫酸鈉，秤取 3 g 硫代硫酸鈉至 100 mL 試劑水中，當作儲備液。採樣瓶在滅菌之前加 1 mL/L 之 3% 硫代硫酸鈉，再行滅菌。若採樣瓶為先行滅菌者，3% 硫代硫酸鈉須以 0.22 μ m 之無菌濾膜過濾。

4、陽性控制組標準菌株：嗜水性產氣單胞菌（*Aeromonas hydrophila*，ATCC # 7966）。

5、陰性控制組菌株：自 ADA-V 培養基挑取非亮黃色或暗黃（淡黃）色之菌落，並經驗証屬實者作為負控制組，目的在於協助檢測人員辨識非產氣單胞菌屬之菌株形態。

6、乾式細胞色素 c 氧化酶測定試紙：作為產氣單胞菌驗証之用。

7、0.5% Trehalose 之配製：作為產氣單胞菌驗証之用。

(1) 5% Trehalose：秤取 5 g Trehalose 加入 100 mL 之試劑水中，以 0.22 μ m 之無菌濾膜過濾。

(2) Purple Broth Base：按照廠商所提供建議配方秤取 1 公升之藥量加於 900 mL 之試劑水中。經 121 °C 滅菌 15 分鐘，於室溫中冷卻備用。

(3) 在無菌操作檯內將(1)之 Trehalose 100 mL 加入 900 mL 之 Purple Broth Base 中。混合均勻後分裝於試管內，每支試管加入 6 mL。

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。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（參閱五、

(二) 3、)。

- (二) 採取之水樣必須要有代表性，尤其是飲用水之水樣，採樣點之水龍頭不得有曝氣裝置、濾網、塑膠軟管、冷熱水混合龍頭及淨水處理等，採樣之前必須先行排水至少兩分鐘或至水溫保持穩定時才能開始採樣。
- (三) 水樣運送及保存之溫度應維持在 0~5 °C，並於採樣 24 小時內進行檢測。
- (四) 水樣量以能做完所需檢測為度，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，以使樣品充分混合均勻。
- (二) 水樣量之選擇取決於預期的產氣單胞菌的密度。飲用水水樣以 100 mL 全量過濾。其他樣品則視水樣中產氣單胞菌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 倍等稀釋水樣，並混搖均勻。進行上述稀釋步驟時，均需更換無菌吸管且儘量迅速為原則，以避免細菌失去活性。水樣稀釋步驟如附圖一所示。
- (三) 以無菌鑷子、夾子夾起無菌濾膜，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。其他水樣視產氣單胞菌可能濃度範圍，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) 經 24 ± 2 小時的培養之後，計算並記錄各稀釋度培養皿中所產生的亮黃色或暗黃（淡黃）色菌落。若菌落過多造成判讀困難，則以“產氣單胞菌菌落太多無法計數”（Aeromonas Too Numerous To Count ; TNTC）表示。非亮黃色或暗黃（淡黃）色菌落均判定為非產氣單胞菌。

(八) 驗證：

- 1、將驗證之菌落挑至 Nutrient Agar 培養平板上，於 35 ± 1 °C 劃線培養 24 ± 2 小時，以進行確定試驗。
- 2、氧化酶測試：從 Nutrient Agar 培養平板上以牙籤挑取菌落至乾式細胞色素 c 氧化酶測定試紙上，在 10 秒之內如果為藍或紫色反應則表示為細胞色素 c 氧化酶陽性反應。
- 3、如果氧化酶為陽性反應，則繼續進行 Trehalose 醱酵測試，以移植環挑取待測菌落至 0.5 % Trehalose 試管內，於 35 ± 1 °C 培養 24 ± 2 小時，如果培養液由紫色轉為黃色，則表示為陽性反應。
- 4、產氣單胞菌確定試驗必須為氧化酶及 Trehalose 醱酵均為陽性反應之菌株。
- 5、商品化之鑑定套組亦可作為驗證之依據。

八、結果處理（計算實例請參照附表一）

(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：

$$\text{產氣單胞菌菌落數(CFU/100mL)} = \frac{\text{所選取培養皿之亮黃色或暗黃(淡黃)色菌落數}}{\text{所選取培養皿之實際水樣體積總合}} \times 100$$

(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，應循上述公式計數菌落

數;若原液培養皿中均無菌落生長，過濾體積為 10 mL，則菌落數以小於 10 表示；過濾體積為 100 mL，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 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”（過濾體積為 100 mL）或”<10”（過濾體積為 10 mL）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。
- (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。

九、品質管制

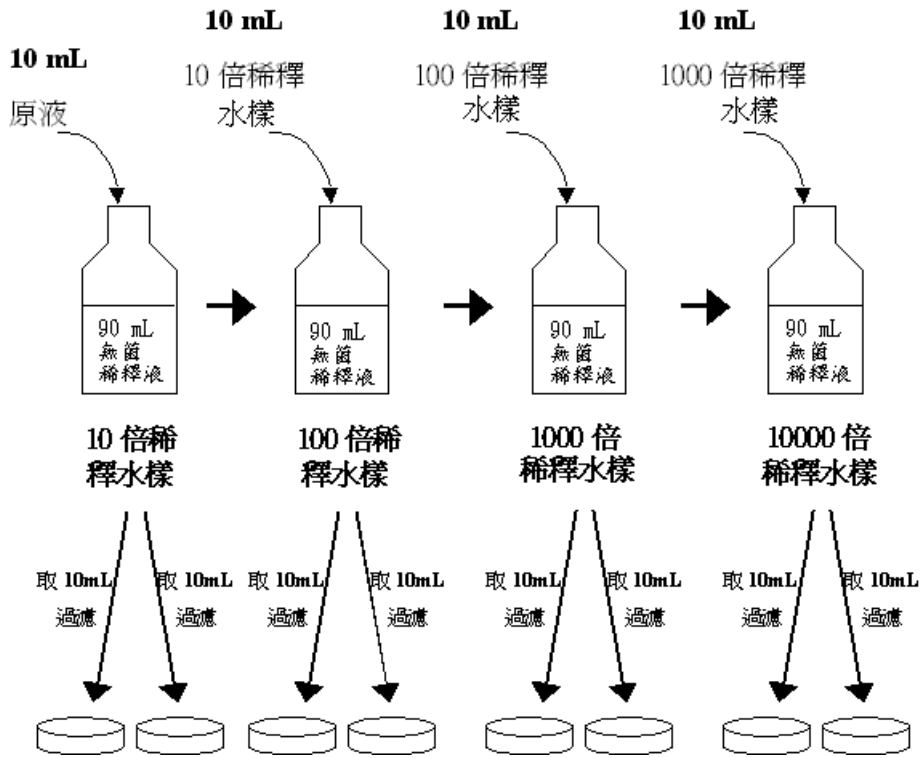
- (一) 微生物採樣及檢測人員應具備微生物基本訓練及知識。
- (二) 進行微生物檢測時，所用的盛裝器具均應經滅菌處理。
- (三) 每次採樣時，應進行一組運送空白及野外空白。
- (四) 每批次或每十個水樣須進行一次試劑空白。
- (五) 新購入之 ADA-V 培養基均須以已知的產氣單胞菌及非產氣單胞菌之菌株作測試，以確保數據品質。
- (六) 應記錄所有稀釋度水樣的原始數據，以備查核之用。
- (七) 每個稀釋度水樣至少須進行二重複。
- (八) 滅菌釜、恆溫箱、水浴槽及冰箱等設備應定期校正以確保數據品質。
- (九) 本方法培養所得之細菌可能具有感染性，檢測後之培養基及器皿應經高溫高壓滅菌始得以一般廢棄物處理。
- (十) 使用紫外光燈作滅菌時，操作人員應小心避免暴露於紫外線之照射。

十、精密度及準確度

以 ADA-V 培養基篩選產氣單胞菌，挑選培養基上產生亮黃色及暗黃色的菌落 200 株，以 BioLog 菌種鑑定系統進行鑑定，結果產氣單胞菌的鑑出率大於 92%，顯示偽陽性小於 8%。而挑選培養基上產生非亮黃色及暗黃色的菌落（綠色及藍色）210 株，以氧化酶測試及醱酵 Trehalose 能力進行驗證及菌種鑑定均無屬於產氣單胞菌者，即偽陰性 < 1%。

十一、參考文獻

- (一) 許永華等，產氣單胞桿菌屬 *Aeromonas* spp. 檢測方法驗證與環境水域分佈調查，中華民國自來水協會會刊（審查中）。
- (二) Havelaar, A.H., M.Durring, and J.F.M. Versteegh. 1987
Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *Journal of Applied Microbiology* 62:279-287
- (三) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1998. 20th Edition. Section 9260
- (四) Dermatra, A., M. Tonolla, A. Caminada, N. Ruggeri, and R. Peduzzi. 1999 Signature region within the 16S rRNA sequences of *Aeromonas popoffii* *FEMS Microbiol. Letts.* 172:239-246
- (五) Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water. 1997. 4th Edition. EPA-815-B97-001. Office of Ground Water and Drinking Water. U.S. EPA.
- (六) Moyer, N.P. 1996. Isolation and enumeration of *Aeromonas* In: *The Genus Aeromonas*. Eds. B. Austin etc John Wiley and Son publisher, Chichester, U. K.
- (七) Handfield, M., P. Simard, and R. Letarte. 1996 Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. *Applied Environmental Microbiology* 62:3544-3547
- (八) Janda, J.M. and S.L. Abbott. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentation, and unanswered question. *Journal of Clinical Infectious diseases.* 27:332-344。



圖一：水樣稀釋步驟

表一、產氣單胞菌計算實例說明

培養皿中之亮黃色或暗黃(淡黃)色菌落				結果表示 (菌落數 (CFU)/100 mL)	參考
原液 10 mL	稀釋 10 倍 (原液 1 mL)	稀釋 100 倍 (原液 0.1 mL)	稀釋 1000 倍 (原液 0.01 mL)		
TNTC ; TNTC	<u>75</u> ; <u>70</u>	6 ; 7	1 ; 0	7.3×10^3	八、(一)
TNTC ; TNTC	<u>21</u> ; <u>17</u>	3 ; 4	0 ; 0	1.9×10^3	八、(二) 1
TNTC ; TNTC	TNTC ; TNTC	<u>90</u> ; <u>85</u>	11 ; 9	8.8×10^4	八、(二) 3
<u>5</u> ; <u>3</u>	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	40	八、(二) 2
<u>0</u> ; <u>0</u>	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0	<10	八、(二) 2

註：TNTC 表示菌落太多，計數困難
畫底線數字表示用於計數