



水中 *Leptothrix* 屬鐵細菌檢測方法—多管發酵法

中華民國87年12月11日（87）環署檢字第82959號公告
自中華民國88年3月11日起實施
NIEA E209.51C



一、方法概要

本方法係以多管發酵方式檢驗水中好氧、革蘭氏染色陰性之鐵細菌（*Leptothrix* spp.），該屬細菌為絲狀，菌體外有菌鞘，生長於有機養分較低的環境中，其最適生長溫度為 25 至 30°C，在含有鐵、錳離子的環境中生長時，於菌鞘上會聚集黃褐色或黑褐色之氫氧化鐵或氧化錳沈澱。

二、適用範圍

本方法適用於檢驗流動緩慢，未受污染且含有鐵離子淡水中的絲狀鐵細菌，但不適用於含有干擾物質（如：毒性物質等）的水樣。

三、干擾

- （一）水樣中含有抑制或促進絲狀鐵細菌生長之物質，如餘氯或維生素等。
- （二）檢驗使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進絲狀鐵細菌生長之物質。

四、設備

本方法中使用的各種器皿均應經滅菌處理。

- （一）採樣容器：無菌的硼矽玻璃或塑膠容器，亦可使用無菌袋。
- （二）稀釋瓶：能耐高溫高壓滅菌之有蓋硼矽玻璃或塑膠製品，但不可以使用棉花塞當蓋子。一般有 100 mL 刻度者。
- （三）量筒：一般使用 10 mL、25 mL、50 mL 及 100 mL 之量筒。
- （四）吸管：一般使用 1 mL、5 mL 及 10 mL 之玻璃或無菌塑膠製品，應有 0.1 mL 之刻度。
- （五）三角錐瓶：硼矽玻璃製品，100 mL、250 mL、500 mL 或 1000 mL，可作為混合培養基的容器，且方便儲存者。
- （六）試管：大小約 150×15 mm 之試管或有蓋螺旋試管。
- （七）培養箱：溫度能保持在 30±1°C 者。
- （八）高壓滅菌釜：用於稀釋液、培養基及不能乾熱滅菌之材料、實驗用具的滅菌。能以 121°C（約 15 lb/in² 或 1 kg/cm²）滅菌 15 分鐘以上者。
- （九）乾熱滅菌器：用於玻璃器皿之滅菌。溫度能保持在 160°C、2 小時或 170°C、1 小時以上者。
- （十）顯微鏡：一般光學顯微鏡，具有 10、40、100 倍接物鏡者。
- （十一）pH計。

五、試劑

(一) 培養基

1、Leptothrix2xPYG培養基

每一升 Leptothrix 2x PYG 培養基含有下列成分：

蛋白筭 (Peptone)	0.5g
酵母抽出物 (Yeast extract)	0.5g
葡萄糖 (Glucose)	0.5g
硫酸鎂 (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.6g
氯化鈣 (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.07g
N- (2-Hydroxyethyl) piperazine-N	3.57g
- (2-ethane sulfonicacid]	
(HEPES)	17.0mg
硫酸錳 (Manganese sulfate mono-hydrate)	
蒸餾水	1.0L

將 PH 值調至 7.3，再經 121°C，15 分鐘滅菌

(二) 稀釋液

1、磷酸二氫鉀溶液

取 3.4 g 磷酸二氫鉀溶於 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，儲存於冰箱中作為原液備用。

2、氯化鎂溶液

取 8.1 g 氯化鎂 (MgCl₂·6H₂O)，先溶於少量蒸餾水中，俟完全溶解後，加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中作為原液備用。使用時分別取 1.25 mL 磷酸二氫鉀溶液及 5.0 mL 氯化鎂溶液混合，再加蒸餾水至全量為 1,000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121°C 滅菌 15 分鐘以上，作為稀釋液備用。

六、採樣與保存

(一) 採樣

- 1、採樣時，必須使用清潔並經滅菌之容器或無菌袋，及溫度能維持在 0 至 5°C 之樣品儲存設備。
- 2、水樣如果有餘氯時，在採樣時應加入適量硫代硫酸鈉溶液（如在 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）。
- 3、所採取之樣品應具有代表性，且在檢驗之前不再被污染。

(二) 保存

- 1、水樣運送及保存之溫度應維持在 0 至 5°C。
- 2、樣品自採樣後至進行檢驗，其保存時間不得超過 24 小時。

七、步驟

水樣取回後，先進行水樣稀釋步驟，分別使用滅菌過之吸管依序做成一系列適當之 10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍等稀釋水樣，並混搖均勻。進行每一稀釋步驟時，應取 10 毫升水樣（或稀釋水樣）至 90 毫升無菌稀釋水中，其稀釋方法如圖一所示。

- (一) 水樣取回後，先進行水樣稀釋步驟，分別使用滅菌過之吸管依序做成一系列適當之 10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍等稀釋水樣，並混搖均勻。進行每一稀釋步驟時，應取 10 毫升水樣（或稀釋水樣）至 90 毫升無菌稀釋水中，其稀釋方法如圖一所示。
- (二) 取 1mL 適當稀釋水之水樣接種於一連串含 9 mL Leptothrix 2x PYG 培養基的試管中，做三連續稀釋度各五重複（若水樣量太少則做三重複），測試最大可能數（Most Probable Number; MPN）。
- (三) 在 35±1°C 下靜置培養，觀察有無絲狀菌體形成，並取樣以顯微鏡觀察，若有帶鞘狀之絲狀細菌的存在，則為陽性。

八、結果處理

- (一) 如果檢測時的稀釋度超過連續三次，應採用其中最具有意義的三種稀釋度。以表一為例。
- (二) 由上述方法所得結果應以「最大可數（MPN）」計算及記錄，以三種連續稀釋度各做五重複的 MPN 可自表二中查出，表中附有 95% 可信賴極限。
- (三) 表二中所示之水樣量為 10 mL、1 mL 及 0.1 mL，若相當於換算以後之水樣量為 1.0 mL、0.1 mL 及 0.01 mL 時，應將由表中對應查出數字乘 10 倍；若用 0.1 mL、0.01 mL 及 0.001 mL 時，則應乘 100 倍，其餘依此類推。
- (四) 100mL 水中絲狀鐵細菌最大可能數（MPN）之計算公式如下：

$$\text{100mL 水中絲狀鐵細菌最大可能數} = \frac{\text{查表所得之 MPN 值}}{\text{最具意義之三種稀釋倍數之中間水樣體積 (MPN/100mL)}}$$

九、品質管制

如果樣品中懸浮顆粒過多而造成吸管堵塞時，必須先將樣品用攪拌器（Blender）攪拌。如經攪拌仍無法解決堵塞的問題時，則可改用廣口吸管（Large tip opening pipet）。

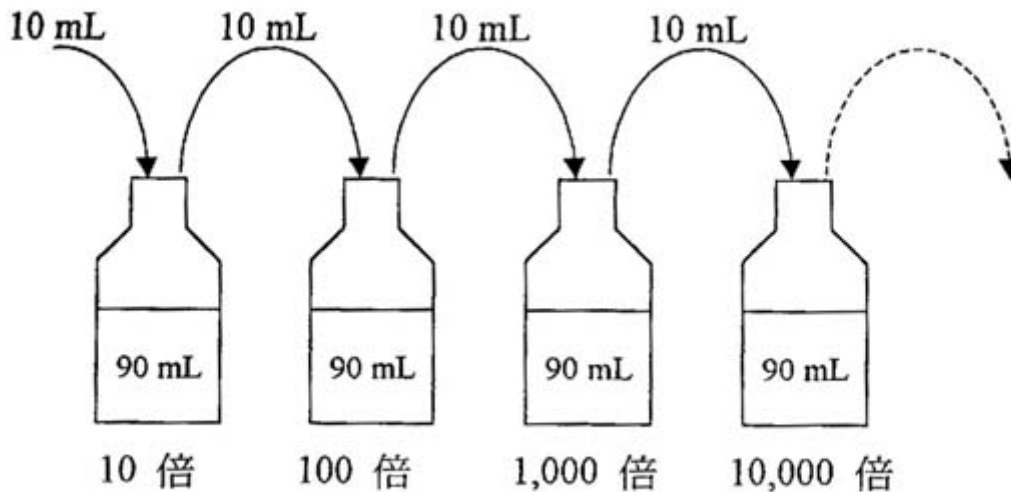
十、精密度及準確度

- (一) 多管發酵法之結果在統計上的可靠性比濾膜法低，但可用多次水樣檢驗以提高其準確度。例如每 1 mL 水中含有一個絲狀鐵細菌時，依據逢機分佈的理論：若以 1 mL 的水樣做檢驗，有 37% 的機率為陰性反應，但是以重複五支試管做檢驗，全部試管均為陰性反應的機率低於 1%。
- (二) 以五重複之試管，10 mL、1 mL、0.1 mL 之三連續稀釋度所得陽性反應試管數組合，其對應之 MPN 指數，其 95% 可信賴極限如表二中所列。

十一、參考資料

- (一) Alexander, M. 1982. Most probable number method for microbial populations, p.815~820. In: A.L. Page, A.L.R.H. Miller, and D.R. Keeney, (ed.), Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd (ed.) ASA-SSSA, Madison, MI, U.S.A.
- (二) Barnard, R.J. and McClure, F.D. 1984. MPN determination, p. III.1~III.19. In: Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. U.S. Food and Drug Administration. Washington, D. C., U.S.A.
- (三) Chen, M. 1990. simple medium that preserves low concentrations of Escherichia coli for use in the water bacteriology proficiency test. Appl. Environ. Microbiol. 56: 146~149.

- (四) Facklam,R.and H.W.Wilkinson. 1981.The family Streptococcaceae(medical aspects),p.1572~1597.In: M.P. Starr,H.Stolp,H.G.Truper,A.Balows,and H.G.Schlegel(ed.), the Prokaryotes:A Handbook on Habitat, Isolation,and Identification of Bacteria,Volume III.Springer Verlag, New York,U.S.A.
- (五) Facklam,R.R.and R.B.Carey. 1985. Streptococci and aerococci,p.154~175.In:E.H. Lente,A.Balows, W.H.Hausler, Jr.,and H.G.Shadomy(ed.),Manual of Clinical Microbiology,4th ed.American Society for Microbiology, Washington,D.C.,U.S.A.
- (六) Greenberg,A.E.,R.R.Trussell,L.S.Sclescer,and M.A.H. Fransoned.s.1989.Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,17th ed.p.9-75~9-113. American Public Health Association,Washington,D.C.,U.S.A.
- (七) Holt,J.G.,Sneath,P.H.A.,N.S.Mair,and M.E.Sharpe.(ed.) 1986.Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2.Williams & Wilkins,Balti-more,U.S.A.
- (八) Smibert,R.M.and N.R.Krieg.1981. General characteri-zation, p.409~443.In: P.Gerhardt,R.G.E. Murray, R.N. costilow,E.W.Nester,W.A.Wood,N.R.Krieg,and G.B. Phillips(ed.),Manaul of Methods for General Bacteriology.American Society for Microbiology, Washington, D.C.,U.S.A.



圖一 水樣稀釋步驟

表一 判讀說明

樣品	水樣體積(mL)					陽性組合
	0.0	0.01	0.001	0.0001	0.00001	
1	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0
2	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0

3	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0
4	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	
4-1	5/5	5/5	3/5	2/5		5-3-2
5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5

若結果如第 4 號的樣品，則其記錄應將 0.0001 mL 與 0.00001 mL 的結果相加，而成 5-3-2 的組合。(表中 4-1 的結果)。

表二 三連續稀釋度(10 mL, 1 mL, 0.1 mL)五試管重覆測試時，不同陽性及陰性結果組合之 MPN 指數及 95% 可信賴極限

陽性結果的組合	每100mL 之MPN	95%可信賴 極限		陽性結果的組合	每100mL 之MPN	95%可信賴極限	
		下限	上限			下限	上限
0-0-0	<2	-	-	4-2-0	22	9.0	56
0-0-1	2	1.0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1.0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1.0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1.0	11	5-0-0	23	9.0	86
1-0-1	4	1.0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2.0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1.0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2.0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2.0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3.0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5.0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3.0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4.0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6.0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7.0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5.0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7.0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7.0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9.0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4		600	5300
				5-5-5		-	-

						1600 ≧1600		
--	--	--	--	--	--	---------------	--	--