

水中大腸桿菌群檢測方法—多管發酵法

中華民國 96 年 11 月 29 日環署檢字第 0960091685 號公告

自中華民國 97 年 3 月 15 日起實施

NIEA E201.54B

一、方法概要

本方法係用以檢測水中革蘭氏染色陰性，不產生內生孢子之桿狀好氧或兼性厭氧菌，且能在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 48 ± 3 小時發酵乳糖並產生酸及氣體之大腸桿菌群 (Coliform group)；在不同體積或不同稀釋度之水樣所產生之結果，以「100 mL 水中最大可能數 (MPN/100 mL)」表示 100 mL 水中存在之大腸桿菌群數目。

二、適用範圍

本方法適用地面水體、地下水體、廢水、污水及水源水質水樣中大腸桿菌群之檢驗。

三、干擾

- (一) 水樣中含有抑制或促進大腸桿菌群細菌生長之物質。
- (二) 檢測使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進大腸桿菌群細菌生長的物質。

四、設備

- (一) 量筒：100 至 1000 mL 之量筒。
- (二) 吸管：有 0.1 刻度之 10 mL 滅菌玻璃吸管或市售無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管 (micropipet)。
- (三) 試管：大小約 150×15 mm 之試管或有蓋螺旋試管。
- (四) 發酵管 (fermentation tube)：大小約 22×9 mm 之玻璃管。
- (五) 稀釋瓶：容量約 100 mL 可滅菌之硼矽玻璃製品。
- (六) 錐形瓶：200 至 2000 mL 之可滅菌硼矽玻璃製品。
- (七) 採樣容器：容量 120 mL 以上無菌之硼矽玻璃瓶或無菌塑膠有蓋容器，或市售無菌袋。
- (八) 冰箱：溫度能保持在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 者。

- (九) 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) 培養箱：溫度能保持在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 者。
- (十一) 高壓滅菌釜：溫度能維持在 121°C (壓力約 15 lb/in^2 或 1.1 Kg/cm^2) 滅菌 15 分鐘以上者。
- (十二) 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 160°C 達 2 小時或 170°C 達 1 小時以上者。
- (十三) 接種環：為白金或鎳鉻合金製，適用於細菌接種或移植，亦可使用無菌塑膠製品。
- (十四) pH 計：精確度達 0.1 pH 單位。

五、試劑

- (一) 試劑水：蒸餾水或去離子水，導電度在 25°C 時小於 $2 \mu\text{mho/cm}$ ($\mu\text{S/cm}$)。
- (二) 培養基，應使用市售商品化培養基。

1. 硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養基 (Lauryl sulfate tryptose broth, 簡稱 LST)

1 倍濃度 LST 培養基含有下列成份：

胰化蛋白胨 (Tryptose)	20.0 g
乳糖 (Lactose)	5.0 g
氯化鈉 (NaCl)	5.0 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	2.75 g
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	2.75 g
硫酸月桂酸鈉 (Sodium lauryl sulfate)	0.1 g
<u>試劑水</u>	1 L

配成 2 倍濃度 (取 71.2 g LST 培養基粉末溶於 1 L 試劑水)，完全溶解後，分取 10 mL 注入裝有倒置發酵管之試管內，經 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻後備用，滅菌後培養基之 pH 值應在 6.8 ± 0.2 。滅菌後培養基若未當日使用，應保存在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ，保存期限為 14 天。可根據檢驗需求量，依配方配製培養基。

2. 煌綠乳糖膽汁培養基 (Brilliant green lactose bile broth, 簡稱 BGLB)

1 公升的 BGLB 培養基中含有下列成份：

蛋白胨 (Peptone)	10.0 g
乳糖 (Lactose)	10.0 g
牛膽粉 (Oxgall Powder)	20.0 g
煌綠色試劑 (Brilliant Green)	0.0133 g
<u>試劑水</u>	1L

取 40 g BGLB 培養基粉末溶於 1 L 試劑水，完全溶解後，分取 5 至 10 mL 注入裝有倒置發酵管之試管內，經 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻後備用，其 pH 值應在 7.2 ± 0.2。滅菌後培養基若未當日使用，應保存在 4 ± 2°C，保存期限為 14 天。可根據檢驗需求量，依配方配製培養基。

(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 的試劑水中，俟完全溶解後，以 1.0 N NaOH 溶液調節其 pH 值為 7.2 ± 0.1，然後加試劑水至 100 mL，滅菌 (過濾滅菌或 121 °C 高溫高壓滅菌 15 分鐘)後儲存於冰箱中備用。4 ± 2 °C 下保存期限為 3 個月。

2. 氯化鎂儲備溶液

取 8.1 g 氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，先溶於少量試劑水，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)後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2 °C 下保存期限為 3 個月。

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 2,000 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。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 3 個月。

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無菌硫代硫酸鈉（採取加氯之廢水時，每 100 mL 水樣中加入 0.1 mL、10% 硫代硫酸鈉可還原 15 mg/L 餘氯。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) 採樣前應清潔手部，再行採水樣，所採水樣應具有代表性。
- (三) 運送時水樣溫度應維持在小於 10 °C 且不得凍結，而實驗室內保存溫度應維持在 4 ± 2 °C。
- (四) 水樣應於採樣後 24 小時內完成推定實驗之水樣添加步驟（七、步驟（一）4.），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 120 mL。

七、步驟

試驗分兩階段進行。首先進行推定試驗，若推定試驗結果為陽性反應，則繼續進行第二階段之確定試驗，如結果仍是陽性反應則顯示有大腸桿菌群存在。各試驗步驟如下述：

（一）推定試驗

1. 慎選發酵管中沒有氣泡且未污染之 10 mL、2 倍濃度 LST 試管。
2. 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。
3. 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 水樣至 90 mL 無菌稀釋液中，形成 10 倍稀釋度水樣，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，進行稀釋步驟時，均需更換無菌稀釋吸管，水樣稀釋步驟如圖一所示（註 1）。
4. 以無菌吸管分別取各稀釋度 10 mL 水樣至內含 10 mL 2 倍濃度的 LST 試管中，每一稀釋度各作 5 支，小心混合均勻，混合後發酵管內不可產生氣泡。
5. 在 35 ± 1°C 培養箱中培養 48 ± 3 小時，觀察並記錄發酵情形，若有氣體產生則推定試驗為陽性反應，若無氣體產

生則推定試驗為陰性反應，但若培養液呈混濁狀態，雖無產氣，亦應進行確定試驗。

(二) 確定試驗

若推定試驗之發酵管中有氣體或混濁產生時，則使用 BGLB 進行確定試驗：

1. 慎選發酵管中沒有氣泡且未污染之 BGLB 試管。
2. 利用無菌接種環自產生氣體以及混濁之 LST 培養基試管中，接種一圈培養液至 BGLB 培養基試管中。
3. 在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養箱中培養 48 ± 3 小時。
4. 在 48 ± 3 小時內，BGLB 培養基試管如有氣體產生，則確定試驗為陽性反應。

八、結果處理

(一) 經確定試驗確認 BGLB 試管為陽性反應後，應以「100 mL 水中最大可能數 (MPN/100 mL)」計算及記錄。5 支發酵管連續三種稀釋度之 MPN 可查表一。

(二) 表一所示接種之水樣量為 10 mL、1.0 mL 及 0.1 mL，若所用之稀釋度有三種以上時，採用最具意義之三種稀釋度，查表後再計算 100 mL 水中大腸桿菌群最大可能數。稀釋度之選取方式如下：

1. 先選取 5 管均呈陽性反應的最高稀釋度（此時稀釋度較低之各組試管必須全部呈陽性反應），再選取下兩個稀釋度（如表二水樣別 a）。
2. 如果稀釋度最低的一組並非 5 管均呈陽性反應，則選取稀釋度最低的一組，再選取下兩個稀釋度（如表二水樣別 b、c）。
3. 如果依據上述原則（1.及 2.）選取 3 個稀釋度後，下一稀釋度試管組仍有陽性反應試管，則捨棄原先 3 組中稀釋度最低的一組，納入下一稀釋度的數據（如表二水樣別 d）。
4. 如果依據上述原則（1.至 3.）選取 3 個稀釋度後，更高稀釋度之試管組仍有陽性反應試管，則把更高稀釋度之陽性反應試管數加至原先 3 組中稀釋度最高的一組（如表二水樣別 e）。

- (三) 100 mL 水中大腸桿菌群最大可能數 (MPN/100 mL) 之計算公式如下：

$$\text{大腸桿菌群最大可能數(MPN/100 mL)} = \frac{\text{查表所得之MPN值} \times 10}{\text{最具意義三種稀釋度之最大水樣體積}}$$

結果小於 100 時，以整數表示（小數位數四捨五入），菌落數大於 100 以上時，只取兩位有效數字：例如 110 以 1.1×10^2 表示，16,000 以 1.6×10^4 表示。

- (二) 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) 每批次採樣時應進行運送空白。
- (三) 每批次或每 10 個水樣需進行試劑空白實驗。
- (四) 新購入之培養基，每批號均須以大腸桿菌群陽性控制菌株（如 *E. coli*、*Enterobacter aerogenes*、*Citrobacter freundii*）進行測試，以確保數據品質。
- (五) 若一季期間水樣均未檢出大腸桿菌群，則須以大腸桿菌群菌株進行培養基測試，以確保數據品質。
- (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。

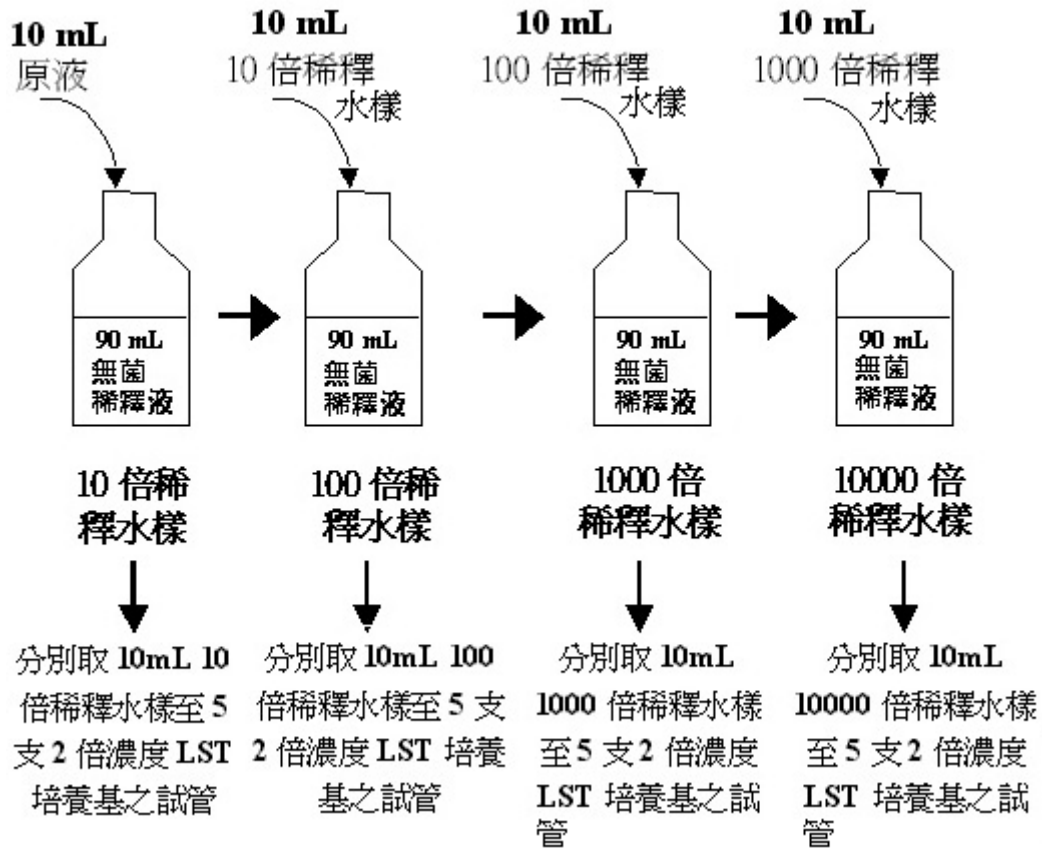
十、精密度及準確度

略

十一、參考資料

- (一) APHA. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, Section 9221. American Public Health Association, Washington, D.C.
- (二) Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media. 2003. BD Diagnostic Systems.

註 1：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。



圖一 水樣稀釋步驟

表一、三連續稀釋度（10 mL、1 mL、0.1 mL）五試管重覆測試時，
陽性結果組合之 MPN 指數及 95% 信賴區間

陽性反應 組合	MPN/100 mL	95%信賴區間		陽性反應 組合	MPN/100 mL	95%信賴區間	
		下限	上限			下限	上限
0-0-0	<1.8	—	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	10	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1100

3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	—
4-0-2	21	6.8	40				

表二、判讀說明

水樣別	水樣體積 (mL)					陽性反應組合	結果 (MPN/100 mL)
	10	1	0.1	0.01	0.001		
a	5/5	<u>5/5</u>	<u>2/5</u>	<u>0/5</u>	0/5	5-2-0	4.9×10^2
b	<u>4/5</u>	<u>5/5</u>	<u>1/5</u>	0/5	0/5	4-5-1	48
c	<u>0/5</u>	<u>1/5</u>	<u>0/5</u>	0/5	0/5	0-1-0	2
d	5/5	<u>4/5</u>	<u>4/5</u>	<u>1/5</u>	0/5	4-4-1	4.0×10^2
e	5/5	<u>4/5</u>	<u>4/5</u>	<u>0/5</u>	<u>1/5</u>	4-4-1	4.0×10^2