



水中鐵細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* 檢驗方法—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 E211.51C



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。*Thiobacillus ferrooxidans*，該細菌為桿狀，最適合的生長狀況為 30 至 35°C、pH=2.8。能在 *Thiobacillus* 培養基中生長，形成紅棕色氫氧化鐵〔Ferric hydroxide, Fe(OH)₃〕沈澱。

二、適用範圍

本方法適用於水中鐵細菌之檢驗，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：能耐高温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）水浴槽：能維持水溫溫差在±0.5°C 以內者。
- （十一）pH計。

五、試劑

(一) 培養基

每一升 Thiobacillus 培養基含有下列成分：

1、硫酸銨【(NH₄)₂SO₄】0.4 mL

磷酸氫二鉀 (KH₂PO₄) 0.2 g

硫酸鎂 (MgSO₄·7H₂O) 0.08 g

蒸餾水 (Distilled water) 400 mL

2、硫酸亞鐵 (FeSO₄·7H₂O) 10.0 g 1N 硫酸 1.0 mL 蒸餾水加至 100 mL

1項溶液先以 121°C 滅菌 15 分鐘，2項溶液以過濾滅菌方式加入 1 項溶液中，混合均勻，最終酸鹼值調為 2.8。

(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，然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

(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 1 mL 適當稀釋度水之水樣接種於一連串含 9 mL Thiobacillus 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 30±1°C 下培養 7 至 14 天，觀察若有紅棕色氫氧化鐵沈澱形成，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水中鐵細菌最大可能數 (MPN) 之計算公式如下：

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

(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)。

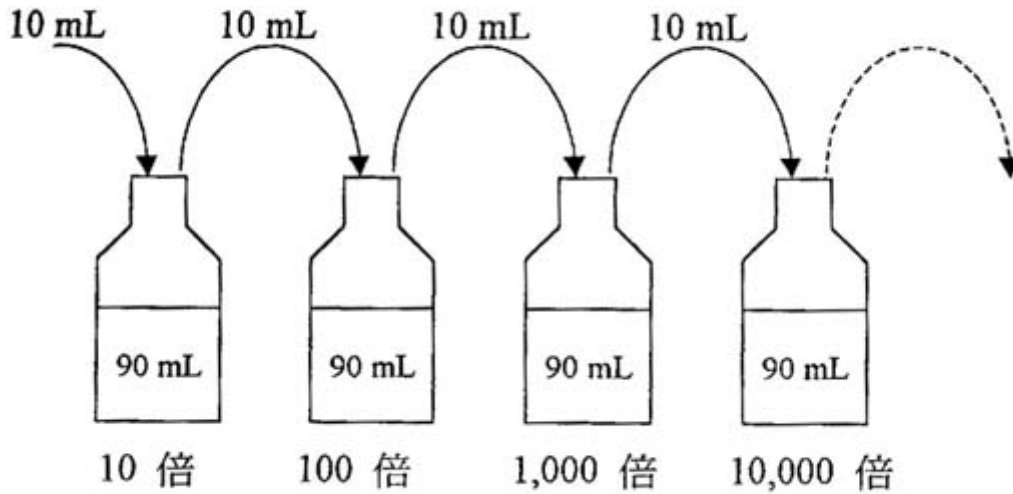
十、精密度及準確度

- (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: Page A.L., Miller, R.H. and Keeney D.R. (ed.), Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd (ed.) ASA SSSA, Madison, WI, 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) Greenberg, A.E., Trussell, R.R., Sclescer, L.S. and Franson M.A.H. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., U.S.A.
- (五) Holt, "Sneath J.G., "J.T., Bryant, M.P. and Pfenning, N. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
- (六) Kuenen, J.G. and Tuovinen, O.H. 1981. The Genera Thiobacillus and Thiomicrospira, p. 1024~1036. In: Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (ed.), The Prokaryotes: A Handbook on Habitat, Isolation, and Identification of Bacteria, Volume I. Springer Verlag, New York, U.S.A.

(七) Smibert,R.M.and Krieg,N.R.1981.General characteri-zation, p.409~443.In:Gerhard t,P.Murray, R.G.E. costilow ,R.N.Nester,E.W.Wood,W.A.Krieg,N.R.and Phillips ,G.B. (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 | 相當於換算後之水樣體積(mL) | | | | | 陽性組合 |
|-----|-----------------|------|-------|--------|---------|-------|
| | 0.1 | 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 100 mL之 MPN | 95% | | 陽性結果的組合 | 每 100 mL之 MPN | 95% | |
|---------|---------------|-------|----|---------|---------------|-------|------|
| | | 可信賴極限 | | | | 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 | 46 | 5-5-1 | 330 | 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 | 1600 | 600 | 5300 |
| | | | | 5-5-5 | ≥1600 | - | - |