



# 水中糞生大腸桿菌群 (Fecal coliform) 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 E213.02C



## 一、方法概要

本方法係用以檢驗水中革蘭氏陰性，不產生芽孢及桿狀之好氧或兼性厭氧菌，並且能在  $44.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  的高溫下，48 小時內使乳糖發酵並產生氣體之糞生大腸桿菌群 (Fecal coliform)；在不同體積或不同稀釋倍數之水樣所產生的結果，以「100 mL水中最大可能數 (Most Probable Number；MPN)」表示估算的 100 mL 容量中存在之糞生大腸桿菌群數。

## 二、適用範圍

本方法適用於原水、海水及廢水等水樣中糞生大腸桿菌群之檢驗。

## 三、干擾

- (一) 水樣中含有抑制或促進糞生大腸桿菌群生長之物質。
- (二) 所使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進糞生大腸桿菌群生長之物質。
- (三) 其他。

## 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、25、50 及 100 mL 之量筒。
- (四) 吸管：一般使用 1、5 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、250、500 或 1000 mL，可作為混合培養基的容器，且方便儲存者。
- (六) 培養皿：直徑 9 cm 之硼矽玻璃或可拋棄式塑膠製培養皿。底面平滑無氣泡、刮傷或其它缺點者。
- (七) 試管：大小約  $150\times 15$  mm 之試管或有蓋螺旋試管。
- (八) 發酵管：大小約  $22\times 9$  mm，使用時倒置於上述之試管中。
- (九) 培養箱：溫度能保持在  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  者。
- (十) 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  $121^{\circ}\text{C}$  (約  $15\text{ lb/in}^2$  或  $1\text{ kg/cm}^2$ ) 滅菌 15 分鐘以上者。

- (十一) 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。
- (十二) 水浴槽：能維持水溫在 44.5±0.5°C 者。
- (十三) 接種環：為白金或鎳鉻合金製，能適用於細菌接種或移植者。
- (十四) 市售微生物鑑定套組或微生物鑑定儀器。

## 五、試劑

### (一) 培養基

#### 1、硫酸月桂酸胰化蛋白培養基 (Lauryl Sulfate Tryptose broth, LST)

胰化蛋白總 (Tryptose)	20.0 g
乳糖 (Lactose)	5.0 g
氯化鈉	5.0 g
磷酸氫二鉀	2.75 g
磷酸二氫鉀	2.75 g
硫酸月桂酸鈉 (Sodium lauryl sulfate)	0.1 g
加蒸餾水至	1,000 mL

加熱溶解後，分取 10 mL 注入裝有發酵管之試管內經 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8±0.2。

#### 2、EC 培養基

胰化蛋白總 (Tryptose)	20.0 g
乳糖 (Lactose)	5.0 g
膽汁鹽混合物或 3 號膽鹽 (Bile salts mixture 或 bilesalts No.3)	1.5 g
磷酸氫二鉀	4.0 g
磷酸二氫鉀	1.5 g
氯化鈉	5.0 g
加蒸餾水至	1,000 mL

加熱溶解後，分取 10 mL 注入裝有發酵管之試管內，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9±0.2。

#### 3、LES Endo Agar 培養基

酵母抽出物 (Yeast extract)	1.2 g
胰化酪蛋白 (Casitone)	3.7 g
硫化蛋白 (Thiopeptone)	3.7 g
胰化蛋白 (Tryptose)	7.5 g
乳糖 (Lactose)	9.4 g
磷酸氫二鉀	3.3 g
磷酸二氫鉀	1.0 g
氯化鈉	3.7 g
去氧膽酸鈉 (Sodium desoxycholate)	0.1 g
硫酸月桂酸鈉 (Sodium lauryl sulfate)	0.05 g
亞硫酸鈉 (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	1.6 g
鹼性復紅 (Basic fuchsin)	0.8 g
瓊脂	15.0 g

上述成分溶於含 20mL 95% 酒精之 1,000 mL 蒸餾水，煮沸後冷卻 45 至 50°C，分裝於培養皿，每一培養皿倒入 15 至 20 mL，作成培養基平面。保存於不透光的容器或黑暗中，使用期限以不超過兩週為限。

## (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 NaOH 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

氯化鎂溶液取 8.1 g 氯化鎂 (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) 先溶於少量蒸餾水，俟完全溶解後再加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中作為原液備用。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 分鐘以上，作為稀釋液備用。

## 六、採樣與保存

### (一) 採樣

- 1、使用清潔並經滅菌之容器或無菌袋。
- 2、水樣若含有餘氯時，在採樣時應加入適量之硫代硫酸鈉，（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。
- 4、水樣之量須以能做完所需檢驗為度，但不得少於 100 mL。

### (二) 保存

- 1、水樣之運送及保存須在 0 至 5°C 的條件下進行。
- 2、水樣必須在 24 小時內進行檢驗。

## 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。

試驗分三部份：（一）推定試驗（Presumptive Test）（二）確定試驗（Confirmed Test）（三）完成試驗（Completed Test）

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部分之確定試驗，如結果仍是陽性反應則顯示有糞生大腸桿菌群存在。第三部分之完成試驗為建立品保品管之措施。一般取例行檢驗確定試驗為陽性反應之 10% 水樣進行完成試驗。各試驗步驟如下述：

### (一) 推定試驗

- 1、將 10 mL 水樣接種在一連串內含 LST 培養基之試管中，每一稀釋濃度各做 5 支（如水樣量太少才做 3 支）。
- 2、在 35±1°C 培養箱中培養 24±2 小時觀察並記錄發酵情形。
- 3、若無氣體產生，在 48±3 小時後再檢查一次。若仍無氣體產生則推定試驗為陰性反應，若有氣體產生則推定試驗陽性反應。

### (二) 確認試驗

若推定試驗有氣體產生時，使用 EC 培養基做確定試驗：

- 1、所有在 48±3 小時培養產生氣體之 LST 試管均須作確定試驗。

- 2、水樣若有三種或三種以上之連續稀釋倍數時，在  $48\pm 3$  小時末才產生氣體之各個試管均需作確定試驗。如果一個水樣接種之稀釋倍數少於或等於三種，則應全部作確定試驗。
- 3、以直徑 3 mm 之接種環自產生氣體之 LST 試管接種一圈液體至內含 EC 培養基之試管中。並於 30 分鐘內放置於  $44.5\pm 0.5^\circ\text{C}$  的水浴槽中。
- 4、在  $44.5\pm 0.5^\circ\text{C}$  水浴槽中培養  $24\pm 2$  小時。
- 5、在  $24\pm 2$  小時內，內含 EC 培養基試管如有氣體產生，則確定試驗為陽性反應（應先確定試管是否混濁及空白試驗是否有氣體產生）。

### (三) 完成試驗

若必須進行完成試驗則取確定試驗呈陽性反應之水樣繼續進行下列步驟：

- 1、以接種環自產生氣體之內含 EC 培養基之試管中沾取菌液，於含 LES Endo Agar 之培養皿平面上劃線，倒置於  $35\pm 1^\circ\text{C}$  培養箱內培養  $24\pm 2$  小時，形成之菌落相互距離至少在 0.5cm 以上。（劃線培養時避免劃破培養基表面。移植時，稍微傾斜試管，避免菌膜或泡沫附著接種環上）。
- 2、由上述 LES Endo Agar 培養皿內挑取典型的大腸桿菌群菌落（粉紅色或暗紅色且具金屬光澤者）一或一個以上，以傳統方法或已商品化的套組或鑑定儀器鑑定之。

## 八、結果處理

- (一) 經確定試驗 EC 培養基證實為糞生大腸桿菌群陽性之 LST 陽性反應，試管應以「最大可能數 (MPN)」計算及記錄。5 支發酵管連續三種稀釋度之 MPN 值可自表二中查出。表中均有 95% 可信賴範圍。表一所示接種之水樣量為 10 mL、1.0 mL 及 0.1 mL，若接種之水樣量為 1.0 mL、0.1 mL 及 0.01 mL 時應將附表數字乘以 10 倍；如用 0.1 mL、0.01 mL 及 0.001 mL 時應乘以 100 倍，餘類推。如果所用之稀釋倍數有三種以上時，採用最具意義之三種稀釋倍數。例如表一，若結果為第 4 號的樣品，則其記錄應為 0.01 mL 與 0.001 mL 的結果相加，而成 5-3-2 的組合（表一的結果）。
- (二) 用五支 10 mL、五支 1 mL 及五支 0.1 mL 水樣所得之 MPN 值及 95% 可信賴範圍。
- (三) 100mL 水中糞生大腸桿菌群最大可能數 (MPN) 之計算公式如下：

$$\frac{\text{查表所得之 MPN 值}}{\text{100mL 水中大腸桿菌群最大可能數}} = \frac{\text{最具意義之三種稀釋倍數之中間水樣稀釋體積}}{\text{(MPN/100mL)}}$$

結果以兩位有效數字表示：例如 110 以  $1.1 \times 10^2$  表示，16,000 以  $1.6 \times 10^4$  表示。

- (四) 記錄菌種是否為 *Escherichia coli*、*Citrobacter freundii*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、*Enterobacter cloacae* 等菌株。

## 九、品質管制

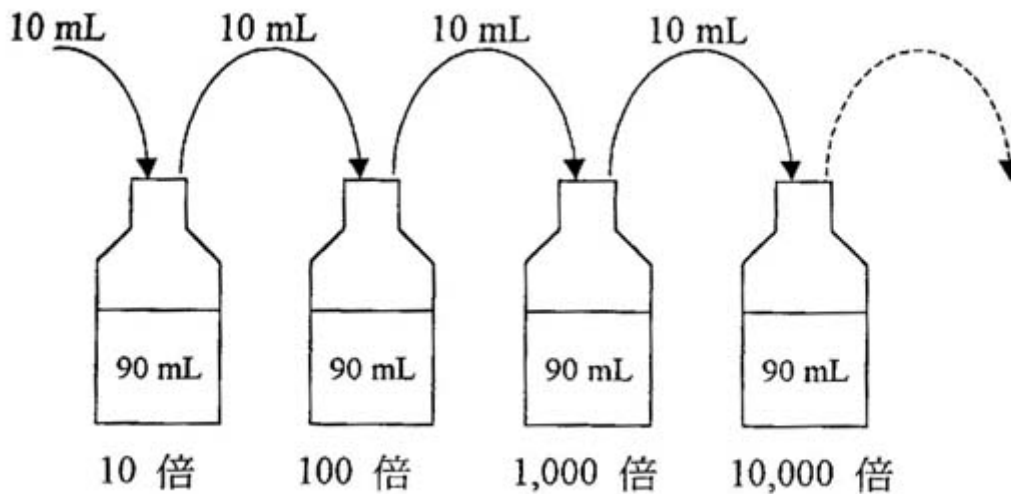
- (一) 在例行檢驗過程中必須取 10% 確定試驗結果為陽性之水樣進行完成試驗。
- (二) 公共給水水樣若推定試驗結果有明顯微生物繁殖但不產生氣體者，仍須進行確定試驗。

## 十、精密度及準確度

- (一) 除非同時以大批水樣檢驗，多管發酵法係屬低精密度之檢驗方法。例如每 1 mL 水樣中含有一個大腸桿菌群細菌時，依據逢機分佈的理論：如果以 1 mL 之水量做檢驗，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 5 重複之試管，10 mL、1 mL、0.1 mL 之水樣量所得之陽性反應試管數組合其對應之 MPN 值，95% 可信賴範圍如表二所示。

## 十一、參考資料

- (一) Perry, C.A & Hajna, A.A. 1944. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and Escherichia coli. J. Pub. Health. 34:735.
- (二) Geldreich, E.E., Clark, H.F., Kabler, P.W., Huff, C.B. & Bordner, R.H. 1958. The coliform group II. Reaction in EC medium at 45°C. Appl. Microbiol. 4:347.
- (三) Geldreich, E.E., Bordner, R.H., Huff, C.B., Clark, H.F. & Kabler, P.W. 1962. Type distribution of coliform bacteria in the feces of warm-blooded animals. J. Water Pollut. Control Fed. 34:295.
- (四) U.S. APHA-AWWA-WPCF. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. American Public Health Assoc., Washington, D.C. °



圖一 水樣稀釋步驟

表一 判讀說明

水樣別	相當於換算以後之水樣體積(mL)				陽性反應組合
	1	0.1	0.01	0.001	

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

表二 三連續稀釋度(10mL、1mL、0.1mL)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	$\geq 1600$	-	-