水中總菌落數檢測方法－混合稀釋法

中華民國102年4月16日環署檢字第1020030348號公告
自中華民國102年6月15日生效

NIEA E204.55B

一、方法概要

本方法係用以檢測能在胰化蛋白腺葡萄糖抽出物培養基（Tryptone glucose extract agar; TGEA）或在培養皿計數培養基（Plate count agar; PCA）中生長並形成菌落之水中好氧及兼性厭氧異營菌。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水及地面水體、地下水體、廢水、污水、放流水之總菌落數檢驗。

三、干擾

（一）水樣中含有抑制或促進細菌生長的物質。

（二）檢測使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進細菌生長物質。

四、設備及材料

（一）量筒：100 至 1000 mL 之量筒。

（二）吸管：有 0.1 mL 刻度之 1 及 10 mL 無菌玻璃吸管或無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管（Micropipet）。

（三）培養皿：大小約 90 × 15 mm 之無菌玻璃培養皿或無菌塑膠培養皿。

（四）稀釋瓶：100 至 1000 mL 能耐高溫高壓滅菌之硼矽玻璃製品。

（五）錐形瓶：200 至 1000 mL 能耐高溫高壓滅菌之硼矽玻璃製品。

（六）採樣容器：容量 120 mL 以上無菌之硼矽玻璃或塑膠有蓋容器，或市售無菌袋。

（七）冰箱：溫度能保持在 4 ± 2℃。

（八）水浴槽：溫度能保持在 45 至 50℃，且具有水循環裝置。

（九）培養箱：溫度能保持在 35 ± 1℃。

（十）高壓滅菌釜：溫度能保持在 121℃（壓力約 15 lb/in^2 或 1.05 kg/cm^2）、15 分鐘以上。

（十一）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170 ± 10℃ 達 2 小時以上。

（十二）菌落計數器：用於菌落之計算。

（十三）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。

（十四）無菌操作檯：正壓式無菌操作檯或垂直循環負壓式無菌操作檯（Class II 生物安全櫃）。

（十五）pH 計：精確度達 0.1 pH 單位。用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定時，應搭配表面電極（Surface probe）。

五、試劑

本方法所使用的化學藥品須為試藥級以上，培養基為微生物級製品。

（一）試劑水：導電度在 25℃ 時小於 2 μmho/cm（μS/cm）。

（二）培養基：可選取下列二者之一。依下列配方配製培養基，或使用市售商品化的培養基均可。

1. 胰化蛋白胨葡萄糖抽出物培養基（Tryptone glucose extract agar; TGEA）

葡萄糖（Glucose）	1.0 g
胰化蛋白胨（Tryptone）	5.0 g
牛肉抽出物（Beef extract）	3.0 g
瓊脂（Agar）	12.0 g 至 15.0 g
試劑水	1 L

經 121℃ 滅菌 15 分鐘。置於 45 至 50℃ 的水浴槽中，存放不超過 3 小時。培養基滅菌後若凝固，可保存於 4 ± 2℃，保存期限為 14 天，只可再融化一次使用。可根據檢驗需求量，依配方比例配製培養基。

2. 培養皿計數培養基（Plate count agar; PCA）

葡萄糖（Glucose）	1.0 g
胰化蛋白胨（Tryptone）	5.0 g
酵母抽出物（Yeast extract）	2.5 g
瓊脂（Agar）	15.0 g
試劑水	1 L

經 121℃ 滅菌 15 分鐘。置於 45 至 50℃ 的水浴槽中，不可存放超過 3 小時。培養基滅菌後若凝固，可保存於 4 ± 2℃，保存期限為 14 天，只可再融化一次使用。可根據檢驗需求量，

依配方比例配製培養基。

（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 之試劑水中，俟完全溶解後，以 1 N 之氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為 7.2 ± 0.1。然後加試劑水至全量為 100 mL，滅菌（過濾滅菌或 121℃ 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上）後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2℃ 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢測需求量，依比例配製。

2. 氯化鎂儲備溶液

取 8.1 g 六水氯化鎂（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$）或 3.8 g 無水氯化鎂，先溶於少量試劑水中，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℃ 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上）後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2℃ 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢測需求量，依比例配製。

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全量為 2000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121℃ 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上，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℃ 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢測需求量，依比例配製。

六、採樣與保存

（一）盛裝水樣檢驗微生物時，應使用清潔並經滅菌之玻璃瓶、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，應使用內含硫代硫酸鈉錠劑之無菌採樣袋，或於無菌容器中加入適量之無菌硫代硫酸鈉以中和餘氯（採取加氯之廢水時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 10% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 15 mg/L。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）飲用水採樣前應清潔手部，出水口以火烤或以 70% 至 75% 酒精消毒。所採水樣須具有代表性。

（三）運送時水樣溫度應維持在小於 10℃ 且不得凍結，實驗室內保存溫度應維持在 4 ± 2℃。

（四）水樣應於採樣後 24 小時內完成混合稀釋步驟（七、步驟（五）），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 100 mL。

七、步驟

（一）將已滅菌之培養基放入水浴槽內，溫度保持在 45 至 50℃，以避免凝結。

（二）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。

（三）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 之水樣至 90 mL 之無菌稀釋液中形成 10 倍稀釋度之水樣，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 倍等稀釋水樣並混搖均勻。進行稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。稀釋方法如圖 1 所示（註2）。

（四）以 1 mL 無菌吸管或微量吸管吸取 1 mL 的原液及（或）各稀釋度水樣滴在培養皿內。原液及（或）各稀釋度水樣均需進行二重複。

（五）將溫度介於 45 至 50℃ 之培養基分裝至含原液及（或）各稀釋度水樣的培養皿中（厚度約 2 至 4 mm），混搖均勻後靜置凝結。

（六）倒置培養皿於培養箱內，在 35 ± 1℃ 培養 48 ± 3 小時（註 3）。

（七）計數各稀釋度培養皿中所產生的菌落數並記錄之，若菌落太多造成計數困難時，則以「菌落太多無法計數」（Too numerous to count; TNTC）表示。但若各稀釋度培養皿之菌落數均超過 300 個，則不可記錄「菌落太多無法計數」，應選取最接近 300 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿進行菌落計數。

（八）步驟（三）至（五）須在無菌操作檯內操作。

八、結果處理

（一）若原液及各稀釋水樣中，僅有一個稀釋度的二重複培養皿之菌落數均在 30 至 300 個之間，則選取該稀釋度之兩個培養皿，以下列公式計算總菌落數，單位為 CFU/mL（Colony forming units/mL）：

$$\text{總菌落數}(\text{CFU}/\text{mL}) = \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} = \frac{X + Y}{(1.0/D) + (1.0/D)}$$

註：D：選取培養皿之稀釋度

X、Y：D稀釋度的兩個培養皿之菌落數

（二）若結果與八、（一）所述不符，則以下列方式計算總菌落數：

1. 若原液及各稀釋水樣中，僅有一個稀釋度的一個培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則選取該稀釋度之兩個培養皿，以上述八、（一）公式計算。

2.若原液培養皿中均無菌落生長，則總菌落數以「＜1 CFU/mL」表示。若各培養皿之菌落數均小於 30 個，則選取菌落數最接近 30 個之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述八、（一）公式計算。

3. 若各培養皿之菌落數均不在 30 至 300 個之間，則選取菌落數最接近 300 個之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述八、（一）公式計算。

4. 若有兩個稀釋度的二重複培養皿之菌落數均在 30 至 300 個之間，或兩個稀釋度各有 1 個培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則選取兩個稀釋度共 4 個培養皿，以下列公式計算：

$$\text{總菌落數(CFU/mL)} = \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} = \frac{X_1 + Y_1 + X_2 + Y_2}{(1.0/D_1) + (1.0/D_1) + (1.0/D_2) + (1.0/D_2)}$$

註：D_1、D_2：選取培養皿之稀釋度

X_1、Y_1：D_1稀釋度的兩個培養皿之菌落數

X_2、Y_2：D_2稀釋度的兩個培養皿之菌落數

（三）數據表示：若計算所得之總菌落數小於 1（含 0），以「＜1 CFU/mL」表示；總菌落數小於100時，以整數表示（小數位數四捨五入），總菌落數為 100 以上時，只取兩位有效數字（四捨五入）。

（四）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原始數據等相關資料。

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10個樣品應執行1個方法空白樣品分析，若每批次樣品數少於10個，則每批次仍應執行1個方法空白樣品分析。

（四）用於結果計算之二重複數據，其對數差異值不可超出精密度管制參考範圍（計算方式參考「環境微生物檢測通則—細菌（NIEA E101）」），除非二重複之菌落數均小於 20。

（五）新購入之培養基，每批號均須進行培養基品質測試（測試方式詳見「環境微生物檢測通則—細菌（NIEA E101）」）。

（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

American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed., Method 9215B, APHA, Washington, D. C., USA, 2012.

註1：溶液如出現異物或混濁，則不可繼續使用。

註2：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。

註3：培養箱底層應放置水盤，或將培養皿放置於密閉容器中培養，以避免培養前後培養基之水份散失超過 15%。

註4：本文引用之公告方法名稱及編碼，以環保署最新公告者為準。

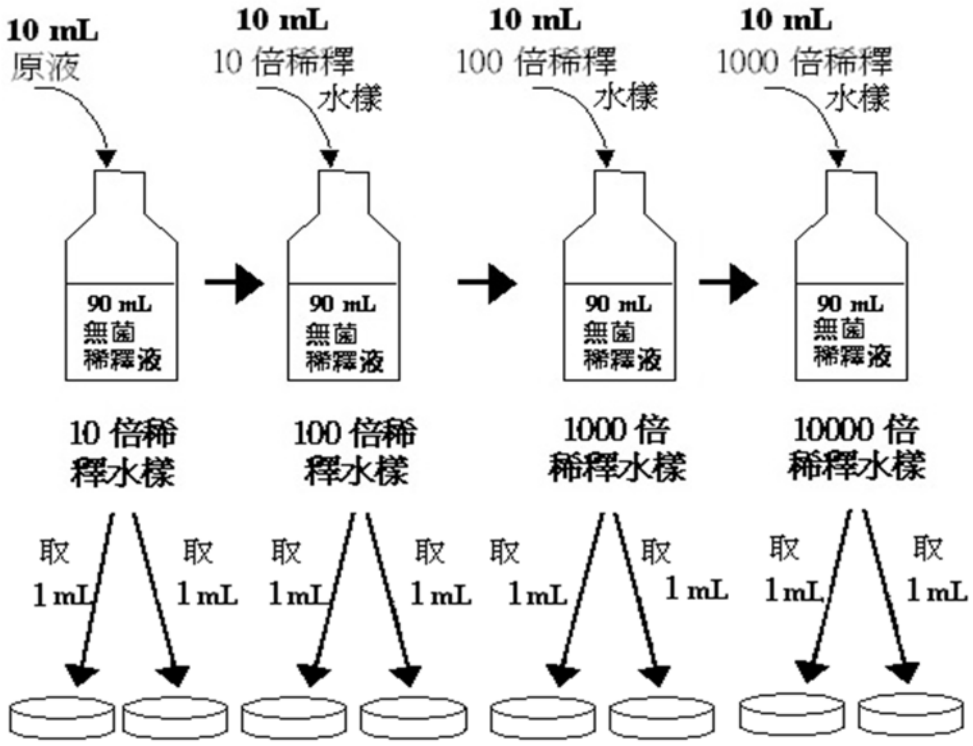

10 mL
原液
10 mL
10 倍稀釋
水樣
10 mL
100 倍稀釋
水樣
10 mL
1000 倍稀釋
水樣
90 mL
無菌
稀釋液
90 mL
無菌
稀釋液
90 mL
無菌
稀釋液
90 mL
無菌
稀釋液
10 倍稀
釋水樣
100 倍稀
釋水樣
1000 倍
稀釋水樣
10000 倍
稀釋水樣
取
1 mL
取
1 mL
取
1 mL
取
1 mL
取
1 mL
取
1 mL
取
1 mL
取
1 mL

圖1、水樣稀釋步驟

表1、總菌落數計算實例說明

培養皿中之菌落數				總菌落數 (CFU/mL)	參考
原液	稀釋10倍	稀釋 100倍	稀釋 1000倍		
TNTC；TNTC	156；162	17；19	1；0	1.6×10^3	八、（一）
TNTC；TNTC	59；53	6；4	0；0	5.6×10^2	八、（一）
310；298	29；25	3；4	0；0	3.0×10^2	八、（二）1
TNTC；TNTC	369；356	35；29	4；3	3.2×10^3	八、（二）1
25；24	1；2	0；0	0；0	25	八、（二）2
0；0	0；0	0；0	0；0	＜1	八、（二）2
TNTC；TNTC	321；311	27；29	3；4	3.2×10^3	八、（二）3
TNTC；TNTC	299；285	30；34	3；4	2.9×10^3	八、（二）4

註：TNTC 表示菌落太多，計數困難；畫雙底線數字表示用於結果計算