

水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法—酵素呈色濾膜法

中華民國 102 年 4 月 8 日環署檢字第 1020027519 號公告
自中華民國 102 年 6 月 15 日生效
NIEA E237.53B

一、方法概要

本方法可同時檢測水中大腸桿菌群及大腸桿菌，係以 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 孔徑之濾膜過濾水樣後，將濾膜置於含酵素色質之培養基上，於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養 22 至 24 小時之後，大腸桿菌除外之大腸桿菌群（Non-*E. coli* coliform）會形成紅色菌落，而大腸桿菌（*E. coli*）則會形成深藍色至藍紫色菌落。因此計數濾膜上深藍至藍紫色菌落數即可得到大腸桿菌數目，而計數紅色加上深藍至紫色菌落數目之總和即可得到大腸桿菌群數目。

方法原理是培養基內含兩種色原（Chromogen），其中一種（SalmonTM-GAL 或 Red-Gal[®]）可被半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase）水解呈現紅色；另外一種為 X-gluc，可被尿苷酸化酶（ β -glucuronidase）水解呈現藍色。由於大腸桿菌除外之大腸桿菌群具有半乳糖苷酶，因此菌落會呈現紅色；大腸桿菌（*E. coli*）則同時具有半乳糖苷酶及尿苷酸化酶，培養時會同時分解兩種色原，而產生深藍色至藍紫色菌落。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水、飲用水水源、地水面水體、地下水體、廢水、污水、放流水及海域地水面水體之大腸桿菌群及大腸桿菌檢測。

三、干擾

- (一) 水樣中含有抑制或促進大腸桿菌群及大腸桿菌生長之物質。
- (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及大腸桿菌生長之物質。
- (三) 水樣中如含有產氣單胞菌屬（*Aeromonas* spp.）或假單胞菌屬（*Pseudomonas* spp.）細菌時，可能會影響結果。

(四) 懸浮微粒過高或含有膠體的水樣易造成濾膜孔隙阻塞，或造成細菌菌落瀰漫生長 (Spreading) 而影響水樣檢測結果之判讀。

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 10 mL 無菌玻璃吸管或無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管 (Micropipet)。
- (三) 稀釋瓶：100 至 1000 mL 能耐高溫高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (四) 錐形瓶：200 至 2000 mL 能耐高溫高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (五) 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。
- (六) 培養皿：硼矽玻璃製品或市售無菌塑膠培養皿，大小為 60×15 mm、 50×12 mm 或其他適當大小。
- (七) 過濾裝置：能耐高溫高壓滅菌之玻璃、塑膠、陶瓷或不鏽鋼等材質構成之無縫隙濾杯，以鎖定裝置、磁力或重力固定於底座。
- (八) 抽氣幫浦：壓力差宜為 138 至 207 kPa。
- (九) 濾膜：使用直徑 47 mm、孔徑 0.45 μm 且有格線的無菌濾膜。
- (十) 吸收襯墊：直徑約 47 mm，厚度約 0.8 mm 之無菌襯墊，須可吸收 2.0 ± 0.2 mL 之液態培養基，且不可含有亞硫酸根離子等抑制物質。
- (十一) 鑷子：前端平滑內側無波紋，使用前浸泡於 95% 酒精再以火燄燃燒滅菌。
- (十二) 水浴槽：溫度能維持在約 50°C。
- (十三) 培養箱：溫度能維持在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- (十四) 加熱板：附磁石攪拌功能。

(十五) 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。

(十六) 高壓滅菌釜：溫度能保持在 121°C (壓力約 15 lb/in² 或 1.05 kg/cm²) 滅菌 15 分鐘以上。

(十七) 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°C 達 2 小時以上。

(十八) 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)。

(十九) 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均為試藥級，培養基為微生物級製品。

(一) 試劑水：導電度在 25°C 時小於 2 μmho / cm (μS / cm)。

(二) 培養基：可選用下列三者之一

1. Chromocult® 大腸桿菌群培養基 (Chromocult® coliform agar)
每一公升培養基之成分如下：

蛋白胨 (Peptones)	3.0 g
氯化鈉 (Sodium chloride)	5.0 g
磷酸二氫鈉 (Sodium dihydrogen phosphate)	2.2 g
磷酸氫二鈉 (di-Sodium hydrogen phosphate)	2.7 g
丙酮酸鈉 (Sodium pyruvate)	1.0 g
色胺酸 (Tryptophan)	1.0 g
瓊脂 (Agar)	10.0 g
山梨醇 (Sorbitol)	1.0 g

Tergitol® 7	0.15 g
色質混合物	0.4 g

秤取Chromocult®大腸桿菌群培養基粉末 13.25 g 置於無菌錐形瓶，加入 500 mL 的試劑水，煮沸溶解後（此培養基不可高溫高壓滅菌），置於 45 至 50°C 之水浴槽。待溫度下降至 45 至 50°C 後，加入抗生素萬古黴素（Vancomycin）及西蘇羅錠（Cefsulodin）（最終濃度均為 5 µg/mL），培養基最終pH為 6.8 ± 0.2。培養基混搖均勻，於無菌操作檯內分裝至無菌培養皿中，使培養基厚度約 2 至 4 mm。室溫下靜置凝固後，避光保存於 4 ± 2°C，保存期限為 14 天。可根據檢測需求量，依配方比例配製培養基。

※ 抗生素配製：可購買市售之「大腸桿菌/大腸菌群培養基添加物」(*E. coli*/coliform selective-supplement)，每一小管內含萬古黴素及西蘇羅錠各 2.5 mg。使用時將內容物溶於 2 mL 無菌試劑水後，可供 500 mL 培養基配製使用。配製培養基時須添加新鮮溶解之抗生素；已溶解之抗生素若未使用完畢，不可存放留待下次使用。

2. Chromocult® 加強選擇性大腸桿菌群培養基 (Chromocult® coliform agar ES)，每一公升培養基之成分如下：

蛋白胨 (Peptones)	5.0 g
氯化鉀 (Potassium chloride)	7.5 g
MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)	10.0 g
膽鹽 (Bile salts)	1.15 g
丙酸鹽 (Propionate)	0.5
瓊脂 (Agar)	10.0
6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside (Salmon™-GAL)	0.15 g
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	0.1 g

5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronic acid 0.1 g
(X-gluc)

將 Chromocult[®] 加強選擇性大腸桿菌群培養基粉末 17.25 g 置於無菌錐形瓶，加入 500 mL 的試劑水，煮沸溶解後（此培養基不可高溫高壓滅菌），冷卻至約 50°C，於無菌操作檯內分裝至無菌培養皿中，使厚度約 2 至 4 mm。培養基最終 pH 為 7.0 ± 0.2。室溫下靜置凝固後，避光保存於 4 ± 2°C，保存期限為 14 天。可根據檢測需求量，依配方比例配製培養基。

3. Coliscan[®] MF 培養液 (Coliscan[®] MF Broth)

Coliscan[®] MF 培養液內含 Red-Gal[®] 及 X-gluc 兩種色原，平時須冷凍保存，使用前須先解凍並加入抗生素西蘇羅錠 (Cefsulodin) 至最終濃度為 5 μ g/mL 後保存於 4 ± 2°C，保存期限為 14 天（不可再度冷凍）。進行檢測前視檢測需求量進行培養液分裝，每個內含墊片之培養皿中分裝約 2.0 ± 0.2 mL 培養液；分裝至培養皿之培養液須當天使用完畢。

※ 抗生素配製：秤取 2 mg（天平應可精秤至 0.1 mg）西蘇羅錠溶於 10 mL 無菌試劑水，過濾滅菌後，取 0.5 mL 加至 20 mL 之培養液。配製培養基時須添加新鮮溶解之抗生素；已溶解之抗生素若未使用完畢，不可存放留待下次使用。

（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 N 氢氧化鈉溶液調整其 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 °C 高溫高壓滅菌 15 分鐘以上）後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2 °C 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢驗需求量，依比例配製。

2. 氯化鎂儲備溶液

取 8.1 g 六水氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 或 3.8 g 無水氯化鎂，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 分鐘以上）後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2°C 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢驗需求量，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，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°C 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 °C 下保存期限為 6 個月（註 1）。可根據檢驗需求量，依比例配製。

六、採樣與保存

- (一) 採集水樣時，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，或於無菌容器中應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，飲用水出水口以火烤或以 70% 至 75% 酒精消毒。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，實驗室內保存溫度應維持在 4 ± 2°C。
- (四) 水樣應於採樣後 24 小時內完成水樣過濾步驟（七、步驟（五））並置入培養箱培養。
- (五) 水樣體積以能做完所須檢測為度，但不得少於 100 mL，飲用水水樣體積不得少於 200 mL。

七、步驟

(一) 水樣在進行檢測或稀釋之前必須劇烈搖晃 25 次以上，以使樣品充分混合均勻。

(二) 水樣稀釋：

1. 飲用水水樣不需稀釋。
2. 其他樣品則視水樣中大腸桿菌（群）可能濃度範圍進行水樣稀釋。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，混搖均勻。而後自 10 倍稀釋度水樣以相同操作方式進行一系列之 100、1000、10000 倍等稀釋度水樣，並混搖均勻。進行上述稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。水樣稀釋步驟如圖 1 所示（註 2）。

(三) 以無菌鑷子夾起無菌濾膜，放在無菌過濾裝置之有孔平板上，小心將濾杯固定。將過濾裝置接上抽氣幫浦。加入適量無菌稀釋液，以測定過濾裝置是否配置妥當。

(四) 檢測飲用水水樣時，直接過濾 100 mL 的水樣，若存在濁度過高或雜菌過多等干擾，可另外以無菌吸管吸取 10 mL 的原液及（或）各稀釋度水樣至無菌過濾器中過濾（註 3）。其他水樣則視大腸桿菌（群）可能濃度範圍，以無菌吸管吸取 10 mL 的原液及（或）各稀釋度水樣至無菌過濾器中過濾。原液及（或）各稀釋度水樣均需進行二重複。過濾後，再以 20 mL 以上之無菌稀釋液沖洗濾杯。

(五) 沖洗過濾後，將濾杯移開，儘速以無菌鑷子夾起過濾後之濾膜置於培養基上。濾膜應與培養基完全貼合，以免產生氣泡。

(六) 培養皿倒置於於培養箱內， $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培養 22 至 24 小時。

(七) 若欲進行另一個水樣時，應更換無菌過濾器（濾杯）。亦可將過濾器（濾杯）以火烤後降至接近室溫重複使用。

(八) 計算並分別記錄各稀釋度培養皿中所產生的紅色及深藍色至藍紫色菌落數（註 4）。若菌落總數超過 200 個（包含陽性菌落及陰性菌落），或是細菌瀰漫生長造成判讀困難，則以「菌落太多無法計數」（Too numerous to count; TNTC）表示，代表此一培養皿無法進行大腸桿菌（群）定量（註 5）。

八、結果處理（計算實例請參照表 1）

（一）若原液及各稀釋水樣之可定量培養皿中，僅有一個稀釋度的二重複培養皿之陽性菌落（大腸桿菌群：紅色加上深藍色至藍紫色菌落；大腸桿菌：深藍色至藍紫色菌落）數目均在 20 至 80 個之間，則選取該稀釋度之兩個培養皿，以下列公式計算大腸桿菌及大腸桿菌群密度，單位為 CFU/100 mL (Colony forming units/100 mL)：

$$\text{大腸桿菌(CFU/100mL)} = \frac{\text{選取培養皿之深藍色至藍紫色菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} \times 100$$
$$= \frac{X + Y}{(10/D) + (10/D)} \times 100$$

$$\text{大腸桿菌群(CFU/100mL)} = \frac{\text{選取培養皿之紅色加上深藍色至藍紫色菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} \times 100$$
$$= \frac{X + Y}{(10/D) + (10/D)} \times 100$$

註：D：選取培養皿之稀釋度。

（二）若結果與八、（一）所述不符，則以下列方式計算：

1. 若原液及各稀釋度水樣之可定量培養皿中，僅有一個稀釋度的一個培養皿陽性菌落數目在 20 至 80 個之間，則選取該稀釋度的兩個培養皿，以上述公式計算。
2. 若各培養皿之陽性菌落數目均小於 20 個 (TNTC 之培養皿不計)，則選取陽性菌落數目最接近 20 個之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述公式計算。
3. 若各培養皿之陽性菌落數目均不在 20 至 80 個之間 (TNTC 之培養皿不計)，則選取陽性菌落數目最接近 80 個之同一稀釋度的兩個培養皿，依上述公式計算之。

（三）數據表示：若過濾 100 mL 原液且計算結果小於 1，則結果以「< 1 CFU/100mL」表示；若過濾 10 mL 原液且計算結果小於 10，則結果以「<10 CFU/100mL」表示。小於 100 時，以整數表示（小數位四捨五入）；100 以上時，只取兩位有效數字（四捨五入）。

（四）檢測紀錄必須註明採樣時間、開始和結束培養時間、培養基名稱及各稀釋度的原始數據。

九、品質管制

- (一) 微生物採樣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，每批號均須以已知的大腸桿菌除外之大腸桿菌群（如 *Enterobacter aerogenes*、*Citrobacter freundii*）及大腸桿菌（*E. coli*）之陽性控制菌株進行測試（測試方式詳見「環境微生物檢測通則—細菌（NIEA E101）」）。
- (六) 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。
- (七) 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、精密度及準確性

略

十一、參考資料

- (一) U.S.EPA, Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium), Method 1604, 2002.
- (二) American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for

the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed., Method 9222B, 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：若為具備消毒單元之自來水及簡易自來水之飲用水水源者，可不過濾 100 mL 原液，而直接過濾 10 mL 的原液及（或）各稀釋度水樣。

註 4：若根據歷史數據或水樣特性，水樣有濁度較高之狀況，或預期濾膜上之雜菌菌落數可能為陽性菌落數的 10 倍以上，可將水樣以 2 張以上之濾膜過濾，培養後再將陽性菌落數加總計算，以降低干擾。

註 5：實際之菌落呈色，須參考「大腸桿菌除外之大腸桿菌群」陽性控制菌株及「大腸桿菌」陽性控制菌株之培養結果。

註 6：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。

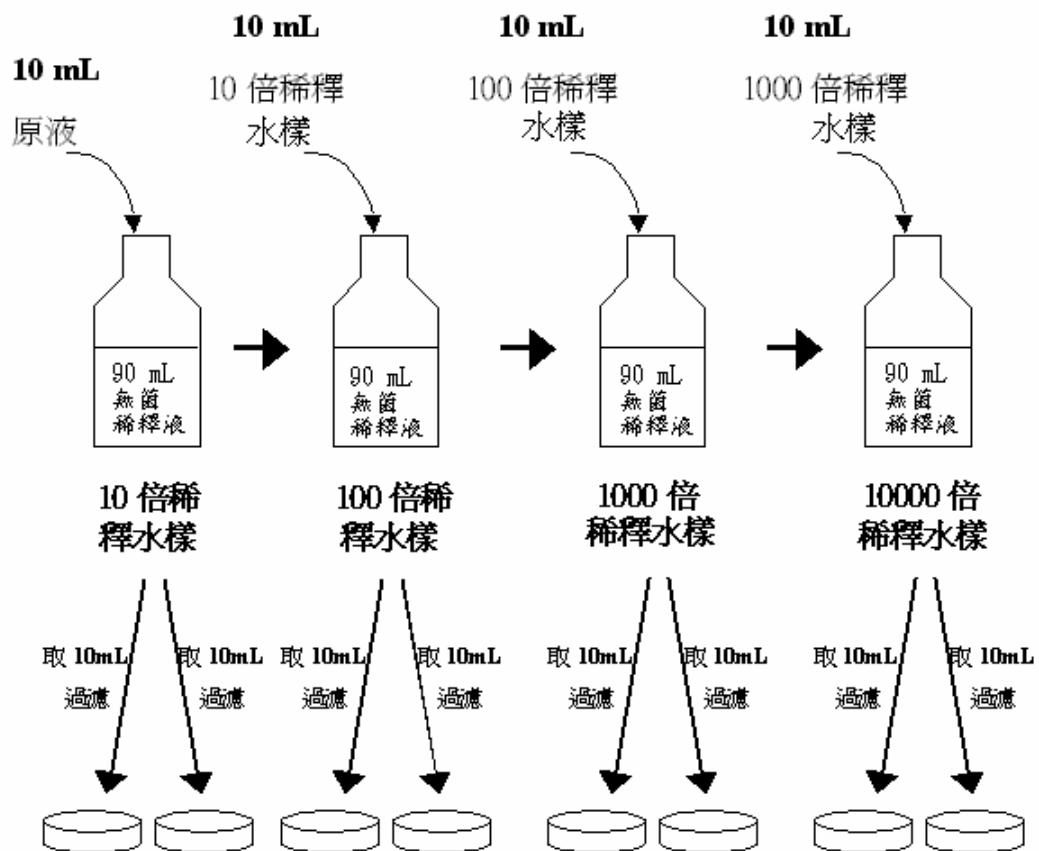


圖 1、水樣稀釋步驟

表 1、大腸桿菌（群）計算實例說明

	過濾水樣體積				結果表示		參考
	100 mL	10 mL	1 mL	0.1 mL	大腸桿菌群 密度 (CFU/100 mL)	大腸桿菌 密度 (CFU/100 mL)	
紅色菌落 數目	<u>0 ; 0</u>	--	--	--	< 1	< 1	八、(二) 2
深藍色至藍紫 色菌落數目	<u>0 ; 0</u>	--	--	--			
紅色菌落 數目	--	TNTC ; TNTC	<u>40 ; 45</u>	4 ; 5	7.3×10^3	3.0×10^3	八、(一)
深藍色至藍紫 色菌落數目	--	TNTC ; TNTC	<u>35 ; 25</u>	2 ; 2			
紅色菌落 數目	TNTC ; TNTC	<u>69 ; 68</u>	5 ; 7	--	8.8×10^2	1.9×10^2	八、(一) 及 八、(二) 1
深藍色至藍紫 色菌落數目	TNTC ; TNTC	<u>21 ; 17</u>	1 ; 3	--			

註： 畫雙底線數字表示用於結果計算