

水中大腸桿菌檢測方法－改良式 mTEC 培養基濾膜法

中華民國 102 年 6 月 3 日環署檢字第 1020046165 號公告

自中華民國 102 年 8 月 15 日生效

NIEA E234.52C

一、方法概要

本方法係以 0.45 μm 孔徑之濾膜過濾水樣，檢測水中大腸桿菌 (*Escherichia coli*)。水樣過濾後將濾膜置於改良式 mTEC 培養基 (Modified membrane-thermotolerant *Escherichia coli* agar; modified mTEC agar) 上，於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養 2 ± 0.5 小時，再以 $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培養 22 ± 2 小時，大腸桿菌會形成紅色或紫紅色菌落。

方法原理是培養基內含之色原 (5-溴-6-氯-3-吲哚- β -D-尿苷酸，5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) 被大腸桿菌之尿苷酸化酶 (β -D-glucuronidase) 催化而產生紅色或紫紅色菌落。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水、飲用水水源、地面水體、地下水體、廢水、污水、放流水及海域地面水體之大腸桿菌檢驗。但不適於高濁度及含有干擾物質水樣之檢測。

三、干擾

- (一) 水樣中含有抑制或促進大腸桿菌生長之物質。
- (二) 檢驗使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進大腸桿菌生長之物質。
- (三) 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) 而影響水樣檢驗結果之判讀。

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 1 及 10 mL 滅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 1000 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 以上無菌之玻璃或塑膠製有蓋容器，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) 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。
- (十一) 水浴槽：溫度能維持在約 50°C。如用於 44.5°C 培養，溫度必須能維持在 44.5 $\pm$ 0.5°C，且具有水循環裝置。
- (十二) 培養箱：溫度能維持在 35 $\pm$ 1°C。
- (十三) 加熱板：附磁石攪拌功能。
- (十四) 天平：能精稱至 0.01 g。
- (十五) 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。
- (十六) 高溫乾熱烘箱：如用於玻璃器皿等用具之乾熱滅菌，溫度須能維持在 170 $\pm$ 10°C 達 2 小時以上。
- (十七) 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)。
- (十八) 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，應使用配備表面電極（Surface probe）之 pH 計。

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°C 時小於 2 $\mu\text{mho/cm}$ ($\mu\text{S/cm}$)。

（二）培養基

改良式 mTEC 培養基成份：

3 號蛋白胨 (Protease peptone #3)	5.0 g
酵母抽出物 (Yeast extract)	3.0 g
乳糖 (Lactose)	10.0 g
氯化鈉 (Sodium chloride)	7.5 g
磷酸氫二鉀 (Dipotassium phosphate)	3.3 g
磷酸二氫鉀 (Monopotassium phosphate)	1.0 g
硫酸月桂酸鈉 (Sodium lauryl sulfate)	0.2 g
去氧膽酸鈉 (Sodium desoxycholate)	0.1 g
5-溴-6-氯-3-吲哚- β -D-尿甘酸 (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide)	0.5 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g
試劑水	1 L

將 45.6 g 改良式 mTEC 培養基粉末加入 1 L 試劑水，加熱溶解後以 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘。冷卻至約 50°C，將培養基混搖均勻，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。培養基最終 pH 值應為 7.3 ± 0.2 。室溫下靜置凝固後，避光保存於 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ，保存期限為 14 天。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 的試劑水中，俟完全溶解後，以 1 N 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°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘）後，儲存於冰箱中備用。 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 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°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘）後，儲存於冰箱中備用。 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 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。 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 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) 採取微生物檢測之水樣時，應使用清潔並經滅菌之玻璃、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無菌之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 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (四) 水樣應於採樣後 24 小時內完成水樣過濾步驟（七、步驟（五））並進行培養。
- (五) 水樣量以能做完所需檢測為度，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. 視水樣中大腸桿菌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。水樣稀釋步驟如圖一所示（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。加入適量無菌稀釋液，以測定過濾設備是否裝置妥當。
- (四) 檢驗飲用水水樣時，直接過濾 100 mL 的水樣。其他水樣視大腸桿菌可能濃度範圍，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）各稀釋度水樣皆需進行二重複。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，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於

培養基上。濾膜應與培基完全貼合，避免產生氣泡。

- (六) 培養皿倒置於培養箱內，於 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培養 2 ± 0.5 小時。然後將培養皿倒置密封於防滲水塑膠袋內（如無菌採樣袋），置於水浴槽中，於 $44.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下培養 22 ± 2 小時。塑膠袋須完全浸入水中。
- (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) 計算並記錄各稀釋度培養皿中所產生的紅色及紫紅色菌落。若濾膜上菌落之總數超過 200 個，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定量。

八、結果處理

- (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大腸桿菌菌落數均在 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密度，單位為 CFU/100 mL (Colony forming units/100 mL)：

$$\begin{aligned}\text{大腸桿菌(CFU/100 mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之紅色及紫紅色菌落數總和}}{\text{選取培養皿之水樣實際體積總和}} \times 100 \\ &= \frac{X + Y}{(\text{過濾體積}/D) + (\text{過濾體積}/D)}\end{aligned}$$

註：D：選取培養皿之稀釋度

X、Y：D 稀釋度的兩個培養皿之紅色及紫紅色菌落數

- (二) 若結果與八、(一) 所述不符，則以下列方式計算大腸桿菌密度：
 - 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大腸桿菌菌落數在 20 至 80 個之間，則選取該稀釋度的兩個培養皿，以上述八、(一) 公式計算。
 - 2. 若各培養皿之大腸桿菌菌落數均小於 20 個（TNTC 之培養皿

不計)，則選取大腸桿菌菌落數最接近 20 個之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述八、(一) 公式計算；若過濾 100 mL 原液，培養皿中均無菌落生長，則結果以「<1 CFU/100mL」表示；若過濾 10 mL 原液，培養皿中均無菌落生長，則結果以「<10 CFU/100mL」表示。

3. 若各培養皿之大腸桿菌菌落數均不在 20 至 80 個之間，則選取大腸桿菌菌落數最接近 80 之同一稀釋度的兩個培養皿，以上述八、(一) 公式計算。

(三) 數據表示：若計算結果小於 100 時，以整數表示（小數位四捨五入）；100 以上時，取兩位有效數字（四捨五入）。

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

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) 新購之改良式 mTEC 培養基，每批號均須以大腸桿菌菌株或含有大腸桿菌之水樣進行測試（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，則須以大腸桿菌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、精密度及準確度

略

十一、參考文獻

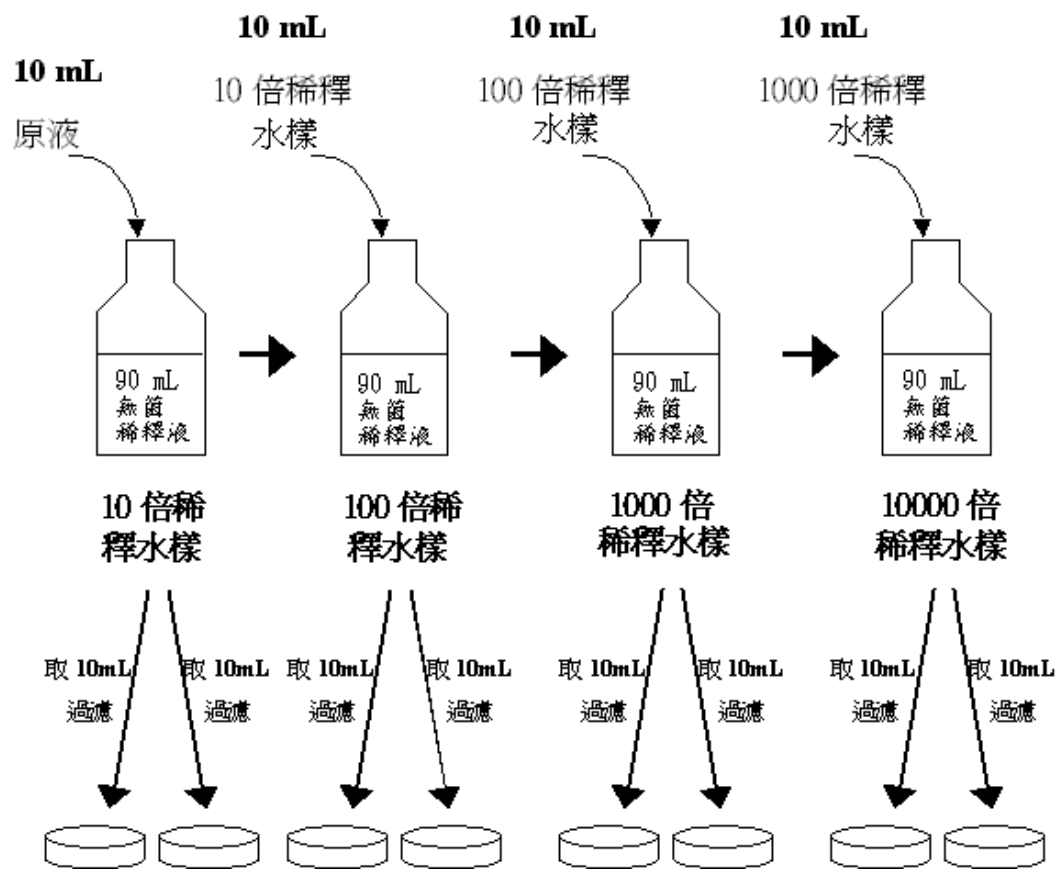
(一) U.S.EPA, Escherichia coli (E.coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC). Method 1603, 2009.

(二) APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, Method 9222, 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：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。



圖一、水樣稀釋步驟