

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 ± 0.5°C，且具有水循環裝置。
- (十二) 培養箱：溫度能維持在 35 ± 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 ± 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 μ mho/cm (μ 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
<u>試劑水</u>	<u>1 L</u>

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 \pm 0.2。室溫下靜置凝固後，避光保存於 4 \pm 2 °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 ± 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 ± 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

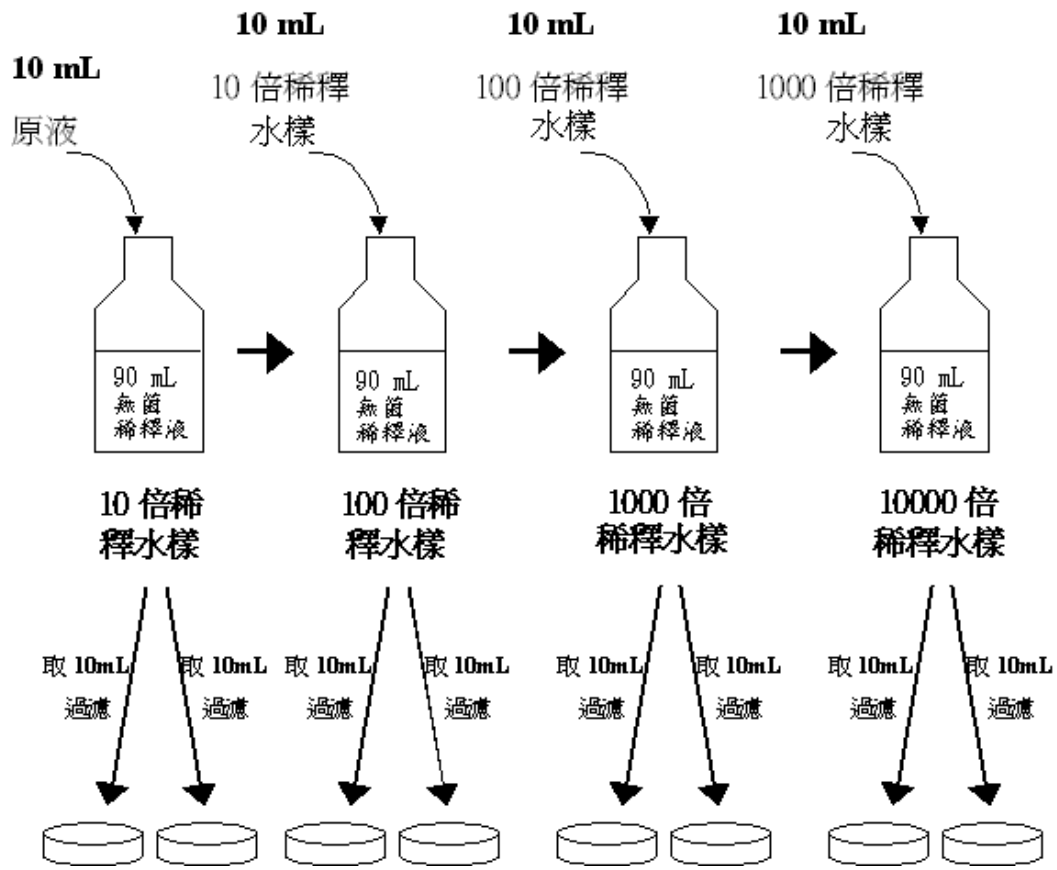
(一) U.S.EPA, Escherichia coli (E.coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC). Method 1603, 2009.

(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