

# 水中大腸桿菌 mTEC 培養基檢驗方法－濾膜法

NIEA E234.51C

## 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*)。水樣過濾後置於 mTEC 培養基(modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar，縮寫為 modified mTEC Agar)上，於 35±1°C 培養 2 小時，再以 44.5±0.5°C 培養 22~24 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-尿甘酸，5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)被大腸桿菌之尿甘酸化酶 (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水質、飲用水水源水質、地面水體、地下水體、廢水、污水、及海水等水樣中大腸桿菌之檢驗。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時，會影響水樣之檢測結果。
- (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時，會影響水樣之檢測結果。
- (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

- (一) 量筒：一般使用 100~1000 mL 之量筒。
- (二) 吸管：一般使用 1~10 mL 之滅菌玻璃吸管或無菌塑膠吸管，應有 0.1 mL 之刻度。
- (三) 稀釋瓶：100~1000 mL 能耐高壓滅菌之有蓋硼矽玻璃製品。
- (四) 三角錐瓶：250~2000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (五) 採樣容器：無菌之玻璃或塑膠製有蓋容器，使用市售無菌袋亦可。
- (六) 培養皿：硼矽玻璃或可拋棄式塑膠製培養皿。可使用 60×15 mm、50×12 mm 或其他適當大小者。
- (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漏斗，以鎖定裝置、磁力或重力固定於底座。
- (八) 抽氣幫浦：水壓式或吸氣式，壓力差最好在 138 至 207 kPa 者。
- (九) 濾膜：使用直徑 47 mm、孔徑 0.45  $\mu\text{m}$  且有格子記號的無菌濾膜，能使水中大腸桿菌完全滯留者。
- (十) 鑷子：前端圓滑內側無波紋。
- (十一) 水浴槽：溫度能維持在 50°C 左右者。如用於 44.5°C 培養，溫度必須能維持在 44.5±0.5°C。
- (十二) 培養箱：溫度能維持在 35±1°C 者。如用於 44.5°C 培養，溫度必須能維持在 44.5±0.5°C。
- (十三) 加熱板：附磁石攪拌功能者。
- (十四) 天平：能精稱至 0.01 g 者。
- (十五) 高壓滅菌釜：能以中心溫度 121°C (壓力約 15 lb/in<sup>2</sup> 或 1.1 kg/cm<sup>2</sup>) 滅菌 15 分鐘以上者。
- (十六) 烘箱：用於玻璃器皿等用具之乾熱滅菌，溫度能維持在 160°C 達 2 小時或 170°C 達 1 小時以上者。

## 五、試劑及材料

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) 培養基

#### **mTEC 培養基(modified mTEC Agar) 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
<u>5-溴-6-氯-3-吲哚-β-D-尿甘酸</u>	
<u>(5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)</u>	<u>0.5 g</u>
瓊脂(Agar)	15.0 g

使用市售商品化培養基 45.6 g，加入 1 公升的蒸餾水，煮沸溶解後以 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘，培養基最終 pH 值應為 7.3±0.2。取出後置於 45~50°C 之水浴槽待溫度下降至恒溫，培養基混搖均勻後分裝於培養皿中，厚度約 3~5 mm。凝固後避光保存於冰箱中備用，分裝後之培養基保存期限為 14 天。可依檢測需要量按比例適量配製。

### (二) 無菌稀釋液

無菌稀釋液一：非海水水樣檢測稀釋用。配製方法如下：

#### 磷酸二氫鉀儲備溶液

取 3.4 g 磷酸二氫鉀 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 溶於 50 mL 的蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1.0 M NaOH 溶液調整其 pH 值為 7.20±0.05，然

後加蒸餾水至全量為 100 mL，滅菌(過濾滅菌或 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘)後，儲存於冰箱中作為儲存液備用。

#### 氯化鎂儲備溶液

取 8.1 g 氯化鎂 ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) 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，滅菌(過濾滅菌或 121°C 高溫高壓滅菌 15 分鐘)後，保存於冰箱中作為儲存液備用。

#### 無菌稀釋液

分別取 10 mL 氯化鎂儲備溶液和 2.5 mL 磷酸二氫鉀溶液，加入蒸餾水至全量為 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，作為無菌稀釋液備用。

無菌稀釋液二：海水或含鹽水樣稀釋用。

磷酸二氫鈉( $NaH_2PO_4$ )	0.58 g
磷酸氫二鈉( $Na_2HPO_4$ )	2.50 g
氯化鈉( $NaCl$ )	8.50 g

將上述成分溶解於 1 公升的蒸餾水中，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，其滅菌後之 pH 值為  $7.4 \pm 0.2$ 。

### 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或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，無菌容器中應加入適量無菌之硫代硫酸鈉(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)。
- (二) 水樣運送及保存之溫度應維持在 0~5°C 並於採樣 24 小時內完成檢測。
- (三) 水樣量以能做完所需檢測為度，但不得少於 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：

飲用水水樣不需稀釋。

其他樣品則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之 100、1000 倍等稀釋水樣，並混搖均勻。進行上述稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。水樣稀釋步驟如附圖一所示。

(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，小心將漏斗固定。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。過濾後，再以 20 至 30 mL 之無菌稀釋液沖洗漏斗。每個稀釋度水樣均需進行兩重複。

(五) 沖洗過濾後，解開真空裝置，將漏斗移開，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於培養基上。濾膜應與培養基完全貼合，避免產生氣泡。培養皿倒置於  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  的恆溫培養箱中培養 2 小時，然後再於  $44.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  的培養箱或水浴槽中培養 22~24 小時。如放置於水浴槽中培養，應將培養皿倒置密封於防滲水塑膠袋內(如採樣袋)，塑膠袋須完全浸入水中。如使用鬆蓋培養皿放置於培養箱中培養，應將培養皿放置於密閉容器中，且容器內側底部應放置濕紙巾或濕布，以避免培養基之水份喪失而影響細菌生長。

(六) 過濾不同稀釋度水樣時，應更換無菌過濾器（漏斗）。亦可將過濾器

(漏斗)以火烤後約降至室溫重複使用。

- (七) 計算並記錄各稀釋度培養皿中所產生的紅色或紫紅色菌落。若菌落過多造成判讀困難，則以「大腸桿菌菌落太多無法計數」(*E. coli* Too numerous to count ; TNTC) 表示。

#### 八、結果處理

- (一) 選取大腸桿菌菌落數介於 20 至 80 間之同一稀釋度的兩個培養皿，計算其每 100 mL 水樣之大腸桿菌菌落數，單位為 CFU/100mL。計算公式如下：

$$\text{大腸桿菌菌落數 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所選取培養皿之紅色或紫紅色菌落數}}{\text{所選取培養皿之實際水樣體積總合}} \times 100$$

- (二) 培養皿之大腸桿菌菌落數不在 20 至 80 個菌落之間時，則以下列方式處理：

若原液及各稀釋度水樣中僅有一個稀釋度的一個培養皿菌落數在 20 至 80 個之間，則選取該稀釋度的兩個培養皿以上述公式計算之。

若僅原液有大腸桿菌菌落產生，且少於 20 個，應循上述公式計數菌落數；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。

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公式計算。但不可選用菌落總數大於 200 之培養皿。

- (三) 數據表示：菌落數小於 100 時，以整數表示（小數位四捨五入），菌落數大於 100 以上時，取兩位有效數字，並以科學記號表示，例如菌落數為 112 時以  $1.1 \times 10^2$  表示之，菌落數為 117 時以  $1.2 \times 10^2$  表示之，菌落數為 65000 時以  $6.5 \times 10^4$  表示。

- (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。

## 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) 進行微生物檢測時，所用的盛裝器具均應經滅菌處理。
- (三) 每次採樣時，應進行一組運送空白及野外空白。
- (四) 每批次或每 10 個水樣須進行一次試劑空白。
- (五) 新購之 mTEC 培養基，每批次均須以已知的大腸桿菌及非大腸桿菌(例如 *Bacillus subtilis*)之菌株作測試，以確保數據品質。
- (六) 若連續一個月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) 應記錄所有稀釋度水樣的原始數據，以備查核之用。
- (八) 每個稀釋度水樣至少須進行二重複。
- (九) 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

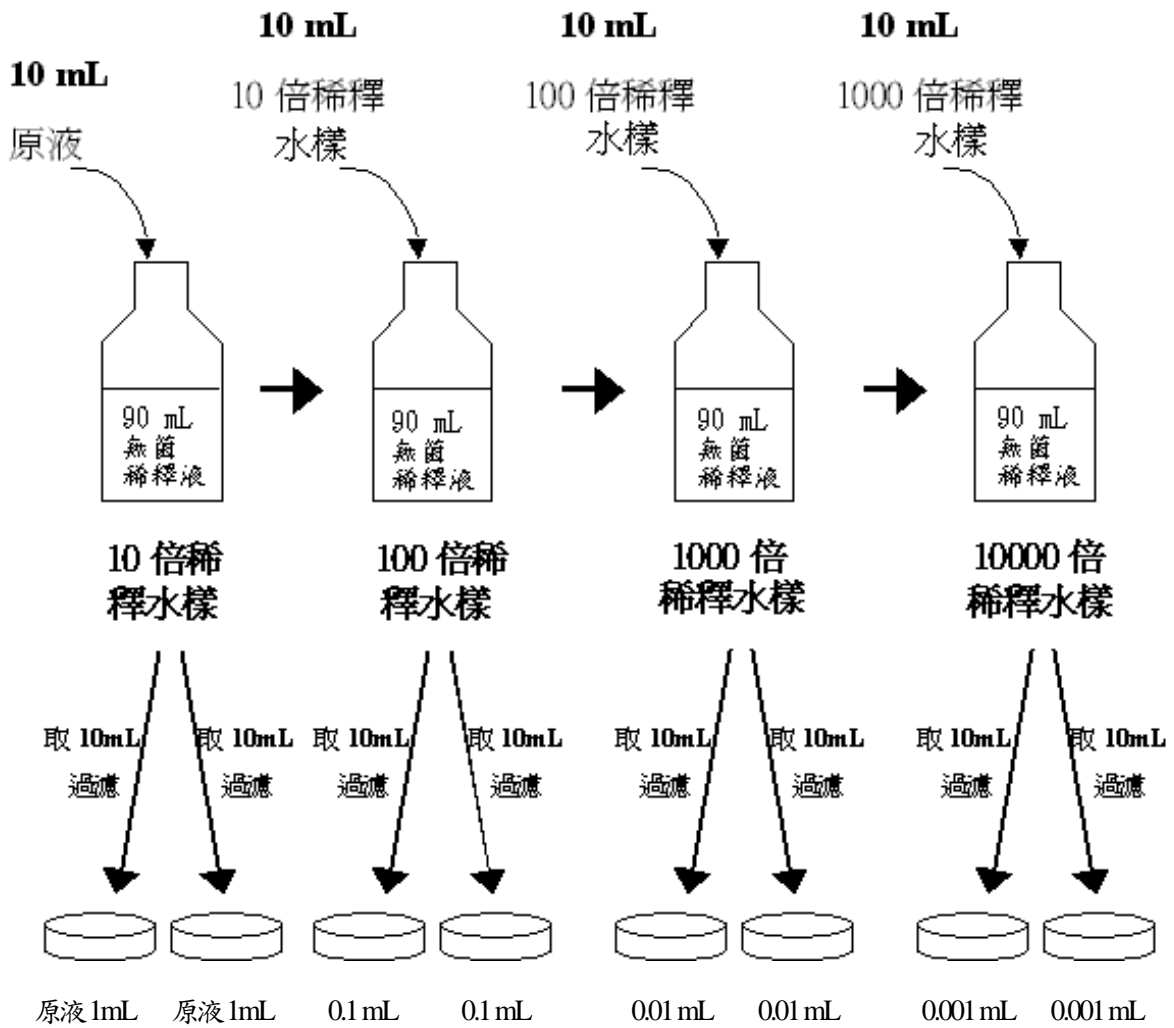
略

## 十一、參考文獻

- (一) US EPA. 2005. Method 1603: Escherichia coli (E.coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC). Washington DC, EPA-821-R-04-025.
- (二) American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. 2005. Standard Methods for the

Examination of Water and Wastewater, 21st Edition., Method 9222.  
APHA, Washington, D.C.





圖一：水樣稀釋步驟