



微生物檢測方法

張士軒

臺灣省水產試驗所水產加工系

壹. 前言

目前本省各地魚市場拍賣魚貨之時間，受到漁獲量、漁區、季節、魚種和人力之影響，有的每天拍賣一次，最多二次，有的在凌晨3-4點拍賣，有的則在上午(及或)下午拍賣；此外，魚貨品質衛生檢驗人員大多是兼職，無法確實地執行檢驗業務，為亟待解決的問題。

為了落實檢驗業務，在微生物檢測項目和方法上，有必要做適當的調整。本講義將先敘述微生物檢測須知，使檢驗人員對它有正確的認知和做法；然後說明檢測生菌數、大腸菌群和糞便大腸菌群等衛生指標之意義和目的，檢驗流程及其細節和注意事項。希望能夠建立檢驗人員的信心，順利執行此一業務。

貳. 微生物檢測須知

1. 進入檢驗室，應立即穿上實驗衣。
2. 實驗台、用具、器材和設備等應經常保持整潔。
3. 檢測前、後要用消毒劑清洗實驗台。
4. 需充分瞭解檢測項目的方法，依照步驟進行檢測。
5. 檢測時要戴口罩，雙手要注意洗淨或消毒。
6. 檢測結果或數據必須寫在記錄簿上，以備查證。
7. 檢測用試劑、藥品和培養基等要集中放置，標示清楚。

- 8.非檢測用品如雨具、雜書和收錄音機等勿置於實驗台上，應放在不影響檢驗的地方。
9. 禁止閒雜人員進出檢驗室。
- 10.檢驗室內不可喧嘩、進食、抽煙、嚼口香糖或檳榔等。
- 11.廢棄物如紙屑和火柴棒等應裝入廢物袋中丟棄。
- 12.用過的培養基、培養皿、試管和吸管等，應經殺菌處理，才可丟棄或清洗再用。塑膠製培養皿應裝入耐熱塑膠袋中殺菌。
- 13.操作殺菌釜時，不可擅離檢驗室，應隨時檢視釜溫和釜壓，小心操作，便無危險之虞。

參. 生菌數之測定

1.意義和目的

生菌數(viable bacterial count, VBC)是指具有生命活力的微生物(包括細菌、酵母菌和黴菌)之數目，它們在有空氣存在的環境中，能夠在非選擇性的(non-selective) 培養基(如PCA、NA、TSA、marine 2216 agar或PPBE)上生長。一般是指好氣性平板(培養皿)上的菌落數(aerobic plate count, APC)，有時亦稱為總平板菌落數(total plate count, TPC)或標準平板菌落數(standard plate count, SPC)。

理論上，在培養基上面形成的一個菌落，是由一個細菌繁衍產生的，故生菌數是以菌落形成單位(colony forming unit, CFU)為計數的基準，而以CFU/g、CFU/cm²或CFU/mL為單位，其數字是用四捨五入法取到小數點後面一位再乘以10的n次方 (n= 0, 1, 2, 3,...)表示。

生菌數只表示污染菌數之多寡或檢體受污染的程度，是一種粗略的衛生指標。生菌數達一百萬 一千萬以上時，魚介類可能已經發臭、腐敗，但因魚介類種類、特性和污染菌的種類、數量而有差異，故不是一種很好的鮮度指標。例如：醱酵食品有很高的生菌數為其特徵，但不能據以認定它已腐敗或鮮度不佳；有些食物的生菌數很低，但由於腐敗菌佔生菌數之比例很高，它就已經腐敗或不新鮮。雖然如此，但在魚介類的鮮度判定上，生菌數與別的鮮度指標常被採用。

我國的食品衛生管理法規定：生食用魚介類、生食用牡蠣、冷凍鮮魚介類、冷凍生食用牡蠣和冷凍生食用魚介類之生菌數分別為十萬以下、五萬以下、三百萬以下、五萬以下和十萬以下。吾人可根據這些規定，判定受檢檢體是否合乎生菌數的衛生標準。

2.生菌數測定(混稀培養法)之流程

25 g 檢體
+
225 mL 生理食鹽水(或磷酸鹽緩衝溶液)

均質(10^{-1} 稀釋倍數均質液)

10 mL 10^{-1} 稀釋倍數均質液
+
90 mL 生理食鹽水(或磷酸鹽緩衝溶液)

10^{-2} 稀釋倍數均質液

同上作成適當稀釋倍數(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5})均質液

取各稀釋倍數均質液 1 mL 注入無菌培養皿(二重覆)

倒入 12-15 mL PCA (45 ± 1)

混勻，待培養基凝固後，倒置於恆溫箱中

35℃ 培養 48 \pm 2 hr

計數：選取菌落數 25-250 之培養皿，
計算平均菌落數(CFU/mL、g 或 cm^2)

3. 生菌數測定方法(混稀培養法)之說明

(1) 採樣方法

對於進出魚市場的生鮮魚貨，採樣時，每件魚貨至少要採 100g，每一種魚介類裝入一只乾淨的塑膠袋。採樣後若無法立即進行檢測，應立刻將樣品放進冰箱的冷藏室($2-5$)暫存，且要在當天取出進行檢測。

冷凍魚貨於採樣時，每一種魚介類亦裝入一只乾淨的塑膠袋。採樣後若無法立即進行檢測，應將樣品放進冰箱的冷凍室(約-10)或大型冷凍庫(-18 以下)暫存。檢測前應將樣品先予解凍：若放在冰箱的冷藏室中解凍，必需在18 hr以內取出進行檢測；若用自來水在水槽中實施流水解凍，必需在1 hr以內取出進行檢測。

(2) 檢體(魚介類均質液)之調製

取樣部位：一般魚介類要檢測的部位為其肌肉部份，例如魚類為不含表皮的背肉，蝦類和貝類為不含外殼的肌肉，取樣的檢體重量為10 100 g。視實際需要，魚類有時是以魚體表面、腹肉、尾肉或內臟為檢體，小魚或小蝦則以整尾為檢體，因此，檢測時應記載檢體的來源，即取樣的部位。

取樣方法：採取檢體時，應戴上乾淨的塑膠手套，或用75%酒精消毒雙手；與魚體接觸的用具如切魚刀、砧板、鉗子、鑷子或不銹鋼盤等，應先用火焰殺菌，或用75%酒精消毒；魚體表面則用95%酒精擦拭消毒，以避免二次污染。接著用切魚刀採取欲檢測的部位，予以剁碎、混勻，再用滅菌過的鉗子或鑷子取適當量(如25 g)的檢體於均質瓶(500 mL，附均質刀)中。均質瓶中需預先裝進225 mL的生理食鹽水(0.85 %NaCl)或磷酸鹽緩衝溶液，並經121 滅菌15 min後才可使用

均質方法：微生物檢測用的均質機，一般是使用市售的果汁機的底座，具多段式轉速。將含檢體的均質瓶倒置於其底座上，先用低轉速均質15 sec，再用高轉速均質1 2 min，直到均質瓶中的魚肉汁呈現均勻的混濁狀即可。

均質液的稀釋方法：以上述方法得到的魚介肉均質液，稱為 10^{-1} 稀釋倍數均質液或供試液。在室溫下靜置數分鐘(不可超過15 min)，當氣泡消失後，作成適當的稀釋倍數之均質液(如 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 連續的稀釋倍數)，即用無菌的吸管頭(tip)吸取10 mL 10^{-1} 稀釋倍數均質液，注入含90 mL 無菌生理食鹽水或磷酸鹽緩衝溶液的稀釋瓶中，旋緊瓶蓋，在7 sec內以30 cm的弧度左右搖幌25次，即得 10^{-2} 稀釋倍數均質液，依此類推，視需要作成一系列稀釋倍數之均質液；當最高稀釋倍數的均質液呈現澄清狀態即可，若仍稍有混濁，則還要作進一步的稀釋。

(3) 混稀培養法之操作方法

預備動作：在無菌操作台(laminar flow)內操作。在進行以下操作之前15 min，先用95%酒精噴灑於無菌操作台的濾網表面、玻璃隔板內側、上面和台面，依序打開電源、送風機和紫外燈。進行操作時，先關掉紫外燈，雙手用75%酒精消毒，將無菌的培養皿、至少三個連續的稀釋倍數之均質液、平板計數洋菜培養基(Plate Count Agar, PCA)、無菌的吸管頭等置於台面。以油性簽字筆在培養皿蓋子的邊緣作標識，例如：只有一件檢體時，每一稀釋倍數之均質液需 2個培養皿；若使用 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 稀釋倍數之均質液時，可寫上1-1、1-2、2-1、2-2、3-1和3-2，第一個數字代表稀釋倍數10倍、100倍和1000倍，第二個數字代表第1和2個培養皿；若有二件以上的檢體時，可寫上1-1-1、1-1-2、...2-1-1、2-1-2、...3-1-1、3-1-2....，第一個數字代表檢體的編號或代號，第二和第三個數字分別為前述的稀釋倍數和培養皿。同時要寫上測定日期和時間，例如84年12月13日下午3點30分，可寫成

841213/1530。絕對不要輕忽此一標識動作。

均質液注入培養皿的方法：各稀釋倍數之均質液在使用前應再搖勻，然後打開蓋子，用無菌吸管頭吸取1 mL均質液，注入培養皿內，各稀釋倍數均質液要作2個培養皿。若均質液之稀釋倍數為 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 時，先對3-1和3-2的培養皿分別注入1 mL 10^{-3} 稀釋倍數均質液；不必更換吸管頭，即可對2-1和2-2的培養皿分別注入1 mL 10^{-2} 稀釋倍數均質液；依此類推。若以相反順序操作時，則每做完一個稀釋倍數均質液注入培養皿的動作之後，必需換新的吸管頭，才可做下一個稀釋倍數均質液注入培養皿之動作。

培養基倒入培養皿的方法：取下覆蓋在三角瓶口的鋁箔紙，瓶口用火焰燒過，將12-15 mL的培養基(如PCA)倒入半開的培養皿中。培養基的溫度必需控制在44-46℃，其方法如下：若是剛殺菌好的培養基，呈融解的狀態，可置於44-46℃的恆溫水浴或恆溫箱中保溫；若培養基已經凝固，則必需在沸騰的水浴(三角瓶下面要墊一塊紗布或抹布)或蒸汽煮溶至澄清狀態，再如前述方法保溫。倒培養基時，應自培養皿的邊緣小心地倒入，當培養基涵蓋二分之一培養皿面積時即可。隨後將培養皿前後左右輕輕搖動，使均質液和培養基均勻地混合且分佈於整個培養皿內部。將培養皿的蓋子半開，放置約15 min，使均質液和培養基之混合液凝固，且使其表面過多的水分吹走，最後蓋上蓋子。

倒置培養：將上述的培養皿倒放，置於35℃恆溫箱中，培養48 ± 2 hr。倒放培養皿之目的，是使培養基在恆溫培養過程中不致很快變乾，亦可防止空中落菌在培養基上繁殖。

(4) 生菌數之計數

在恆溫培養一天之後，應檢視各培養皿上形成的菌落數目，乃將培養皿倒放於菌落計數器的計數板上或黑色背景的平面上，用油性簽字筆點算菌落數並記錄之。次將培養皿倒置於35℃恆溫箱中，繼續培養一天。在培養二天之後，依前述方法點數並記錄新增的菌落數。將第一天和第二天的菌落數相加，即得該培養皿上的菌落數。其計數要點如下：

- a. 凡由細菌繁殖所形成的菌落，不分大小，都應計數，且應注意長在培養皿邊緣的菌落。
- b. 統計學的原理顯示，每一個培養皿上的菌落數在25-250個時最可靠，故一般是以符合此一條件的培養皿為優先考慮的對象。
- c. 若在 10^{-2} 稀釋倍數(即稀釋100倍)的二個培養皿之平均菌落數為154個，則其生菌數(APC)應寫成 1.5×10^4 CFU/g、mL或 cm^2 ，將小數點後面第二位四捨五入到第一位。
- d. 在相同稀釋倍數的二個培養皿上之生菌數，相差達二倍以上時，要取較少的生菌數，因較多的生菌數可能來自污染。

e. 若二個連續稀釋倍數如 10^{-n} 和 10^{-n-1} 的生菌數都在25-250個時，則檢體的

$$\text{生菌數} = \left[(A+B)/2 \times 10^n + (C+D)/2 \times 10^{n+1} \right] / 2$$

其中，A、B、C和D為個別培養皿上的生菌數，n為某一稀釋倍數的指數，n+1為次一稀釋倍數的指數。

f. 培養基表面太濕時，可能會出現擴散菌落，若其涵蓋的面積不超過培養皿面積的一半，且可數的菌落之分佈很均勻，則以此可數部份依比例估算生菌數。擴散菌落太多時，以SP (spreader) 表示。若菌落數多到難以計數或無法計數時，則以TNTC (too numerous to count) 表示。

g. 若最低稀釋倍數如 10^{-1} 的生菌數少於25個，則寫成<250 CFU/g或mL。

h. 培養皿上的菌落數多於250個時：

若每 1 cm^2 的菌落數少於10個，則計算12-14個 1 cm^2 上的全部菌落(分佈於+或L字樣上者)數目。例如：若13個 1 cm^2 上的菌落數共有5個，則此培養皿上之菌落數為 $5 \times 5 = 25$ 個(因培養皿底皿之內徑為9.1cm，其面積為 $p \times (9.1/2)^2 = 65$ ， $p = 3.1416$)。

若每 1 cm^2 的菌落數多於10個，則計算培養皿上任意4個 1 cm^2 上的全部菌落數目，再乘以16.25，即為培養皿上的菌落數。

i. 有時培養皿上在某(些)菌落的周圍沒有其他菌落形成，或其他菌落看起來有缺失如不成圓形，此乃抑制現象。若抑制範圍超過1/4培養皿面積，則記成NC(無菌落，no colonies)。若菌落的生長受到抑制，則記成GI(生長抑制，growth inhibition)。

j. 有時菌落會相連成串而無法分別計數，則算做1個菌落。若能找到成串菌落的起點時，則以起點數目作為菌落數。

k. 培養皿上的菌落數多於250個或少於25個時，應在其後面加註符號*。例如在 10^{-2} 稀釋倍數的2個培養皿上各有10和14個菌落，其平均菌落數為12，且在較高的稀釋倍數(如 10^{-2} 、 10^{-3})的培養皿上沒有菌落，則其生菌數

$$\text{APC} = 1.2 \times 10^1 \text{ CFU/g 或 mL}^*。$$

檢體 編號	培養皿上的菌落數			生菌數
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	

1	TNTC TNTC	175 208	16 17	190,000 (1.9×10^5)
2	TNTC TNTC	224 245	25 30	250,000 (2.5×10^5)
3	18 14	2 0	0 0	1,600 [*] (1.6×10^3 [*])
4	TNTC TNTC	TNTC TNTC	523 487	5,100,000 [*] (5.1×10^6 [*])
5	TNTC TNTC	245 230	35 SP	290,000 (2.9×10^5)
6	0 0	0 0	0 0	<100 [*] ($<1.0 \times 10^2$ [*])
7	TNTC TNTC	245 278	23 20	260,000 (2.6×10^5)
8	TNTC TNTC	225 255	21 40	270,000 (2.7×10^5)
9	TNTC TNTC	210 240	18 28	230,000 (2.3×10^5)
10	TNTC TNTC	260 230	30 28	270,000 (2.7×10^5)

備註：星號* 表示是估計值。只採用有底線的數字計算生菌數。TNTC表示菌落數太多，明顯地超過 250個，以致於無法(或難以)計算。

(5) 試劑和培養基之配法

a. 磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffer solution)

貯存液(stock solution)

稱取3.4 g磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)，溶於50 mL蒸餾水中。用1N氫氧化鈉(NaOH)調整pH至7.2，倒入100mL定容瓶中，加蒸餾水至刻線而定容之。倒入適當的容器(如玻璃瓶或三角瓶)中，以121 殺菌20min，放冷後貯於4 冰箱中備用。

稀釋液(dilution blank)

亦稱工作液(working solution)。以無菌吸管吸取貯存液1.25 mL至1000 mL定容瓶中，加蒸餾水定容之，倒入1000 mL燒杯中，分裝於小瓶，例如分裝225 mL於均質瓶，90 mL於稀釋瓶，9 mL於稀釋試管。最後以121 殺菌20 min。

b. 生理食鹽水(physiological saline, 0.85 %NaCl)

稱取8.5 g氯化鈉(NaCl)，溶於1000 mL蒸餾水中，調整pH至7.2 \pm 0.2。分裝於小瓶，例如分裝225 mL於均質瓶，90 mL於稀釋瓶，9 mL於稀釋試管。最後以121 殺菌20 min。

c. 消毒用酒精溶液(75%酒精)

若用95%酒精(alcohol)欲配成500 mL的75%酒精溶液，則其用量約為 $(0.75 \times 500)/0.95 = 395$ mL，故可以500 mL量筒量取395 mL的95%酒精，加蒸餾水105 mL ($500 - 395 = 105$)至500 mL刻線，倒入500 mL燒杯中，用玻璃棒攪拌均勻後，裝入試劑瓶或有噴嘴的塑膠製噴霧瓶中備用。

d. 平板計數洋菜培養基(Plate Count Agar, PCA)

使用市售品如Difco、Merck或BBL之產品。稱取23.5 g的PCA和5 g氯化鈉(NaCl)於1000 mL三角瓶中，加入1000 mL的蒸餾水，在水浴中煮沸或蒸煮至澄清狀態而溶化之。為安全及操作方便起見，對於任何的容器，只配約三分之二容積的培養基，例如：在1000 mL三角瓶中，稱入15.7 g PCA，注入667 mL蒸餾水。三角瓶口用二層鋁箔紙密封之，於鋁箔紙上標示PCA，最後用121 殺菌15 min。殺菌完成的PCA，可置於44 46 的恆溫水浴或恆溫箱中，待溫度降到該溫度範圍時即可使用；若非立即使用，或使用後剩很多，則前者以原狀、後者用原來的鋁箔紙密封，置於4 冰箱中貯存，使用前需在水浴中煮沸或蒸煮至澄清狀態，再如前述保溫於44 46 的水浴或恆溫箱中備用。

肆. 大腸菌群和糞便大腸菌群之檢查

1. 意義和目的

大腸菌群(coliforms) 或總大腸菌群(total coliforms)是指一群革蘭氏陰性、好氣性及通性嫌氣性、非孢子形成的桿菌之總稱；在膽汁(bile)的存在下，於35 培養24 48 hr，能將乳糖發酵產生氫和二氧化碳。包括糞便大腸菌群(fecal coliform)和非糞便大腸菌群(non-fecal coliform)，如Escherichia coli、Enterobacter aerogenes、Enterobacter cloacae、Klebsiella pneumoniae等細菌。

大腸菌群通常存在於人類及其他哺乳動物的腸道中，隨糞便排出體外；亦分佈於水、土壤、牛乳和穀類中。加工過的食物若檢出大腸菌群，表示加工處理不當，但不一定受到糞便污染。由於大腸菌群在水中的殘存時間相當長，故可知早期或近期的污染，是一種有用的污染指標(indicator)。

糞便大腸菌群為大腸菌群中，於45.5 的大腸桿菌肉羹(EC broth)中仍能生長者，含有較多的大腸桿菌。食品若檢出糞便大腸菌群，表示該食品已受到糞便污染，故也是一種有用的污染指標。

因此，在飲用水和食物中，若檢出這二種菌群，即表示其已不衛生。我國食品類衛生標準規定：不需調理即可供食用之一般食品、生食用魚介類和冷凍生食用魚介類之大腸菌群檢查結果應為陰性，即不得檢出；在需經調理始可供食用的一般食品和冷凍鮮魚介類不得檢出大腸桿菌，但是生食用牡蠣和冷凍生食用牡蠣則允許每一百公克中大腸桿菌的最確數(most probable number, MPN)在230個以下。

美國國家貝類衛生計畫(The National Shellfish Program, NSSP) 依大腸菌群的最確數將貝類養殖區分成四種：

- a. 准許養殖區：在100 mL海水中，大腸菌群的最確數不超過70個且不得有10%以上的樣品超過230個。
- b. 有條件的准許養殖區：直接或間接受到陸上廢水處理場所排放的廢水之影響，而有間歇性的污染，以致有時無法達到准許養殖區之標準者。
- c. 限制養殖區：在100 mL海水中，大腸菌群的最確數為70 700個者，貝類需經淨化處理才能銷售。
- d. 禁止養殖區：在100 mL海水中，大腸菌群的最確數超過700個者。

有鑑於目前魚市場魚貨品質衛生檢驗室的人力、設備和需要之狀況，本講義中將大腸桿菌檢查方法予以省略，爾後在檢驗技術普遍提昇且人力能夠配合的情況下，再作進一步的介紹和訓練。

2.大腸菌群和糞便大腸菌群檢查之流程

25 g檢體
+

225 mL生理食鹽水(或磷酸鹽緩衝溶液)
(均質化)

10^{-1} 稀釋倍數均質液

以生理食鹽水(或磷酸鹽緩衝溶液)作成 10^{-2} 、 10^{-3}一系列稀釋倍數均質液

取各稀釋倍數均質液注入有醱酵管的10 mL LST broth試管(各三支)
(35 ,48 hr)

產生氣體者推定為大腸菌群陽性

自產氣試管取一白金耳接種於BGLB broth (附醱酵管)	產氣試管取一白金耳接種於EC broth (附醱酵管)
35 ,48hr, 產生氣體者確認為大腸菌群陽性，計算MPN	45.5 水浴, 24 48 hr, 產生氣體者確認為糞便大腸菌群陽性，計算MPN

3.大腸菌群和糞便大腸菌群檢查之說明

(1)採樣方法：見生菌數測定之說明(1)。

(2)檢體(魚介類均質液)之調製：見生菌數測定之說明(2)。

(3)培養基之配法

a.月桂酸硫酸鹽胰化蛋白 肉羹(LST broth, lauryl sulfate tryptose broth)

組成：胰化蛋白 (tryptose) 20 g

乳糖(lactose) 5 g

磷酸氫二鉀(K_2HPO_4) 2.75 g

磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) 2.75 g

氯化鈉(NaCl) 5 g

月桂酸硫酸鈉(sodium lauryl sulfate) 0.1 g

蒸餾水 1000 mL

配法：加熱溶解後，分取9 mL注入裝有發酵管的試管內，以121 滅菌15 min，最終pH值為6.8 ±0.2。

b. 煌綠乳糖膽汁肉羹(BGLB broth, brilliant green lactose bile broth, 2%)

組成：蛋白 (peptone) 10 g
 乳糖 (lactose) 10 g
 牛膽粉 (oxgall powder) 20 g
 煌綠試劑 (brilliant green) 0.0133 g
 蒸餾水 1000 mL

配法：加熱溶解後，分取9 mL注入裝有發酵管的試管內，以121 滅菌15 min，最終pH值為7.2 ±0.2。

c. 大腸桿菌肉羹(EC broth, Escherichia coli broth)

組成：胰化蛋白 (tryptone) 20 g
 乳糖 (lactose) 5 g
 磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 4 g
 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 1.5 g
 氯化鈉 (NaCl) 5 g
 膽汁鹽 (bile salt no.3) 1.5 g
 蒸餾水 1000 mL

配法：加熱溶解後，分取9 mL注入裝有發酵管的試管內，以121 滅菌15 min，最終pH值為6.9 ±0.1。

(4) 檢查原理和注意事項

a. 本實驗中，不論是在35 或45.5 之培養，宜將試管及試管架放進恆溫水浴槽中，因其溫度比一般恆溫箱穩定得多。

b. 發酵管必須先倒置於試管中，再注入培養基(LST broth、BGLB broth或EC broth)。殺菌前，稍微旋開試管蓋，以利殺菌時發酵管內的空氣之排出。殺菌完成後，立刻旋緊試管蓋；若發酵管內還有空氣存在，則只需將試管上下顛倒數次，即可將空氣趕出。

c. LST broth是一種選擇性增菌培養基，它所含的lauryl sulfate(月桂酸硫酸鹽)可讓大腸菌群選擇性地發育，而2% tryptose(胰化蛋白)則能促進對數增殖期初期之繁殖速度，且其他成分亦能使大腸菌群在很短的時間內產生大量的氣體。

d. BGLB broth (煌綠乳糖膽汁肉羹) 所含的膽汁鹽 (bile salt)和煌綠試劑(brilliant green)具有表面活性化之作用，能抑制非大腸菌群的細菌之生長。

e. EC broth(大腸桿菌肉羹) 中含有膽汁鹽，故能抑制非大腸菌群的細菌之生長。培養溫度45.5 能抑制孢子形成菌和糞便鏈球菌 (fecal streptococci)之生長；水浴槽中的水必須能夠循環，水面必須超過試管中菌培養液之高度，以維持菌培養液於穩定的溫度下培養，不要用一般的恒溫箱，因它的溫度控制較差。

f.三管式最確數表和計算實例：

A	B	A	B	A	B	A	B
0-0-0	0	1-0-0	3.6	2-0-0	9.1	3-0-0	23
0-0-1	3.0	1-0-1	7.2	2-0-1	14	3-0-1	39
0-0-2	6.0	1-0-2	11	2-0-2	20	3-0-2	64
0-0-3	9.0	1-0-3	15	2-0-3	26	3-0-3	95
0-1-0	3.0	1-1-0	7.3	2-1-0	15	3-1-0	43
0-1-1	6.1	1-1-1	11	2-1-1	20	3-1-1	75
0-1-2	9.2	1-1-2	15	2-1-2	27	3-1-2	120
0-1-3	12	1-1-3	19	2-1-3	34	3-1-3	160
0-2-0	6.2	1-2-0	11	2-2-0	21	3-2-0	93
0-2-1	9.3	1-2-1	15	2-2-1	28	3-2-1	150
0-2-2	12	1-2-2	20	2-2-2	35	3-2-2	210
0-2-3	16	1-2-3	24	2-2-3	42	3-2-3	290
0-3-0	9.4	1-3-0	16	2-3-0	29	3-3-0	240
0-3-1	13	1-3-1	20	2-3-1	36	3-3-1	460
0-3-2	16	1-3-2	24	2-3-2	44	3-3-2	1100
0-3-3	19	1-3-3	29	2-3-3	53	3-3-3	2400

A：表示在三個連續10倍稀釋倍數的均質液中，每100 mL各含有魚介肉10 g、1 g和0.1 g，在LST broth試驗中分別做三支試管，產生氣體者為推定試驗陽性，將這些陽性試管分別取一白金耳菌培養液於BGLB broth 或EC broth中，若仍產生氣體者為大腸菌群或糞便大腸菌群確認試驗陽性，由此可知各10倍稀釋倍數之陽性試管數，例如陽性試管組合1-2-3，表示在 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 倍稀

釋倍數均質液所對應的LST broth試驗中，分別有1、2和3支試管呈陽性反應。

B：表示用統計學原理計算出來的各種陽性試管組合之最確數，固態檢體可以MPN/100 g或MPN/g表示，液態檢體則可以MPN/100 mL或MPN/mL表示。以陽性試管組合1-2-3為例，表示在100 g或100 mL檢體中，大腸菌群或糞便大腸菌群之最確數為24，計算時應乘以中間稀釋倍數(100倍)，其計算式為 $24 \times 100 \text{ MPN}/100 \text{ g} = 2400 \text{ MPN}/100 \text{ g}$ 或 $24 \times 100 \text{ MPN}/100 \text{ mL} = 2400 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$ 。若以MPN/g或MPN/mL表示時，於本實例中，可以寫成24 MPN/g或24 MPN/mL。

若以 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 倍稀釋倍數均質液查表得到的最確數，應再乘以10，故檢體所含大腸菌群或糞便大腸菌群之最確數為24000 MPN/100 g或240000 MPN/100 mL，亦可寫成240 MPN/g或240 MPN/mL。

三管式最確數計算實例

實例	檢體的稀釋倍數					陽性試管組合	MPN/g(或MPN/mL)
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
一	3/3*	3/3	1/3	0/3	0/3	3-3-1	46
二	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3	3-2-1	150
三	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3	3-2-0	9.3
四	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3	2-2-0	2.1
五	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	210
六	3/3	2/3	0/3	1/3	0/3	3-2-1	15

* 分子表示陽性反應試管數，分母為接種的試管數。由陽性試管組合查三管式最確數表所得之值乘以中間的稀釋倍數，為其MPN/100 g或MPN/100 mL。

伍. 微生物檢測用器材(CNS總號10890類號N6186)

乾熱滅菌器：玻璃用具等之滅菌用。常用溫度170，時間至少1 hr。

高壓滅菌釜：不能乾熱滅菌的培養基和稀釋液等器材之滅菌用。常用溫度121，時間至少15 min。

冰箱：0-5。用以保存檢體、培養基和菌株等。

吸管：常用1 mL、5 mL和10 mL的自動吸管或玻璃製吸管。用以吸取液態檢體、試液或培養基等。

培養皿：內徑約9 cm，深度1.5～1.8 cm，底皿內外表面應平坦，無氣泡或刮傷等缺點。塑膠製或玻璃製。

稀釋用容器：附蓋或栓之500 mL廣口瓶或15X150 mm試管。

培養箱：能維持內部溫度差在 ± 0.1 者。

水浴槽：能維持水溫溫度差在 ± 0.1 者。

攪拌均質器：能適用於無菌操作者。

發酵管：外徑9 x 22 mm、一端密封之玻璃管，使用時能倒置於試管內。

白金針(絲)或白金耳：菌株接種用。

菌落計數器：適用於菌落之計算者。

陸. 微生物實驗殺菌方法

1. 玻璃器具之殺菌

燒杯、三角瓶和玻璃製培養皿等應先洗淨、晾乾，燒杯和三角瓶用鋁箔紙封住開口處，放進乾熱殺菌釜中，以170℃殺菌30 min以上；玻璃製培養皿直接放進不銹鋼製容器中，以170℃殺菌2 hr以上。殺菌完成後，先關掉電源，待溫度下降到90℃以下，打開釜門，雙手戴上棉質手套取出之。

2. 培養基之殺菌

含洋菜(agar)的培養基，若用燒杯或三角瓶配製，則在配好後，要用雙層鋁箔紙封住開口處，在水浴中加熱或蒸煮，直到液體完全透明為止。欲配的培養基，其量宜在所用容器的容積的三分之二以下，溶解後可分裝於較小的容器中。殺菌時，容器或試管不可完全密封。一般用121℃蒸汽殺菌15 min。殺菌完成後，需待釜溫下降到90℃以下，且釜壓降到0 kg/cm²，打開釜門，雙手戴上棉質手套取出之。

3. 無菌操作台之殺菌

先用95%酒精擦拭或噴灑無菌操作台之內部，包括最外層的濾網、台頂、台面和兩側的玻璃板，3 min後，依序打開電源、送風機和紫外燈，10-20 min後，關掉紫外燈，即可進行實驗。實驗結束後，要用95%酒精擦拭台面。最好用黑色的布覆蓋兩側玻璃板和台前，以防灰塵污染。

4. 手的消毒

在實驗前後，要用75%酒精擦拭或噴灑雙手。

5. 殺菌釜之操作方法

a. 半自動殺菌釜：先檢查使用電壓和電源電壓(110V或220V)。加水到釜內或水箱中，水位應在加熱器之上，然後放進欲殺菌之培養基或器具，以對角方式栓緊釜門，關掉排氣閥，開啟電源。當釜壓達 0.5 kg/cm^2 時，稍稍鬆開排氣閥。當釜溫達 121°C (釜壓約 $1.1-1.2 \text{ kg/cm}^2$)後，設定殺菌時間(如15 min)。殺菌完成後，先關掉電源，待釜壓歸零(0 kg/cm^2)，釜溫在 90°C 以下，才可打開釜門，雙手戴上棉質手套取出培養基器具。釜內應保持清潔。

b. 全自動殺菌釜：其操作步驟與半自動殺菌釜相似，即檢查電壓、加水到釜內、放進欲殺菌物品、栓緊釜門、關排氣閥、設定殺菌溫度和時間、開電源。殺菌完成後，關電源、釜壓歸零、釜溫 90°C 以下、打開釜門、戴棉質手套取出物品。這種殺菌釜會自動排氣。釜內亦應隨時保持清潔。