

比較臺灣公告腸桿菌科之直接平板檢驗法與臺灣之大腸桿菌群 MPN 法及中國大陸國標大腸桿菌群直接平板法的檢測效能

林宜瑩¹，歐柏廷²，蔡文城²⁻⁴

天主教輔仁大學食品科學系，新北市¹；台美檢驗科技有限公司，新北市²；國立陽明大學微生物及免疫學研究所³，
食品安全及健康風險評估研究所⁴，台北市，台灣

摘要

大腸桿菌群(coliform)多存在於溫血動物之糞便、人類活動之場所及有糞便污染的地方，常被作為食品被糞便污染之指標。近年來，ISO 機構提出以腸桿菌科傾注平板檢驗方法取代大部分食品的大腸桿菌群 MPN 法作為衛生指標菌，而台灣衛福部食品藥物管理署亦於 2018 年 8 月公告腸桿菌科檢驗方法之草案。為了評估新公告之草案與其它兩種大腸桿菌群檢驗方法（臺灣之大腸桿菌群 MPN 法及中國大陸國標大腸桿菌群直接平板法）之效能，本研究利用 15 件手搖飲料檢體及 2 件標準菌種的對照組進行三種方法檢驗結果的比較。利用不同稀釋濃度的檢液及培養基等進行評估，培養 24 小時後，計數及接續進一步鑑定。結果發現其中有 5 個檢體為未檢出和 2 件陽性飲料檢體 MPN 法超過 1,100 MPN/g，因此，不能作為比較之用，本研究以介於未檢出及大量檢出中間的 8 件陽性檢體進行生長的菌數多寡比較，結果指出以新公告腸桿菌科草案所獲得的腸桿菌科菌數比其它兩種大腸桿菌群方法所獲得的菌數高，此說明衛福部新公告方法作為衛生指標菌有其意義及重要性。另外，本研究發現市售手搖飲料大腸桿菌群或腸桿菌科衛生指標菌檢測不合格率高達 66.7% (10/15)，值得衛生主管單位作為稽核及加強從業人員衛生教育的參考。

關鍵字：腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)、大腸桿菌群、MPN 法、衛生指標菌

前言

腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)是指在適當條件下發酵葡萄糖產酸、氧化酶陰性的需氧或兼性厭氧革蘭氏陰性無芽孢桿菌。細菌學上將腸桿菌科的細菌分為 20 個菌屬，包括 *Escherichia* (埃希氏菌)、*Shigella* (志賀氏菌)、*Salmonella* (沙門氏菌)、*Citrobacter* (檸檬酸桿菌)、*Klebsiella* (克雷伯氏菌)、

Enterobacter (腸桿菌)、*Serratia* (沙雷氏菌)、*Hafnia* (哈夫尼氏菌)、*Edwardsiella* (愛德華氏菌)、*Providencia* (普羅威登斯氏菌)、*Proteus* (變形桿菌)、*Morganella* (摩根氏菌)、*Yersinia* (耶爾森氏菌)等^[1]。

大腸桿菌群(coliform)並非指特定菌株，而是指一群在人體腸胃道內有相同生理活性的菌群。在細菌學上的意義為一群好氧或兼性厭氧且能在 37°C 下分解乳糖產酸產氣的革蘭氏陰性無芽孢桿菌，主要包括檸檬酸桿菌(*Citrobacter*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、腸桿菌(*Enterobacter*)、大腸桿菌(*Escherichia*)

通訊地址：台美檢驗科技有限公司

24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城

電話：886-(02)2298-1887

E-mail address：wctsai@superlab.com.tw

coli)；但不包括非乳糖發酵型的食品病原菌（例如：沙門氏菌、志賀氏菌、變形桿菌等），因此不夠明確表示出食品加工後的衛生狀況^[1]。

長久以來，食品衛生中以指標菌作為食品安全及品質的標準。當無法檢測食品中每種有害微生物時，只針對某些特定指標菌作為是否合乎衛生要求之指標，如：總生菌數、大腸桿菌群、大腸桿菌。目前台灣檢驗大腸桿菌群使用的MPN法只是估計值，並不是很精確，且大腸桿菌群只能檢測乳糖發酵型食品病原菌。

2018年8月衛福部提出腸桿菌科的檢驗方法草案，因為腸桿菌科包括所有能夠發酵葡萄糖產酸、氧化酶陰性的革蘭氏陰性無芽孢桿菌，涵蓋的種類較大腸桿菌群為多，也包括了病原菌，除了大腸桿菌群的乳糖發酵型細菌，還包含許多非乳糖發酵型細菌（如變形桿菌及其它相近菌種），能夠確切呈現較實際的污染程度^[1]。

本研究主要目的是將台灣腸桿菌科直接平板檢驗方法草案與大腸桿菌群MPN法、大陸國標大腸桿菌群直接平板檢驗方法做比較，想瞭解市售飲料中大腸桿菌群及腸桿菌科的偵測以不同方法及培養基進行，產生之數據會有何差異。

材料及方法

試驗材料

本研究主要是初步評估2018年8月1號衛生局福利部食品藥物管理署訂定之腸桿菌科檢驗方法草案與原先公告的大腸桿菌群MPN法、大陸國標大腸桿菌群檢驗方法這三者的效能差異，共檢測15件檢體，均為手搖飲料。

試劑與耗材

根據台灣公告大腸桿菌群MPN法、腸桿

菌科直接平板檢驗、大陸國標大腸桿菌群直接平板檢驗所需的稀釋液（磷酸緩衝溶液、緩衝蛋白胍水）、選擇性增菌液(Lauryl sulfate tryptose broth、brilliant green lactose bile broth)、選擇性分離培養基(VRBGA、VRBA)及滋養培養基(Blood agar plate, BAP)皆購自啟新生物科技有限公司（新北市，台灣）。培養基均經無菌性試驗與培養基效能（即滋養性、增菌性、選擇性與區分性相關效能）試驗確認品質。

菌株製備

本研究的品管對照菌株為 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 及 *Escherichia coli* ATCC 25922 作為培養基效能測試的對照組菌種，將兩菌株接種至 BAP 培養於 35±1℃ 一般培養箱中 18~24 小時，之後接種第二次達到生化/生理特性的活化效果。

菌液製備

將欲得到預估菌量的菌液滴至無菌培養皿進行傾注平板法作為基準，首先以接種環挑取活化後之菌株於 0.85% 之 5 mL TSB 中調整菌液濃度至相當 McFarland no. 0.5 標準液，以分光光度計測量 *Enterobacter cloacae* 及 *Escherichia coli* 之 OD 值分別為 0.082 及 0.088，再從菌液使用吸管取 1 mL 菌液加入 9 mL 滅菌飲料進行序列稀釋至 10⁶ 倍，隨後進行效能比較試驗。

台灣公告之大腸桿菌群MPN法^[2]：此方法是檢體經序列稀釋後，以三階三管進行培養，並進行 MPN 計數。操作時，秤取 50 g 飲料檢體加入 450 mL 磷酸緩衝溶液(Phosphate buffer, pH 7.2)，即為 10 倍稀釋液。再以 90 mL 磷酸緩衝溶液進行 10 倍序列稀釋後，分別吸取 1 mL 稀釋液(1:10, 1:100 及 1:1,000) 注入裝有發酵管的 Lauryl sulfate tryptose broth (LST)各三支，在 35℃ 一般培養箱培養

24~48 小時後，若發酵管內有氣體產生則為大腸桿菌群推定陽性。自陽性試管內取一接種環液體至 brilliant green lactose bile broth (BGLB)，在 35°C 一般培養箱培養 24~48 小時後，產氣者為大腸桿菌群陽性，計算 BGLB 陽性反應試管數，查 MPN 表，最後計算大腸桿菌群之最確數，以 MPN/g 表示。

台灣公告腸桿菌科直接平板檢驗法^[3]：檢體經系列稀釋後，以傾注選擇性平板培養基培養及計數之方法。秤取 50 g 飲料檢體加入 450 mL 緩衝蛋白胨水(BPW)，即為 10 倍稀釋液。再以 90 mL 緩衝蛋白胨水進行 10 倍序列稀釋後。取 1 mL 稀釋檢液至無菌培養皿，二重複，再倒入 10~15 mL 的 violet red bile glucose agar (VRBGA)，以 8 字方式搖勻，將培養基與檢液充分混勻，待培養基凝固後，再加 3~4 mL VRBGA 覆蓋平板表層，防止蔓延生長並使菌落特徵更為明顯。然後將凝固後的平板置於 37°C 一般培養箱，倒置培養 24±2 小時後，計數平板上菌數量（計數介於 15~150 菌落數）。典型菌落為有或無沉澱環的粉紅色至紅色或紫色菌落。從 VRBGA 平板上至少挑取 5 個（少於 5 個全選）典型菌落進行確認。其方式為分別將所挑選的每一個菌落，四區劃線於 BAP，置於 37°C 一般培養箱，倒置培養 24±2 小時後，挑取單一菌落進行 MALDI-TOF MS 的鑑定。

大陸國標大腸桿菌群直接平板檢驗法^[4]：檢體經系列稀釋後，以傾注選擇性平板培養基培養及計數之方法。取 50 g 飲料檢體，其無菌稀釋液及稀釋方法與台灣 MPN 法相同。取 1 mL 稀釋檢液至無菌培養皿，二重複，再倒入 15~20 mL 的 violet red bile agar (VRBA)，8 字搖勻，將培養基與檢液充分混勻，待培養基凝固後，再加 3~4 mL VRBA 覆蓋平板表層。然後將凝固後的平板置於 36±1°C 一般培養箱，倒置培養 18~24 小時後，計數平板上菌數量（計數介於 15~150 菌

落數）。典型菌落為紫紅色，菌落周圍有紅色膽鹽沉澱環，菌落直徑為 0.5 mm 或更大。從 VRBA 平板上挑取 10 個不同類型的典型和可疑菌落，少於 10 個菌落時，則挑取全部典型和可疑菌落。分別移種於 BGLB，在 36±1°C 的一般培養箱培養 24~48 小時後，產氣者為大腸桿菌群陽性。

MALDI-TOF MS 鑑定腸桿菌科^[5]

選取 MSP 96 凹槽靶板(96-wells target plate)的一個凹槽滴加 Bruker 細菌測試標準(bacterial test standard)，風乾後即可進行 Microflex LT 儀器校正，然後分別以滅菌牙籤挑取適量的預檢測菌落到 MSP 96 靶板的各個測試凹槽上，待乾燥，將測試凹槽以 1 μL 的 70% formic acid（甲酸）(Sigma, USA) 覆蓋後，乾燥，最後滴加 1 μL saturated α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix 溶液〔配製方法為取 0.0025 g 的 α-cyano-4-hydroxycinnamic (Sigma, USA)，加至 250 μL 的標準溶液〔內含 50% acetonitrile (J. T. Baker, USA)，47.5% 純水及 2.5% trifluoroacetic acid〕(Sigma, USA)，配製及保存時需避光〕覆蓋，乾燥後，便可置入 MALDI-TOF MS 的儀器中開始偵測。產生質譜菌屬及菌種個別專一性高峰(peaks)能提供獨一無二型式圖譜(profile)，質譜分析是一種測量離子荷質比（電荷-質量比）的分析方法，電腦的軟體(software)將產生的質譜與軟體中參考質譜的資料庫相比較，得到關係最近微生物的名單，依分數(score)大小排序(numeric rankings)。MALDI-TOF MS 檢驗結果，每個樣品會提供 10 個高分鑑定結果，鑑定結果第一名分數大於 2.0，且第一名等於第二名，則鑑定可信程度至「菌種」。鑑定出的分數小於 2.0，但高於 1.7，則鑑定可信程度至「菌屬」，以此標準分析鑑定結果。

結 果

檢測 15 件飲料檢體及兩組對照組進行台灣公告大腸桿菌群 MPN 法、腸桿菌科直接平板檢驗方法與大陸國標大腸桿菌群直接平板檢驗方法後，若呈陽性，則取 15-150 CFU 計數範圍內之培養基進行計數（圖 1），並分別取 5 個或 10 個可疑菌落進行純化，再進行

MALDI-TOF MS 確證，最後代入公式計算。

15 件檢體中扣除三種方法均未檢出的 5 件檢體以及 2 件 MPN 法超過 1,100 MPN/g，因此，不能作為比較之用，本研究以介於未檢出及大量檢出中間的 8 件陽性檢體進行 3 種方法測試結果的比較，結果如表 1。又本研究另外發現手搖飲料以三種方法檢驗之衛生不合格率均高達 66.7%（10/15）。

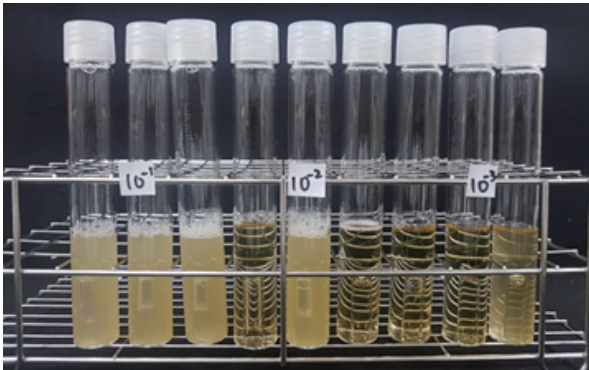
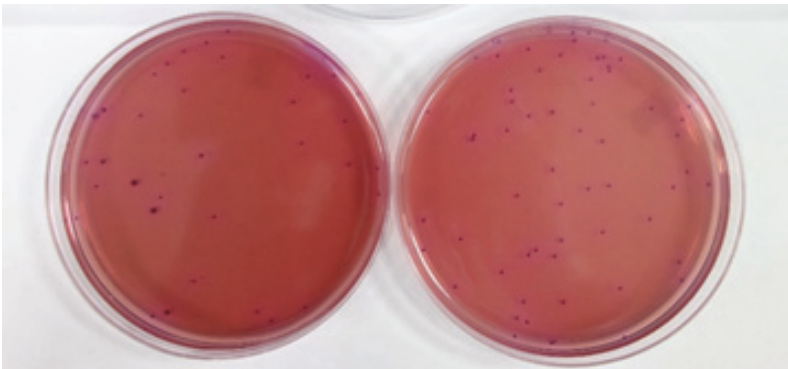
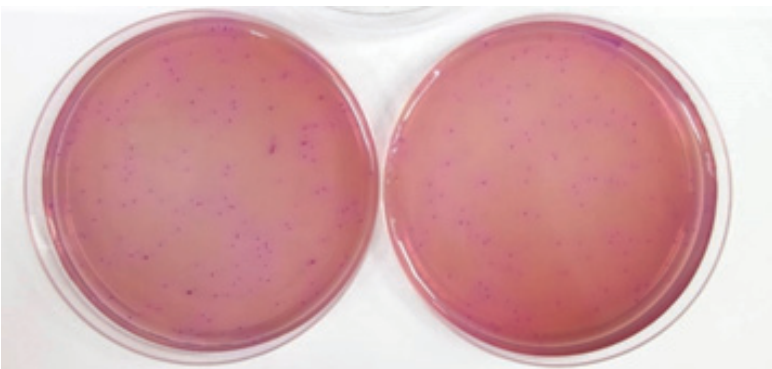
台灣公告大腸桿菌群 MPN 法 (43 MPN/g)	
大陸國標大腸桿菌群 直接平板檢驗方法 (4.9×10^2 CFU/g)	
台灣公告腸桿菌科直 接平板檢驗方法 (9.6×10^2 CFU/g)	

圖 1. 以飲料檢體 8 之 1:100 稀釋為例，台灣公告腸桿菌科直接平板檢驗方法與台灣公告大腸桿菌群 MPN 法和大陸國標大腸桿菌群直接平板檢驗方法之生長菌數的比較

表 1. 台灣公告大腸桿菌群 MPN 法、腸桿菌科直接平板檢驗方法及大陸國標大腸桿菌群直接平板檢驗方法之效能比較

樣品編號	方 法		
	台灣公告 大腸桿菌群 MPN 法 (95%信賴界限)	大陸大腸桿菌群 直接平板檢驗方法	台灣公告腸桿菌科直接 平板檢驗方法
1	43 MPN/g (9~180 CFU)	4.0×10^2 CFU/g	4.5×10^2 CFU/g
2	23 MPN/g (4.6~94 CFU)	5.0×10^3 CFU/g	1.2×10^4 CFU/g
3	2.4×10^2 MPN/g (42~1,000 CFU)	1.9×10^2 CFU/g	2.2×10^2 CFU/g
4	43 MPN/g (9~180 CFU)	1.8×10^2 CFU/g	3.4×10^2 CFU/g
5	93 MPN/g (18~420 CFU)	3.0×10^3 CFU/g	1.5×10^4 CFU/g
6	43 MPN/g (9~180 CFU)	3.6×10^2 CFU/g	1.0×10^3 CFU/g
7	150 MPN/g (37~420 CFU)	4.2×10^3 CFU/g	8.9×10^3 CFU/g
8	43 MPN/g (9~180 CFU)	4.9×10^2 CFU/g	9.6×10^2 CFU/g
菌液 ATCC13047	$> 1.1 \times 10^7$ MPN/g	6.4×10^7 CFU/mL	7.4×10^7 CFU/mL
菌液 ATCC25922	$> 1.1 \times 10^7$ MPN/g	8.1×10^7 CFU/mL	8.2×10^7 CFU/mL

討 論

檢體的成分不同，可能會影響方法之效能，因此需要額外做一組對照組。標準菌株之預估菌量為 1.5×10^8 CFU/mL，在三種方法下檢測到的菌量皆約為 10^7 CFU/mL，由此可看出無明顯差異，而 MPN 法中無法得到準確菌數。本研究所使用的檢體 11~15 皆無陽性產氣管及菌落生長，因此取無菌之飲料

後作為調菌基質，進行對照組之確認。檢體 1、檢體 3、檢體 4 及檢體 8 在大陸國標大腸桿菌群、台灣腸桿菌科之方法中菌數皆落在 10^2 CFU/g，但在 MPN 法只偵測到 43 MPN/g（95%信賴區間為 9~180 CFU），由此可看出 MPN 法檢出的菌數比其他兩種方法低。另外，檢體 2、檢體 5、檢體 6 及檢體 7 之檢出菌數以台灣腸桿菌科方法最高，其次為大陸國標大腸桿菌群，而以 MPN 法最低。

台灣腸桿菌科檢驗方法偵測之菌數最多，是因腸桿菌科包含 42 個菌屬，涵蓋範圍大，其中就包含衛生指標菌及常見病原菌，例如大腸桿菌、沙門氏菌、志賀氏菌、阪崎腸桿菌等。此方法中所使用的 VRBGA（結晶紫中性紅膽鹽葡萄糖瓊脂）組成分中含有乳糖和葡萄糖，因此，VRBGA 適用於所有腸桿菌科菌種的分離。大陸大腸桿菌群檢驗方法所使用的 VRBA（結晶紫中性紅膽鹽瓊脂）與 VRBGA 之組成分有些微差異，VRBA 僅含有乳糖，適用於乳糖發酵型細菌的分離。因此此方法能偵測到之菌數會比腸桿菌科還要少。

最後，MPN 法屬於半定量法，透過大腸桿菌群之生理功能判斷此菌的存在及數量，判讀後，查 MPN 表，推算出來的數據僅為統計估計值，有其信賴區間，但無法得到準確之數據。若要以 MPN 法與直接平板法做比較，以直接平板法所獲得的菌數較高，且在 24 小時內可獲得結果。

根據 MALDI-TOF MS 確證之結果，發現 VRBA 中可生長之菌種包含 *Rahnella aquatilis*、*Pantoea agglomerans*、*Enterobacter asburiae*、*Klebsiella oxytoca*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia plymuthica*、*Erwinia persicina*、*Ewingella americana*、*Bacillus clausii*，其中 *Bacillus clausii* 屬於芽孢桿菌科，主要是因為其可利用乳糖發酵產生乳酸，因此可在 VRBA 生長。而 VRBGA 除了上述菌種以外，還鑑定出葡萄糖非發酵菌中的 *Achromobacter xylosoxidans*，此可能是因為此菌可氧化利用葡萄糖之故。由此可知，VRBA 及 VRBGA 除了大腸桿菌群及腸桿菌科可生長外，也可能會有其他菌種生長。

中國國標中腸桿菌科檢驗方法可分成 MPN 法及傾注平板法，ISO 另外公告食品之腸桿菌科檢驗法以直接平板法取代 MPN 法後，許多國家隨後跟進訂定相關公告方法，

台灣於 2018 年 8 月也提出草案。各國皆以直接平板法為主要之食品衛生指標菌，但可能是因為 MPN 法過程繁瑣，從採樣至最終報告所需時間較長，因此台灣之腸桿菌科檢驗方法僅公告直接平板法，而沒有 MPN 法。

本研究發現手搖飲料以三種衛生指標菌檢測方法檢驗的結果，衛生不合格率高達 66.7% (10/15)，然而，其中 60% (6/10) 的大腸桿菌群菌數低於 100 MPN/g(mL)，若以 Petrifilm *E. coli*/coliform count plate 檢測，將僅能檢測 22.7%^[6]。

綜合上述結果，15 件檢體中以台灣衛福部公告腸桿菌科之直接平板法效能最佳（獲得菌數最高），因為培養基之成分可供較多革蘭氏陰性菌、葡萄糖發酵型細菌生長，而大陸國標大腸桿菌群之直接平板法所使用的培養基成分僅限於乳糖發酵菌的生長，因此生長的菌種較少，最後 MPN 法若是大腸桿菌群菌量過多的情況下，將無法準確得知其菌量。

參考文獻

1. 徐進，龐璐。食品安全微生物學指示菌國內外標準應用的比較分析。中國食品衛生雜誌。2011; 23:472-7。
2. 行政院衛生福利部食品藥物署。食品微生物之檢驗方法 - 大腸桿菌群之檢驗。部授食字第 1021950329 號公告修正。2013。行政院衛生福利部食品藥物管理署，台灣。
3. 行政院衛生福利部食品藥物署。食品微生物之檢驗方法 - 腸桿菌科之檢驗。衛授食字第 1071901433 號預告訂定。2018。行政院衛生福利部食品藥物管理署，台灣。
4. 中華人民共和國衛生部。食品安全國家標準食品微生物學檢驗:大腸菌群計數。2016:GB 4789.3。
5. 黃品瑜，陳羿樺，蔡文城。基質輔助雷射脫附遊離飛行質譜儀(MALDI-TOF MS)對退伍軍人菌的鑑定效能，檢驗及品保雜誌。2017; 6:51-62。
6. 張玉芝，蔡岳廷，林冠慧，蔡文城。以 CNS 方法與 Petrifilm 偵測食品中 Coliform (大腸桿菌群) 及 *Escherichia coli* (大腸桿菌) 之比較。檢驗及品保雜誌。2012; 1:87-91。

Comparison of the Newly Published Enterobacteriaceae Direct Plate Test with the Coliform MPN and Direct Plate Methods for Detection of Hygiene Indicator Bacteria in Food

Yi-Ying Lin¹, Po-Ting Ou², Wen-cherng Tsai²⁻⁴

¹Department of Food Science, Fu Jen Catholic University, New Taipei City ; ²Super Laboratory Ltd., New Taipei City ; ³Institute of Microbiology and Immunology, and ⁴Institute of Food Safety and Health Risk Assessment, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

Coliform bacteria (including *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Citrobacter*) are present in the feces of warm-blooded animals, places where there are human activities, and places where fecal contamination is common. The presence of coliform bacteria in food is a hygiene indicator of fecal contamination. In Taiwan, the commonly used method for the detection and enumeration of coliform bacteria is the MPN (most probable number) test as recommended by the Taiwan Bureau of Food and Drug Administration (TFDA). In China, two methods are used. The first one is the same MPN test as the one used in Taiwan. The second one is the direct plate method (DPM). The ISO (International Organization for Standardization) has recently proposed the use of the Enterobacteriaceae direct plate method to replace the MPN method. In August 2018, the TFDA announced a new method for detection of enteric bacteria based on the Enterobacteriaceae direct plate method of ISO. To compare the effectiveness

of the new TFDA method with that of the other two methods (MPN and DPM), we examined 15 cold drink specimens and 2 standard coliform control strains. The specimens were serially diluted and cultured with the 3 different methods. At 24 hours after inoculation, coliform colonies on VRBA (violet red bile agar) and Enterobacteriaceae on VRBGA (violet red bile glucose agar) plates were enumerated. Five of the 15 samples showed negative results with all 3 methods. Two samples had more than 1,100 MPN/g of coliform bacteria. For the remaining 8 samples, the newly published TFDA Enterobacteriaceae method detected higher number of bacteria than the other 2 methods (MPN and DPM). Results of this study also indicated that 66.7% (10/15) of the cold drinks were unsatisfactory in food safety.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, coliforms, MPN method, hygiene indicator organisms