

經濟部 94 年度
研究發展專題

食品中大腸桿菌群快速檢測方法探討

報告編號：94019

經 濟 部 編 印

中華民國 94 年 12 月 31 日

經濟部標準檢驗局九十四年度研究報告提要表

填表人：許元馨、胡奇琪

填表時間：94 年 12 月

題 目	食品中大腸桿菌群快速檢測方法探討		
單位人員	花蓮分局第三課： 許元馨、胡奇琪	時 間	自 94 年 01 月 至 94 年 12 月
內 容 提 要			

本研究試驗主要目的，係探討酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法檢驗食品中大腸桿菌群含量，與中華民國國家標準(CNS10984)多管醱酵法做比較，以評估酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法之可行性。

在研究過程中購買坊間乳品類、肉類、飲料類、冷凍食品、飲用水等計 42 件食品，同時以酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法和中華民國國家標準(CNS10984)多管醱酵法，檢驗食品中大腸桿菌群含量，並分別將其檢驗結果取對數值後利用 Excel 套裝軟體進行統計分析，經統計分析結果得知二方法之間為正相關性，且為線性相關；皮耳森相關係數(Pearson's correlation coefficient, r)為 0.937，再以配對 t 檢定結果顯示二方法在統計上無顯著差異。

本研究顯示以酵素色質性 (Chromocult) 培養基/混稀法能準確的檢測食品受大腸桿菌群污染的實際程度，且檢測結果與 CNS10984(多管醱酵法)經統計分析比較，統計上無顯著差異，同時亦能直接檢驗大腸桿菌，該檢驗法菌落顏色鮮明，易於判定，操作簡便，僅需 24h 即可完成大腸桿菌群試驗，比現行 CNS10984(多管醱酵法)縮短 48h，不僅可提高工作效率，且簡化實驗操作步驟，實為食品中大腸桿菌群快速檢測方法。

目 錄

第一章 前言-----	1
第二章 文獻整理-----	3
壹、 概述-----	3
貳、 大腸桿菌群的特性-----	4
一、 大腸桿菌群和大腸桿菌做為指標菌的歷史-----	4
二、 菌株-----	5
三、 生長-----	6
參、 大腸桿菌群和大腸桿菌檢測方法-----	7
一、 概論-----	7
二、 MPN 法-----	9
三、 EDM 法-----	10
1. 概述	
2. 使用 EDM 法偵測大腸桿菌	
3. 使用 EDM 法偵測大腸桿菌群	
4. 使用 EDM 法同時偵測大腸桿菌和大腸桿菌群	
肆、 大腸桿菌群使用於指標食品安全之限制-----	15
第三章 材料與方法-----	18
壹、 環境、器材及儀器-----	18

一、 工作環境-----	18
二、 器材及儀器-----	18
三、 藥品-----	20
四、 菌種-----	23
五、 樣品及樣品製備-----	23
貳、 檢驗程序-----	24
一、 中華民國國家標準-----	24
二、 酵素色質性培養基法-----	25
三、 實驗方法流程圖-----	29
第四章 統計分析-----	30
第五章 結果與討論-----	31
第六章 結論-----	36
第七章 參考文獻-----	37
圖 1 標準菌株 <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 在酵素色質性培養基生長菌落-----	41
圖 2 標準菌株 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883 在酵素色質性培養基生長菌落----	41
圖 3 標準菌株 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922、 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 及 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 三混菌在酵素色質性培養基生長菌落 -----	42
表 4 以 CNS 法及 Chromocult 法檢測食品中大腸桿菌群結果-----	43
附錄 A 相關分析-----	45

第一章 前言

隨著全球食品貿易急速發展，近來食品品質及安全，已廣為大眾所重視，何謂食品安全？一般所稱食品安全非為絕對安全，而是指相對安全，所謂相對安全，是指一種食物或成分在合理食用方式和正常食用量下不會導致健康損害，因此對食品品質及安全性把關，首重於在經濟、快速、安全及風險最低的情況下，保護消費者的利益。(參 1)

雖然目前科技可檢測出食品中的致病菌，但分離計數的方法很複雜且費時，所以食品衛生中常以指標微生物的數量或存在與否來做為食品安全及品質的指標，而指標微生物中大腸桿菌群、大腸桿菌是最廣泛使用、檢測的，利用大腸桿菌群、大腸桿菌檢測做為糞便污染的指標，是評價食品衛生質量的重要指標之一，目前也被廣泛應用於食品衛生工作中。在食品衛生細菌學檢驗中，不僅以檢出大腸桿菌群作為糞便污染的指標菌，同時還以大腸桿菌群數量的高低來判斷食品受糞便污染的程度及對人體健康危害性的大小。由於檢測大腸桿菌群或大腸桿菌在食品衛生學上具有廣泛意義，因此，如何簡便、快速、準確、低成本及高效益檢測食品中大腸桿菌群，已為廣大食品衛生工作者關注的議題(參 2)。

目前，國內檢測食品中大腸桿菌群方法，仍以中華民國國家標準『CNS10984/N6194』為公告方法，該檢測法為多管醱酵法所須時間約為 48~72 小時，與現階段環境檢測要求準確及快速需求不符，因而國外或商業間已陸續發展使用出多種大腸桿菌群快速檢測方法，例如：應用細菌特有酶和其酶的產色或螢光受質作用，進行快速檢測，由其文獻資料顯示，快速檢測方法之準確性，亦有其不錯效益，因此本研究乃選用快速檢測法—酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法，檢驗食品中大腸桿菌群含量，與現行公告中華民國國家標準(CNS10984/N6194)做一探討、比較，評估酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法之可行性，藉以提供產、官、學界間參考使用(參 3,4)。

第二章 文獻整理

壹、 概述

食品衛生中常以指標微生物的數量來做為食品安全及品質的指標，其指標微生物(Indicator organism)亦稱「污染指標菌」或「衛生指標菌」。其係用以指示食品在處理過程中是否合乎要求的一種指標，藉由檢驗食品中特定微生物群(種)的數量多寡來間接表示該食品中是否有不被接受的微生物存在及其衛生安全性(參 13)。一般指標微生物常用於二大功能，一為產品品質之指標菌，二為食品安全及衛生之指標。我國微生物衛生檢測常檢測的總生菌數及大腸桿菌／大腸桿菌群，前者常用於食品現有品質的評估，而後者則為食品安全衛生的指標(參 5,6)。

傳統微生物檢驗，需要一定時間培養，少則 2~3 天，多至數周，才能確定，與目前講求時效的現況不符，且檢驗結果出爐時，若有危害，食品已腐壞或危害已發生。爾來，隨著生物技術快速發展，新技術、新方法在食品微生物檢驗領域廣泛應用，有效提高了檢測和檢驗速度。微生物快速方法包括微生物學、分子化學、生物化學、生物物理學、免疫學和血清學等方面及其它們的結合。微生物快速檢測方法有許多都已相當成熟，如螢光酶免疫分析篩選方法、酶聯免疫吸附法(ELISA)、DNA 探針檢測法、聚合酶反應(PCR)技術、檢查

某些細菌的專有酶進行快速檢測方法(EDC)等(參 1,6)，其快速檢測方法也為許多國家或權威單位如 AOAC、FDA 所承認。

貳、 大腸桿菌群的特性

一. 大腸桿菌群和大腸桿菌做為指標菌的歷史(參 7,5)

大腸桿菌最初被稱為 *Bacterium coli commune*，首由德國小兒科醫生 Theodor Escherich 於 1885 年嘗試找出霍亂之病原時分離鑑定。大腸桿菌廣泛存在人類和溫血動物腸道，其為 *Enterobacteriaceae* 的成員之一；*Enterobacteriaceae* 包括很多屬，包括被認為是病原菌的 *Salmonella*, *Shigella*, 和 *Yersinia*。雖然 *E. coli* 大多數菌株被認為非致性病原菌，但他們可能會引起免疫能力較差的宿主感染傳染病的機會，也易引起 *E. coli* 被攝取的健康人引起腸胃疾病。

在 1892 年，Schardinger 基於人和動物糞便富含 *E. coli*，且其具有使葡萄糖醱酵轉換成乳糖的能力發現，較其他胃腸道病原體相比其較易被隔離、檢測，而推薦使用 *E. coli* 為一個糞便污染的指標。1895 年 Smith 建立檢測大腸桿菌之方法以便判別飲用水是否仍可飲用，該方法之建立開啓使用大腸

桿菌作為水質指標之里程碑。而由食品或水中檢測出大腸桿菌被認為其可能遭糞便污染，推測食品或水可能存在有的病原菌。雖然使用 *E. coli* 作為一個指標菌概念是好的，但由於如 *Citrobacter*, *Klebsiella* 和 *Enterobacter* 等其他腸內菌，也能發酵乳糖、性向特性也非常類似於 *E. coli*，使得此群不易被區分。因此，"coliform" 被創造描述、歸類於這群腸內菌。"coliform" 並非是一種分類的類別，而是定義用來描述一群革蘭氏陰性，兼氣性厭氧，能在 35°C，48 小時內發酵乳糖產酸和氣體的菌。而後在 1914 年，美國檢疫站即採用更方便的 coliforms 檢測作為一個衛生指標菌。

雖然 coliforms 容易被檢測發現，但是有一些 coliforms 也在環境樣品中發現。因此改以糞便 coliforms 作為一個污染的指標。

二. 菌株

大腸桿菌群是一群屬於腸內細菌的革蘭氏陰性菌，能在 35°C、48 小時內發酵乳糖並產生氣體，可在有氧或厭氧狀態下生長，其為非孢子形成菌。大腸桿菌群包含腸內細菌科之四個菌屬為 *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* 及 *Klebsiella*。

偶爾 *Arizona hinshawii* 及 *Hafnia alvei* 可醱酵乳糖，但其醱酵時間超過 48 小時，有些 *Pantoea agglomerans* 則可於 48 小時內醱酵乳糖。其自然界中分佈廣泛，舉凡人及動物的消化道及排泄物、植物、蔬果、蛋、牛奶及屠宰時摘除動物內臟等污染，皆可發現其踪跡。(參 5,6,7)

三. 生長

大腸桿菌群與其它之非病原性革蘭氏陰性菌類似，在食品及培養基中生長良好，其生長溫度範圍為 -2°C 至 50°C 。一般家用冰箱冷藏 5°C 貯存食品時，大腸桿菌群乃能緩慢生長。其生長 pH 介於 4.4~9.0 之間。大腸桿菌也可於只含有機碳源(如葡萄糖)、氮源(如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、及其它礦物質之基礎培養基中生長。大腸桿菌群於營養培養基中生長良好，且在 37°C 下，12~16 小時內可形成肉眼可見之菌落。在適當環境下可於食品中大量繁殖。

大腸桿菌群可在膽鹽存在下生長，革蘭氏陽性菌則否，其菌群可利用乳糖產氣，此一特性足以作為假設試驗之判定基礎。大腸桿菌群由於易培養且容易與其它菌分辨、存活時間與一般腸道病原菌之死滅時間類似、耐酸等特性及除少部

分致病外，安全性高，成為理想之指示菌。(參 5)

參、大腸桿菌群和大腸桿菌檢測方法

一. 概論

大腸桿菌群的檢測方法有多管醱酵法(most probable number ,MPN)、固體培養基的 Violet Red Bile Agar、膜過濾法(MF 法)分子生物快速檢測方法及酵素偵測法(EDM,enzyme detection methods)等如表 1(參 5,7)，由於食品安全的逐日重視及檢測方便性、快速性的要求，不斷的有新方法產生以符合現在需求，例如最近在美國佛羅里達大學譚蔚泓教授(Weihong Tan)與其同僚所研發的奈米顆粒測試法，由二氧化矽奈米微粒(silica nanoparticles)所構成，含有許多螢光染料分子(fluorescent dye molecules)的微粒與能檢測大腸桿菌的抗體連結，所以一旦加入測試樣本例如絞碎牛肉溶液的二氧化矽奈米微粒發現了大腸桿菌，微粒則快速的與大腸桿菌連結。由於大腸桿菌較微粒為重，可利用離心機將其分離，再藉著螢光辨識出大腸桿菌，此方法能提供更敏銳與快速的方法檢測污染，此種新方法全程能在 20 分鐘內完成，傳統的檢測得需要 48 小時以上。(參 8)

表 1 某些用於檢測及計數大腸桿菌群及大腸桿菌之方法(參 5)

方法	結果得知時間	敏感度	主要用途	備註
直接計數				
VRBA 平板				
推測試驗結果	18~24 小時	~10/g	總 coliforms	
確認試驗結果	24~48 小時	~10/g	總 coliforms	
Anderson & Baird-Parker	24 小時	~10/g	EC type I	
英式滾筒試管法	24 小時	1/g	EC	培養於 44.5°C
乾式滾筒試管法				
VRB 培養基	24 小時	~10/g	總 coliforms	
VRB 培養基	24 小時	~10/g	糞便	培養於 44.5°C
EC 計數	24 小時	~10/g	EC	使用 MUG 基質
液體培養基				
標準 MPN(推測)	24~48 小時	<1/100 mL	總 coliforms	LST 培養液
標準 MPN(確認)	24~48 小時	—	總 coliforms	LST 加入 BGLB 培養基
標準 MPN(糞便)	24 小時	<1/100 mL	糞便	LST 加入 EC 培養基
膜過濾/其它過濾法				
標準膜過濾法	24 小時	<1/g	總 coliforms	LES Endo agar
M-FC 法	24 小時	<1/g	糞便	M-FC 培養基 44.5°C
M-7h FC 法	7 小時	<1/g	糞便	M-7h FC 培養 41.5°C
Coli-Count Sampler	24 小時	≥ 10/g	糞便	
HGMF 法	24 小時	1/g	coliforms	
HGMF-ELA	24 小時	10/g	EC O157:H7	使用 HC agar
螢光基質法				
LST+MUG	20 小時	1 個細胞	EC	培養於 35°C
X-GLUC 平板	24 小時	~10/g	EC	
MUGal 平板	6 小時	1/100 mL	EC	
已知基質法				
存在與否(P-A)	24 小時	1/100 mL	EC coliforms	
阻抗	6.5 小時	~10 ³ /g	coliforms	需特殊培養基
酵素捕捉分析(ECA)	24 小時	<1/g	EC	由 LST 管來之 ECA
放射性分析	6 小時	1~10/g	coliforms	需放射性標記
DNA 探針	3~4 天	<2/g	EC O157:H7	菌落雜交及墨點分析
DNA 放大(PCR)	8,12 小時	20 個細胞	EC	檢測 DNA 序列
葡萄糖去羧酶分析	10 小時	1 個細胞	EC	
乙醇分析	9 小時	~10/ mL	coliforms	氣相層析分析
大腸桿菌噬菌體檢測	4~6 小時	~5/100 mL	EC	溶菌斑分析

註：BGLB：亮綠乳糖膽汁；EC=E. coli；ELA=酵素標記之抗體；HC=出血性結腸炎；HGMF：疏水柵欄膜過濾；LST=Lauryl sulfate tryptose；M-FC=微乳糞便計數；MPN=最確數；MUG=4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide；MUGal=4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside；VRB=紫紅膽汁；X-GLUC=4-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

大腸桿菌群的檢測方法在 ISO(International Standards Organization)和 BAM/AOAC(Bacteriological Analytical Manual/ Association of Official Analytical Chemists)傳統方法為最大可能計數法(most probable number ,MPN)，分析大約 3 天，先以 LST 至少培養 24 小時，在產氣 LST 管者，再轉殖於 BGLB 確定試驗，而大腸桿菌則至少 6 至 10 天，時間耗費相當多，不符合目前的時代趨勢所需，但廣為使用，且為目前惟一中華民國國家標準使用方法。(參 9)

二. MPN 法

MPN 為最大可能數(Most Probable Number)的簡稱。這種方法，係對樣品進行連續系列稀釋，再加入培養基中進行培養，從規定的反應呈陽性管數的出現率，用概率論來推算樣品中菌數最近似的數值。(參 10)多管計數法是 MPN 法最普遍的一種方法，值得注意的是 MPN 值表示的是微生物濃度之最近似值，它是假設在(1)樣品和稀釋液已充分地混勻(2)微生物在樣品中為隨機地分布(3)試管中一個或多個的微生物都能生長(4)無干擾的發生下的統計值，但有時這些假設是不成立的，

例如當微生物在較低稀釋度溶液中沒有生長，而在較高的稀釋度溶液中生長了，則表明在食品中可能具有微生物的抑制物質，在微生物被稀釋時，這些微生物也被稀釋到最低抑制濃度以下。(參 11)

三. EDM 法

1. 概述

自 1960 年代起微生物之偵測常利用其微生物對特定基質之代謝活性、生長反應測定、測定細胞之某些成份或這些組合為基礎，酵素偵測法(EDM, Enzyme Detection Method)即利用菌株會產生特有的酵素特性，分析此特殊酵素之存在，以證明某菌株的存在或數目。(參 5)

酵素偵測法中總大腸桿菌群(total coliform)的偵測主要檢測半乳糖酶(β -D-galactosidase)；大腸桿菌(*E. coli*) 的偵測主要檢測葡萄糖醛酶(β -D-glucuronidase)。葡萄糖醛酶能催化 β -D-glucoopyranosiduronic derivatives 分解成 aglycons 和 D-glucuronic acid，而半乳糖酶能催化水解乳糖分解成半乳糖和葡萄糖，快速檢測法即利用酵素特性，分析此特殊酵素之存在，以證明某菌株的存在或數目(參 12)。目前已有許多基於

酵素特異性測試的培養基商業化生產，此培養基可直接偵測菌株的存在及數目，而不需再確認培養或生化特性確認，節省許多時間、人力等。ECD 法常用之基質有螢光性及發色性基質(Fluorogenic and Chromogenic Substrates) (參 9,12,13)。

大部分螢光性基質(Fluorogenic Substrates)來自於香豆素(coumarin)，例如 4-methyl-umbelliferone(4-MU)、7-amido-4-methylcoumarin (7-AMC)或 4-trifluoromethylumbelliferone (4-TMU)，而合成基質為糖(sugar)、胺基酸(amino acid)和螢光物質組成。螢光基質在特異性酵素分解後，在 UV 波長下產生螢光(參 9,12,13)。

至於產色性基質(Chromogenic Substrates)在酵素水解下，產生顏色物質，其產色性基質主要為酚類衍生物(phenol derivatives)，例如 o-和 p-nitrophenols (ONP,PNP), p-nitrophenols (ONP, PNP)，p-nitroaniline (PNA), indoxyl-(Y)，5-bromo-4-chloro-3-indolyl (X)，5-bromo-6-chloro-3-indolyl (magenta)，6-chloro-3-indolyl (salmon), N-methylindolyl- (green) and 5-iodo-3-indolyl (iodo) compounds。大多數的產色性培養基(Chromogenic Agar)之基礎培養基都有選擇性培養基的設計，除了基本營養成分外，還會添加目標菌的特殊營養基、抗生

素或其他抑制雜菌的成份，上述基礎培養基可將受測菌限制在較小的範圍內，例如：在 CHROMagar Samonella 中添加了膽鹽(bile salt)可抑制革蘭氏陽性菌生長；Rambach Agar 中利用沙門氏菌可利用 propylene glycol 產生酸性而使其中的指示劑變色；Chromogenic Bacillus cereus Agar 中添加了 Polymixin B 及 Trimethoprim，可抑制革蘭氏陰性菌及部份革蘭氏陽性菌的生長；好氧性或厭氧菌、腸球菌等。(參 12,14)

而在上述篩選出的小範圍內，再利用特殊研發的產色基直接作為該菌特殊酵素生化反應的反應受質，以進一步在上述範圍內的疑似菌種內篩選出目標菌。例如：Chromogenic E.coli/coliform agar 中的兩種產色基 X-gal (測半乳糖苷酶)與 BCIG (測葡萄糖醛酶)，所有的 coliform 都為乳糖醱酵性，因此全部都是 X-gal 陽性，形成紅色；但只有 *E.coli* 是 BCIG 陽性，因此會有藍紫色反應。雖然一些傳統的培養基也會用酸鹼產色、硫化物變色、或螢光產色(例如：含 MUG 培養基)以幫助分離微生物；產色性培養基與這些培養基最大的不同就在於：產生顏色的範圍限制在菌落內，不會擴散。因此菌落更容易區分，無論是計數或鑑定都更清楚方便，另產色性基質一般是水溶性、熱敏感性、特異性、不會擴散，有

不同之顏色，但有些基質是相當昂貴。(參 12,14)

2. 使用 EDM 法偵測大腸桿菌

β -葡萄糖醛酶(β -D-glucuronidase)(GUD, E.C.3.2.1.31, β -D- glucuronide glucuronosohydrolase)能催化 β -D-glucopyranosiduronic acids 水解為其 aglycons 和 D-glucuronic acid，此酶活性可用於產色基質如 p-nitrophenol- β -D-glucuronide (PNPG)、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (XGLUC) 和產螢光的 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG, 4-甲基傘型酮- β -D-葡萄糖醛酸)的檢測。(參 9,12,13)

MUG 用於檢測大腸桿菌是一相當成熟的檢測技術，並於 1988 年被美國 AOAC 定為法定檢測方法。中國大陸在 1994 年亦公告為進出口檢驗檢測標準(SN 333-94)。該方法的原理是用 4-甲基傘型酮- β -D-葡萄糖醛酸測定大腸桿菌在培養過程中的特異產物 β -葡萄糖酸，以其被裂解後的產物 4-甲基傘型酮(4-MU)為標誌。該方法檢測快速、準確，具有很強的可操作性。(參 15)

雖然 β -葡萄糖醛酶可用於檢測大腸桿菌，但只有 94~96%

大腸桿菌株對於此酶產生正反應，在某些菌株如 *E. coli* O157:H7 並不具有此酶，而除了大腸桿菌株外，有些如沙門氏菌(*Salmonella*)(20~29%)、(*Shigella*) (44~58%)、(*Klebsiella*)、*Yersinia* 其某些菌株，亦會產生此酵素。(參 9,12,13,19)

3. 使用 EDM 法偵測大腸桿菌群

大腸桿菌群的檢測常利用乳糖的醱酵檢測，而乳糖可被 β -D 半乳糖酶(β -D-galactosidase,E.C.3.2.1.23.， β -Gal)分解成葡萄糖及半乳糖，現已定義檢測 β -D-半乳糖酶活性代表大腸桿菌群量的檢測。 β -D-半乳糖酶以前被稱為乳糖酶(lactase)，檢測 β -D-半乳糖酶活性的產色性基質例如 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (PNPG)，6-bromo-3-indolyl- β -galactopyranoside(Salmon-Gal)，5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Dgalactopyranoside (XGAL) 和 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside (BNGAL)；螢光基質為 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUGAL) (參 9,12,13,19)。

4. 使用 EDM 法同時偵測大腸桿菌和大腸桿菌群

大腸桿菌和大腸桿菌群二者皆為重要的指標微生物，有

時為了品管監控，希望能同時檢測此二項微生物，基於檢測半乳糖酶和 β -葡萄糖醛酶活性代表檢測大腸桿菌群和大腸桿菌的原理，現已有許多商業化的產色性和螢光性基質培養基量產詳如表 2(參 9,12)。目前國內環檢所公告方法，水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法—酵素色質性(Chromocult)培養基/濾膜法即為此法之應用(參 4)。

肆、大腸桿菌群使用於指標食品安全之限制

理想之食品安全微生物指標菌應符合下列要求:(1).容易被檢測出(2).容易與食品中其它菌相互分辨(3).與食品中腐敗菌之存在有恒定相關性(4).當食品中腐敗菌存在時，該指標菌亦要存在(5).指標菌之菌數要與病原菌之菌數有相關性(6).指標菌之生長需求與生長速率和病原菌最好相同(7).其致死速率最好與病原菌類似，且其存活最好較病原菌稍佳(8).理想之指標菌應只在小腸環境中存在(9).應以高菌量存在糞便中，以便經得起高倍數之稀釋(10).對腸道外界環境應有高抵抗力(11).當指標菌數低時，仍應容易及可靠的被檢測出(參 5,6)。

由以上理想指標菌的條件而言，可知就冷凍食品、冷凍殺菁蔬菜、海產品等食品而言，大腸桿菌群並非良好之指標菌。以冷凍食品為例，由於大腸桿菌群不耐低溫，因此不適合作為冷凍食

品的衛生指標，反而以腸球菌(*Enterococci*)為指標菌較適當；而對冷凍殺菁蔬菜而言，蔬菜本身即有大腸桿菌群，尤其是大腸桿菌群中 *Enterobacter* 常可於蔬菜中發現，使得大腸桿菌群檢驗並無顯著意義；海產品之病原菌存在與大腸桿菌群存在的相關性不高，檢測出大腸桿菌群的存在及數量，並無法指標出海產品之品質及衛生狀況，因此檢測海產品大腸桿菌群失去指標意義(參5,6)。

表2 可同時偵測大腸桿菌群和大腸桿菌之商業培養基(參12)

培養基	基質/顏色		廠商
	大腸桿菌群	大腸桿菌	
液體培養基			
FluorocultR LMX broth	XGAL/blue-green	MUG/blue fluorescence	Merck (Germany)
Readycult coliforms	XGAL/MUG	MUG/blue fluorescence	Merck (Germany)
ColiLert	ONPG/Yellow	MUG/blue fluorescence	IDEXX (USA)
Coliquick	ONPG/Yellow	MUG/blue fluorescence	Hach (USA)
Colisure	CPRG/red	MUG/blue fluorescence	Millipore (USA)
固體培養基			
EMX-agar	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Biotest (Germany)
C-EC-MF-agar	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Biolife (Italy)
Chromocult	SalmonGal/red	XGLUC/blue-violet	Merck (Germany)
Coli ID	XGAL/blue	SalmonGlu /Rose-violet	bioMerieux (France)
CHROMagar ECC	SalmonGal/red	XGLUC/ purple	Chromagar (France)
Rapid`E.coli 2	XGAL/blue	SalmonGlu/purple	Sanofi (France)
E.coli/coliforms	SalmonGal/red	XGLUC/ purple	Oxoid (UK)
ColiScan	SalmonGal/red	XGLUC/ purple	MicrologyLab. (USA)
MI-agar	MUGal/blue fluores	Indoxyl/blue	Brenner (1993)
其他系統			
ColiComplete	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Biocontrol (USA)
ColiBag/Water check	XGAL/blue-green	MUG/blue fluorescence	Oceta (Canada)
Pathogel	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	(USA)
E.Colite & ColiGel	XGAL/blue	MUG/blue fluorescence	Charm Sci.(USA)
ColiChrome	SalmonGal/red	XGLUC/purple	-
2Redigel	TTC/red	XGLUC/blue	Hach (USA)
m-Coliblue	TTC/red	XGLUC/blue	Hach (USA)
ONPG:	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside		
Salmon-GAL:	<i>6</i> -bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside		
XGAL:	<i>5</i> -bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside		
CPRG:	Chlorophenol red β -galactopyranoside		
XGLUC:	<i>5</i> -bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide		
MUG:	<i>4</i> -methyumbelliferyl- β -D-glucuronide		
TTC:	triphenyl tetrazolium chloride		

第三章 材料與方法

本試驗方法(1)大腸菌桿群 CNS 法：係依據中華民國國家標準(CNS) 10984 /N6194(參 3)。(2)酵素色質性培養基/混稀法(簡稱 Chromocult 法)：參考行政院環保署環檢所公告水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法－酵素色質性(Chromocult)培養基/濾膜法(參 4)、台灣默克公司酵素色質性大腸桿菌及大腸桿菌群培養法檢驗流程及判別(參 16)及美里埃(bioMerieux)公司 Coli ID 顯色培養基資料(參 17)，以中華民國國家標準：食品微生物之檢驗法－生菌數之檢驗(CNS 10890/6186) 為菌數之表示及計數(參 18)

壹、 環境、器材及儀器

一、 工作環境：

工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，(操作平台光度為 100 尺燭光)，室內通風良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為，當把傾倒於培養皿中之培養基(平板)露於操作場所之大氣中 15 分鐘，每一平板所得之落菌數不超過 15 個。

二、 器材及儀器

2.1 乾熱滅菌器：玻璃用具等之滅菌用，其內部中心溫度能達

170°C 以上，並維持該溫度 1 小時以上者。

- 2.2 高壓滅菌釜：培養基及稀釋液等不能乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用，滅菌中心溫度可達 121°C 約 15 分鐘以上。
- 2.3 冰箱：保持 0°C 至 5°C。
- 2.4 稀釋用容器：附蓋(栓)之 250，500mL 錐形瓶。
- 2.5 培養箱：能維持內部溫度溫差在±1.0°C 以內者。
- 2.6 水浴槽：能維持水溫溫差在±0.2°C 以內者。
- 2.7 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(stomacher)：能符合無菌操作要求。
- 2.8 試管：15X150mm
- 2.9 培養皿：硼矽玻璃或可拋棄式塑膠製培養皿。內徑約 9cm，深度 1.5~1.8cm，底皿之內外應平坦無氣泡、刮傷或其他缺點。
- 2.10 醱酵管(Durham fermentation tube)：內徑 7×20mm，使用時倒置於 15×150mm 之試管內。
- 2.11 接種用白金針或白金耳或丟棄式接種環(disposable inoculation loop)。
- 2.12 pH meter
- 2.13 量筒：使用 100、500 及 1000 mL 之量筒。
- 2.14 吸管：使用 1、5 及 10 mL 之滅菌玻璃吸管或無菌塑膠吸

管，準確度應達 0.1 mL。

2.15 稀釋瓶：使用 100、250、500 及 1000 mL 能耐高壓滅菌

之硼矽玻璃製品作為樣品之稀釋用。

2.16 三角錐瓶：使用 250、500、1000 及 2000 mL 能耐高壓滅

菌之硼矽玻璃製品作為培養基及稀釋水之製作用。

2.17 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能者。

2.18 菌落計數器：用於菌落數之計算，以暗視野且有放大裝置

者為佳。

2.19 天平：能精秤至 0.01 g 者。

三、 藥品

3.1 磷酸緩衝溶液

取 34g 磷酸二氫鉀溶於 500mL 之蒸餾水中,俟完全溶解後，以 1N 氫氧化鈉溶液調節其 pH 值為 7.2，然後加蒸餾水至全量為 1000mL 經 121°C 滅菌 15min 後，貯存於冰箱中，作為原液備用，使用時取 1.25mL 原液加蒸餾水至全量為 1000mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C 滅菌 15min，最後 pH 值為 7.2±0.1。

3.2 大腸桿菌群 CNS 法

3.1.1 硫酸月桂酸胰化蛋白示培養液(LST-Lauryl Sulfate Tryptose Broth)

胰化蛋白月示(Tryptose)	20.0g
乳糖(Lactose)	5.0g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2.75g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	2.75g
氯化鈉(NaCl)	5.0g
硫酸月桂酸鈉(Sodium lauryl sulfate)	0.1g
蒸餾水或去離子水	1000mL

稱取各成分(或適量之商業製品，本實驗使用 Merck 公司商業製品)溶於蒸餾水或去離子水中，攪拌並輕微加熱溶解後，分取 10mL 注入裝有醱酵管之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8±0.2。

3.1.2 煌綠乳糖膽汁培養液(Brilliant green lactose bile broth, BGLB)

蛋白朊(Peptone)	10.0g
乳糖(Lactose)	10.0g
牛膽粉(Oxgall powder)	20.0g
煌綠色試劑(Brilliant Green)	0.0133g
蒸餾水或去離子水	1000mL

稱取各成分(或適量之商業製品，本實驗使用 Merck 公司商業製品)溶於蒸餾水或去離子水中，攪拌並輕微加熱溶解後，分取 10mL 注入裝有醱酵管之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8±0.2。

3.2 Chromocult 法

酵素色質性 (Chromocult) 培養基

蛋白朊 (Peptones)	3.0g
丙酮酸鈉 (Sodium pyruvate)	1.0g
色氨酸 (Tryptophan)	1.0g
山梨醇 (Sorbitol)	0.1g
硫酸十七基鈉 (Tergitol 7)	0.32g
氯化鈉	5.0g
磷酸氫二鈉	2.2g
磷酸二氫鈉	2.7g
瓊脂	10.0g
6-氯-3-吲哚酚-β-D-半乳糖吡喃糖苷 (6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside)	0.2 g
5-溴-4-氯-3-吲哚酚--β-D-尿苷酸環己基銨鹽 (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β--D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt)	0.2 g

依上述配方秤取各成分，加入 1 L 的蒸餾水，煮沸溶解後（註：此培養基不可高溫高壓滅菌），置於 44 至 46°C 之水浴槽待溫度下降至恒溫後加入抗生素萬古黴

素 (Vancomycin) 及西蘇羅錠 (Cefsulodin) (配製方法：
各取 5 mg 抗生素萬古黴素與西蘇羅錠加入 4 mL 的去
離子水)，本實驗使用 Merck 公司商業製品。

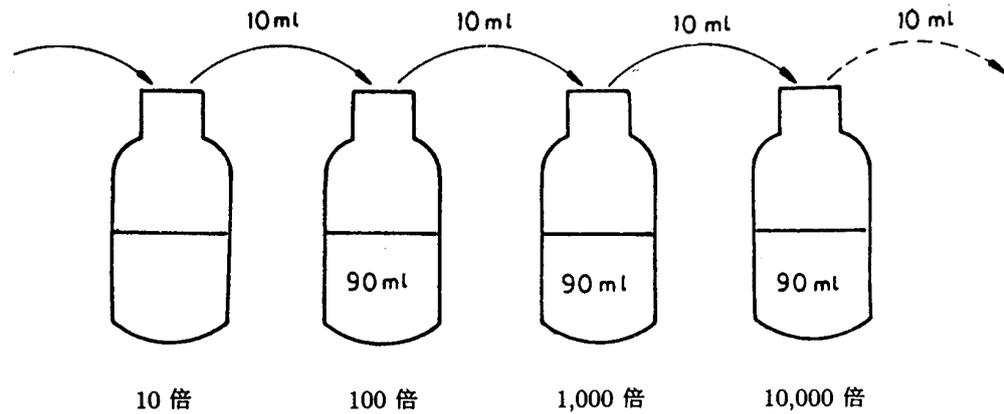
四、 菌種

採用 *Escherichia coli* ATCC25922、*Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 及 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 三株菌做添加及實驗品質監控，其中 *Escherichia coli* ATCC25922、*Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 為陽性控管(positive control)，*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 為陰性控管(negative control)。

五、 樣品及樣品製備

自市面上購買乳品類、肉類、飲料類、冷凍食品、飲用水等樣品，隨機添加 *Escherichia coli* ATCC25922、*Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 及 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 等微生物。其樣品製備係固體樣品稱取 25g 放入含 225ml 滅菌磷酸緩衝液的無菌均質器內均質 2 分鐘或液體樣品直接吸取 25ml 放入含 225ml 滅菌磷酸緩衝液的無菌瓶內混合均勻，製成 1:10 的均勻稀

釋液，再根據需要以滅菌磷酸緩衝液如下作 10 倍遞增稀釋。



貳、 檢驗程序

一、 中華民國國家標準(CNS10984/N6194, 簡稱 CNS 法)(參 4)

1. 推定試驗：稀釋液及原液充分振搖、混合均勻後，分別吸取 1ml 接種於已裝有硫酸月桂酸胰化蛋白月示培養液 (LST) 試管中，每稀釋液各接種 3 支（三階三支），置於 35°C 培養箱內培養 24±2hr，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，繼續培養 24hr。若仍無氣體產生，即為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，則為可疑大腸桿菌群陽性。
2. 確定試驗：由上述產生氣體之每一試管中取一白金耳量培養液，接種於另一支煌綠乳糖膽汁培養液(BGLB)中，於 35°C 培養 18~22hr，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，

繼續培養 24hr，若仍無氣體產生者，即為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，則判定為大腸桿菌群陽性。

3. 最確數(most probable number :MPN)：由上述中煌綠乳糖膽汁培養液(BGLB)確定為大腸桿菌群陽性者推算各階硫酸月桂酸胰化蛋白月示培養液(LST)大腸桿菌群陽性之試管數，利用最確數表(如表 3)，推算出大腸桿菌群之最確數(MPN/g 或 mL)。

二、 酵素色質性培養基法(簡稱 Chromocult 法)(參 4,16,17,18)

1. 混合稀釋法：使用無菌吸管吸取 1ml 的檢體，注入無菌培養皿中，將已溶解置於 45~ 50 °C Chromocult Coliform Agar (內含 Vancomycin 及 Cefsulodin 2.5 mg 倒入 15~ 20 ml 到無菌培養皿中)，與上述之 1ml 的 檢體樣品混合均勻，待冷卻凝固後，倒置放入培養箱中，35±1 °C，培養 24±1 小時。
2. 判讀及計數：計數平板上藍/紫色及紅色總數，選取 25~250 個菌落之兩個培養皿來計數，依稀釋倍數計算檢體中含有多少菌落數 (CFU/g 或 mL)，其計數方法依下列執行：

- (1) 若各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數培養皿之菌落數為 25~250 個，則應以該稀釋倍數之兩個培養皿之菌落數平均值乘其稀釋倍數，即得其菌落數；但若有兩種稀釋倍數之培養皿之菌落數在 25~250 個之間時，則應依下列公式計算之，但記錄菌數時應將該數字第三位數字四捨五入，使其有效數為兩位)。

$$\text{菌數}(CFU/g) = \frac{\left(\frac{Aa + Ab}{2}\right) \times A + \left(\frac{Ba + Bb}{2}\right) \times B}{2}$$

A、B：稀釋倍數

Aa、Ab：A 稀釋倍數各培養皿內之菌落數。

Ba、Bb：B 稀釋倍數各培養皿內之菌落數。

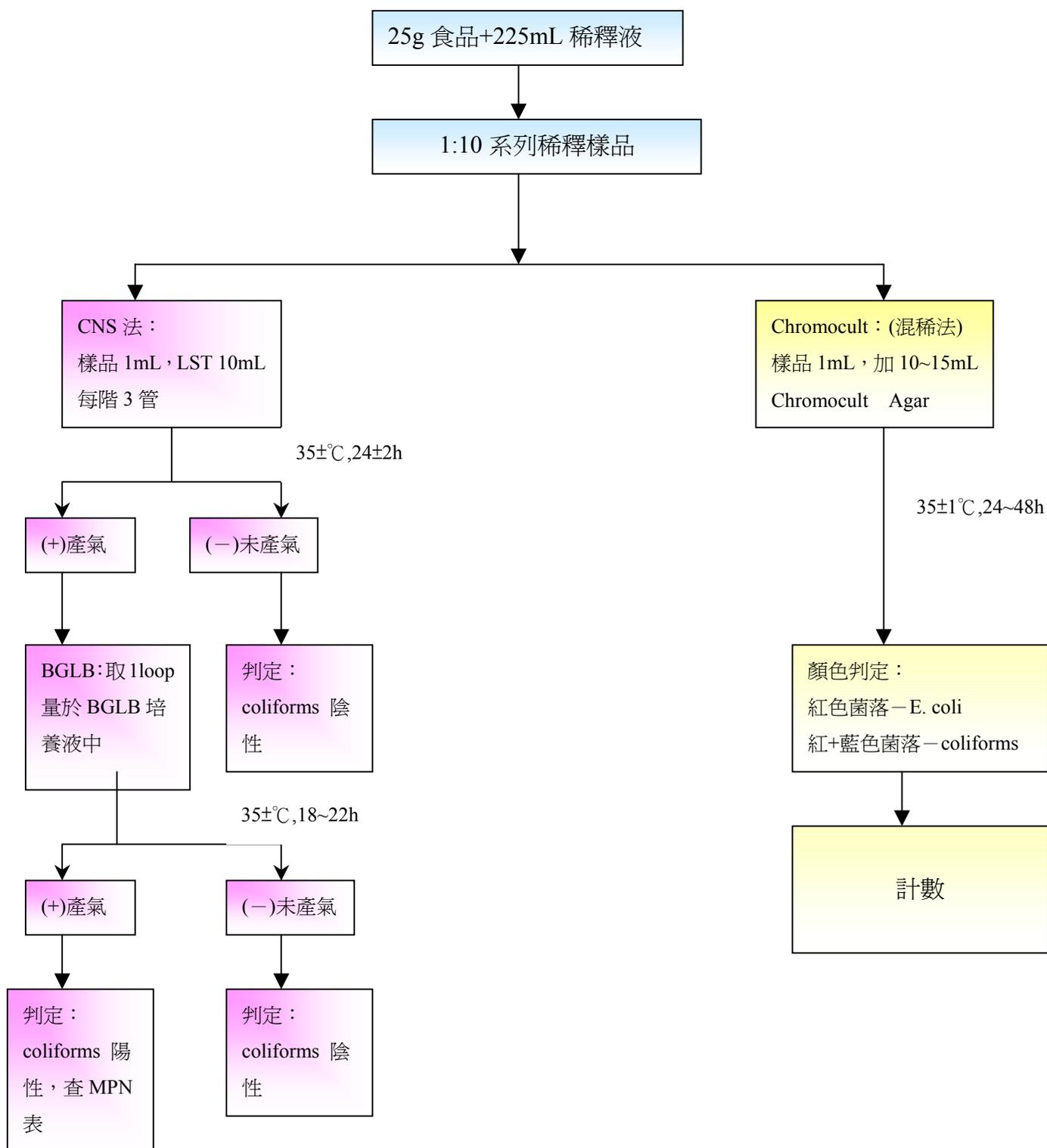
- (2) 各稀釋倍數之菌落數均小於 25 個時，則以最低稀釋倍數之兩個培養皿菌落數平均值乘其稀釋倍數。
- (3) 培養皿中菌落數大於 250 個時，則先計數培養皿中菌落分佈其代表性之一部份，再據而計算出菌落，而以估計值表示。
- (4) 各稀釋倍數均無菌落生長者，則菌數應為小於 1 乘以最低稀釋倍數並註明估計值。
- (5) 若二重複培養皿之菌落數，其中一皿在 25~250 個之間，另一個大於 250 個時，兩者均應計數。
- (6) 若兩稀釋倍數之菌落數，各有一皿在 25~250 個之間，且又有一皿大於 250 個或小於 25 個時，四皿皆計數並依公式計算之。
- (7) 當兩稀釋倍數之菌落數，其中 1 稀釋倍數之 2 重複培養皿之菌落數均在 25~250 之間，另 1 稀釋倍數之 2 重複培養皿之菌落數，一皿在 25~250 之間，另

一皿大於 250 個或小於 25 個時，四皿皆計數，並依
公式計算之。

表3最確數表(MPN)(參3)

正反應試管數			MPN/mL(g)	95% 信賴界限	
0.1mL	0.01mL	0.001mL		下限	上限
0	0	0	0.00	0.00	9.50
0	0	1	3.01	0.15	9.60
0	1	0	3.05	0.15	10.7
0	1	1	6.11	1.24	18.0
0	2	0	6.19	1.24	18.1
0	3	0	9.44	3.56	37.5
1	0	0	3.57	0.17	18.1
1	0	1	7.23	1.26	18.2
1	0	2	11.0	3.56	37.5
1	1	0	7.36	1.26	20.3
1	1	1	11.2	3.56	38.0
1	2	0	11.4	3.56	42.0
1	2	1	15.4	4.50	42.0
1	3	0	15.7	4.52	42.0
2	0	0	9.18	1.44	37.5
2	0	1	14.3	3.62	42.0
2	0	2	19.9	4.52	42.0
2	1	0	14.7	3.68	42.0
2	1	1	20.5	4.52	42.0
2	1	2	26.8	8.70	94.5
2	2	0	21.1	4.52	42.5
2	2	1	27.6	8.70	94.5
2	2	2	34.8	8.70	94.5
2	3	0	28.6	8.70	94.5
2	3	1	36.0	8.70	94.5
3	0	0	23.1	4.58	94.5
3	0	1	38.5	8.70	105
3	0	2	63.6	16.8	183
3	1	0	42.7	9.00	183
3	1	1	74.9	16.9	200
3	1	2	115	37.0	425
3	1	3	159	40.0	425
3	2	0	93.3	18.1	425
3	2	1	149	37.0	425
3	2	2	215	40.0	427
3	2	3	292	90.0	1000
3	3	0	240	42.0	1000
3	3	1	462	90.0	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	425	—

實驗方法流程圖



第四章 統計分析

本試驗分別將 Chromocult 法及 CNS 10984 法之檢測結果，利用電腦 Excel 套裝軟體進行下列之統計分析：

1. 二方法檢測結果分別取對數值後，以相關統計分析比較二方法之相關性及該相關的密切程度。(參 20,21, 22,27)
2. 二方法檢測結果分別取對數值後，再以配對 t 檢定，比較二方法檢測結果是否存在顯著性之差異。(參 23,24,25,26)。

第五章 結果與討論

(一)、 本試驗快速檢測食品中大腸桿菌群—酵素色質性(Chromocult)

培養基/混稀法其原理是在培養基內添加蛋白胨、山梨醇(Sorbitol)、焦葡萄糖鹽(Pyruvate)等營養物質使大腸桿菌群能快速生長，以硫酸十七基鈉(Tergitol7)抑制革蘭氏陽性細菌、西蘇羅錠(Cefsulodin)抑制產氣單胞桿菌及假性單胞桿菌，以受質(substrate) Salmon-Gal 與具大腸桿菌群專一性的半乳糖苷酶(β -D- Galactosidase) 反應產生紅色菌落，而 Coliform 中的 E.coli (大腸桿菌)除了有半乳糖苷酶此酵素與培養基中已加入的受質 Salmon-Gal 作用以外，同時也另有特異性的酵素：葡萄糖醛酶(β -D- Glucuronidase)，此酵素將與培養基中已加入的受質 X-Gal 作用而顯藍色，兩者共同作用後 E. coli 將呈現深藍色至藍紫色菌落，所以 E. coli 可與其它 Coliform 分辨出來，而其它不是 E.coli 或 Coliform 的菌將為無色菌落(參 4,14,16)。

(二)、 圖 1~3 表三株標準菌 *Escherichia coli* ATCC25922、*Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 及 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 在酵素色質性培養基的呈色情形，其中 *Escherichia coli* ATCC25922、*Klebsiella pneumoniae*

ATCC13883 皆屬 coliforms，*Pseudomonas aeruginosa* *ATCC27853* 為非 coliforms 之菌株，結果顯示圖 1 表 *Escherichia coli* *ATCC25922* 於酵素色質性培養基之生長菌落：深藍色至紫色菌落；圖 2 表 *Klebsiella pneumoniae* *ATCC13883* 於酵素色質性培養基之生長菌落：紅色菌落(代表非 *E. coli* 之大腸桿菌群)，而 *Pseudomonas aeruginosa* *ATCC27853* 為非 coliforms 之菌株，其為無色菌落，由圖 1 及圖 2 之結果，可特異專一鑑別及判定大腸桿菌及大腸桿菌群，因此在含有 *Escherichia coli* *ATCC25922*、*Klebsiella pneumoniae* *ATCC13883* 及 *Pseudomonas aeruginosa* *ATCC27853* 三株混菌樣品或含單株菌樣品，皆可由呈色的不同而容易判定，以圖 3 為例在三菌株混合樣品中，於酵素色質性(Chromocult)培養基生長菌落：紅色菌落及深藍色至紫色菌落；計算深藍色至紫色菌落即可得知大腸桿菌含量，計數所有紅色菌落及深藍色至紫色菌落，即為大腸桿菌群的含量。圖 4A 及圖 4B 表啟新公司及默克公司，其檢測大腸桿菌群的呈色情形，與圖 3 結果一致(參 5,14)。

(三)、 酵素色質性培養基/混稀法的偽陰性及偽陽性，本次實驗未進行，惟根據環檢所公告 NIEA E237.50B 方法以酵素色質性培

養基篩選大腸桿菌群及大腸桿菌，挑選培養基上產生藍色的菌落 102 株，以 VITECK 菌種鑑定系統進行驗證，結果大腸桿菌的鑑出率大於 87 %，顯示偽陽性小於 13%。而挑選培養基上產生紫紅色及粉紅色的菌落 103 株，以 m - ENDO agar 進行驗證，屬於大腸桿菌群比率大於 85 %，顯示偽陽性小於 15 %，另挑選培養基上透明及黃色菌落，經 m - ENDO agar 進行驗證，非屬於大腸桿菌群之比率大於 80 %，即偽陰性 < 20 % (參 5)。另 Suwansonthichai 和 Rengpipat 以 Chromocult coliform agar (CCA) 檢測 174 個冷凍草蝦(frozen black tiger shrimp)樣品之大腸桿菌群時，指出挑出 857 個菌落，做生化反應確認其陽性比例為 97.1%(832)及陰性比例為 2.9%(25)(參 29)。由上資料可知，酵素色質性(Chromocult) 培養基之準確性相當高、偽陰性及偽陽性低。

(四)、二種方法 (Chromocult 法及 CNS 10984 法) 同時檢測 42 件樣品中大腸桿菌群之結果詳如表 4。如表 4 所示，某些相同樣品，二種方法檢測結果直觀而言，差異頗大，但微生物菌量檢測非化學定量檢測，相同樣品相同檢測方法，重複性檢測結果時，菌落數測量的結果其分散性往往極大，所以微生物檢測結果通常是取對數後，在進行數據分析。

- (五)、二方法檢測結果取對數後進行相關分析，結果如附錄 A，(1) 二方法的共變數為： $S(X, Y)=1.654092$ ，顯示二方法之間為正相關(2) XY 散佈圖可見二方法檢測結果存在直線相關(3) 相關係數(皮爾森相關係數) 0.936985 ，二方法間存在線性相關(4) 相關係數的假設檢定中，相關係數 ρ 可能不為 0，即二方法存在相關，由上之相關分析結果充分顯示二方法之間呈線性相關。
- (六)、Turner 等人研究比較以 Chromocult Coliform Agar 和 Petrifilm *Escherichia coli* count plate 以二方法同時檢測 76 個食品中大腸桿菌群，指出其二方法之相關係為 0.89(參 28)，而本研究二種方法 (Chromocult 法及 CNS 10984 法) 同時檢測 42 件樣品，其相關係數為 0.936985，顯示二者正相關非常高。
- (七)、二方法檢測結果以配對 t-檢定(paired t-test)分析如附錄 B，在假設二方法檢測結果之差 d 的分配為常態分佈下，且二者無差異 (即為 $\mu_d=0$)， $\alpha=0.05$ 之下進行假設檢定，結果顯示 (1) 機率值 $=P(|t| \geq 0.046596016) = 0.963116057 > \alpha = 0.05$ 差異不顯著，故接受 H_0 ，表示二方法無顯著差異(2) $t=0.046596016 < \text{臨界值} = 2.03451691$ 差異不顯著，故接受 H_0 ，表示二方法無顯著差

異。由上之配對t-檢定結果充分顯示二方法檢測結果在統計上應屬無顯著差異的範圍。

(八)、二檢測方法經由相關分析及配對 t-檢定分析結果顯示，二方法檢測結果在統計上應屬無顯著差異的範圍，此結果與大陸廣東省衛生防疫站嚴紀文等人以相類似培養基 Coli ID 選擇性顯色培養基與 GB4789.3-94 方法(類似 CNS10984；多管醱酵法)檢測結果，相當類似。

(九)、Chromocult 法係在檢測大腸桿菌群時，只吸取 1ml 樣液進行培養，並依據培養基上生成的菌落數直接計算大腸桿菌群數，單位為 CFU/mL(g)。而 CNS10984 (多管醱酵法)測定的 MPN 值係對樣品進行連續系列稀釋，再加入培養液中進行培養，從規定的反應呈陽性管數的出現率，用概率論來推算樣品中菌數最近似的數值，其為樣品中活菌密度的估測，由其 95%可信賴度的上、下限，可知其檢測值有一定的範圍，其單位為 MPN / mL(g)。由於 MPN 法及 Chromocult 法兩者之檢測與計數的方法不同，所以單位會不同，但依照本研究統計分析結果，此兩種檢測方法的數值，在統計上屬無顯著差異的範圍，可知雖然兩者計數所得的數值會有些許不同，但檢測結果無顯著差異。

第六章 結論

本研究係探討酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法，檢驗食品中大腸桿菌群含量，與中華民國國家標準(CNS10984)多管醱酵法做比較，以評估酵素色質性(Chromocult)培養基/混稀法之可行性。

由研究結果顯示以酵素色質性 (Chromocult) 培養基/混稀法能準確的檢測食品受大腸桿菌群污染的實際程度，且檢測結果與 CNS10984 (多管醱酵法) 經統計分析比較，統計上無顯著差異，同時亦能直接檢驗大腸桿菌，該檢驗法菌落顏色鮮明，易於判定，操作簡便，僅需 24h 即可完成大腸桿菌群試驗，比現行 CNS10984 (多管醱酵法) 縮短 48h，不僅可提高工作效率，且簡化實驗操作步驟，實為食品中大腸桿菌群快速檢測方法。

參考文獻

1. 王晶、王林、黃曉蓉主編，食品安全快速检测技术，pp1-4 化学工业出版社，2003年4月第1版2刷
2. 严纪文、朱海明、宋曼丹、赖蔚冬、黄吉城、戴昌芳，选择性显色培养基快速检测食品中大肠菌群和大肠杆菌的效果观察，广东防疫，1999，2期
3. 中華民國國家標準，食品微生物之檢驗法—大腸桿菌群之檢驗(CNS10984/N6194)
4. 行政院環保署環檢所，中華民國92年9月4日環署檢字第0920064601號公告，水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法—酵素色質性(Chromocult)培養基/濾膜法(NIEA E237.50B)
5. 現代食品微生物學，James M. Jay 原著，方繼等編譯，偉明圖書有限公司，pp421-429，民88年11月初版
6. 左艷芳、施文益、施明智、孫豫蘋編著，新營養師精華—8 食品學，匯華圖書出版有限公司，1996年12月初版一刷，pp367-372
7. Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant ,Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4 Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria ,U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutritio

(<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>)

8. 應用科學：能快速檢驗出血型分類大腸桿菌的奈米顆粒測試法，
Sciscape.org 2004,11 月 21 日新聞
http://www.sciscape.org/news_detail.php?news_id=1662
9. Ubrahim .AKIR、Hilal B. DOUAN、Ensar BATPINAR、Fikret KEVEN、A. Kadir HALKMAN The Need for Cofirmation in Coliform and E. coli Enumeration in Foods. Turk J Vet Anim Sci 26(2002) p1049-1053
10. 食品伙伴网/大肠菌群及检验
<http://www.foodmate.net/jianyan/weishengwu/4-2.php>
11. W.F.Harrigan 着，李卫华等译，食品微生物实验室手册(第三版)，北京：中国轻工业出版社，pp328-334
12. M. Manafi, (1999) New approaches for the fast detection of indicators, in particular enzyme detection methods (EDM). In Proceedings of the OECD Workshop on Molecular Methods for Safe Drinking Water, Interlaken1998
http://www.eawag.ch/publications_e/proceedings/oecd/proceedings/Manafi.pdf
13. M. Manafi , New developments in chromogenic and fluorogenic culture media., Int J Food Microbiol, 2000 Sep 25;p60(2-3):205-18
(<http://www.univie.ac.at/chromogenic/rev2000.pdf>)
14. 產色性鑑定分離培養基，啓新生物科技有限公司

15. 出口食品中大肠杆菌(葡萄糖苷酶荧光)检验方法(Method for inspection of Escherichia coli in food for export—Fluorescence measurement of glucosidase), SN 0333—94
16. 台灣默克公司酵素色質性大腸桿菌及大腸桿菌群培養法檢驗流程及判別
17. 梅里埃公司 2004 年烟台培训班资料：食品培養基 (17)

(http://www.biomerieux.com/servlet/srt/bio/china/dynPage?open=CHN_IND_PRD&doc=CHN_IND_PRD_G_PRD_40&pubparams.sform=3&lang=cn)
18. 中國民國國家標準，食品微生物之檢驗法—生菌數之檢驗，CNS 10890/6186 ，80.2.26
19. 現代食品微生物學， James M. Jay 原著，方繼等編譯，偉明圖書有限公司，pp242-283，民 88 年 11 月初版
20. 楊志良，生物統計學新論,pp209-233 巨流出版社,83 年 7 月增訂版

八印
21. 顏月珠，統計分析與 EXCEL，pp42-43 萬達打字印刷有限公司，

89 年 9 月
22. 罗旭，化学统计学，pp223-246，科学出版社(北京)，2001 年 7 月
23. 楊志良，生物統計學新論,pp121-126 巨流出版社,83 年 7 月增訂版

八印

24. 顏月珠，統計分析與 EXCEL，pp28-30 萬達打字印刷有限公司，
89 年 9 月
25. 罗旭，化学统计学，pp120-122，科学出版社(北京)，2001 年 7 月
26. 王文中，Excel 於資料分析與統計學上的應用，pp228-235 博碩文
化股份有限公司，86 年 9 月
27. 倪永年，化学计量学在分析化学中的应用，北京：科学出版社，
pp28-29，2004
28. TURNER,K.M., L. RESTAINO, and E.W.FRAMPTON, Efficacy of
Chromocult Coliform Agar for Coliform and *Escherichia coli*
detection in foods. J. Food Prot. 2000(63:4)p539-641.
29. Sasithorn Suwansonthichai, Sirirat Rengpipat. Enumeration of
coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus
monodon* by conventional and rapid methods. International Journal of
Food Microbiology. 81(2003)p113-121.

(<http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>)

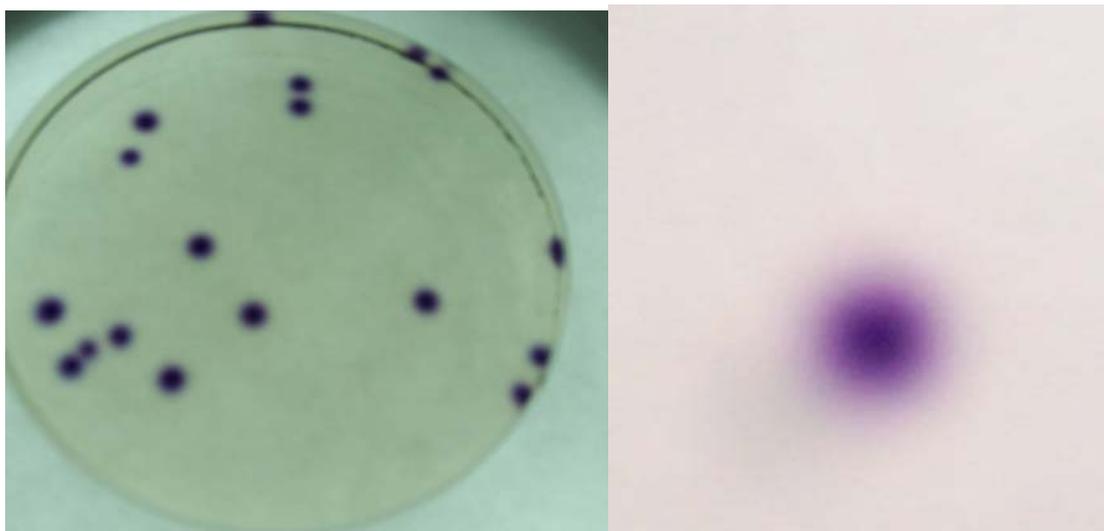


圖 1.標準菌株 *Escherichia coli* ATCC25922 在酵素色質性培養基生長

菌落：深藍色至紫色菌落

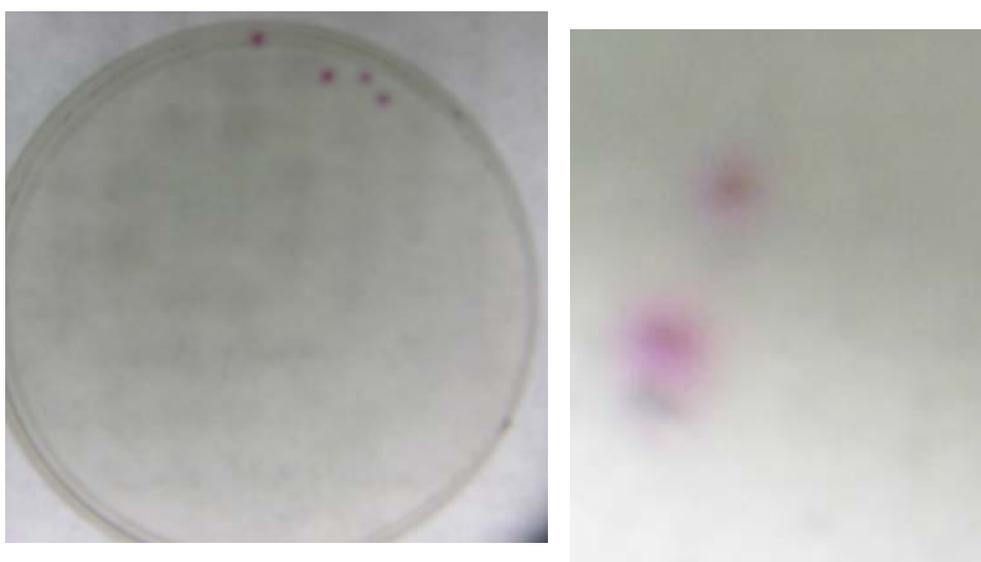


圖 2 標準菌株 *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 在酵素色質性培養

基生長菌落：紅色菌落

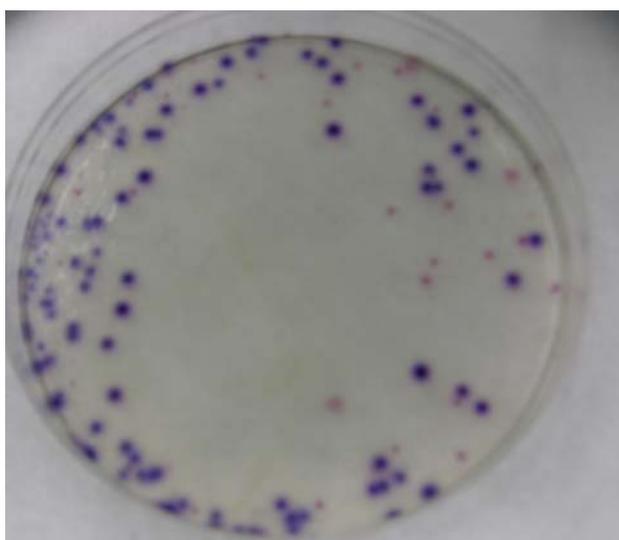


圖 3 標準菌株 *Escherichia coli* ATCC 25922、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 及 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 三混菌在酵素色質性培養基生長菌落

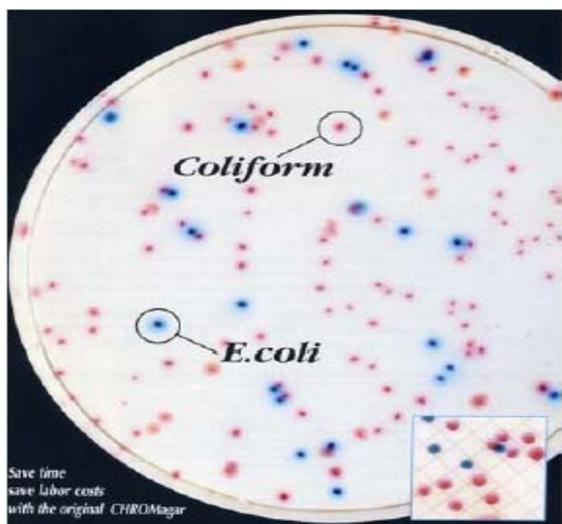


圖 4A 啓新公司 CHROMOGENIC E.coli/Coliform (ECC) AGAR (C) 檢測 E.coli/Coliform 呈色情形

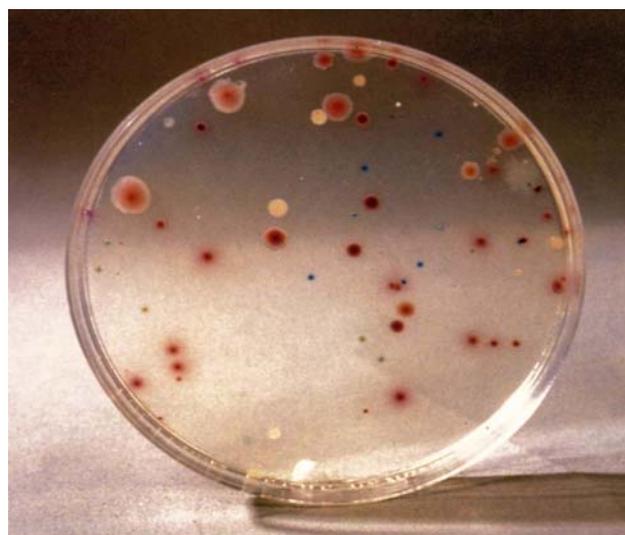


圖 4B 默克公司 Chromocult Coliform agar 檢測 E.coli/Coliform 呈色情形

表 4 以 CNS 法及 Chromocult 法檢測食品中大腸桿菌群結果

編號	樣品名稱	樣品分類	Chromocult	CNS
			Coliforms(CFU/mL)	Coliforms(MPN/mL)
1	M1	牛奶	1,800,000	>110,000
2	M2	牛奶	5,400,000	>110,000
3	M3	牛奶	41,000	46,200.00
4	M4	牛奶	4,400	4,270.00
5	M5	牛奶	690	933.00
6	M6	牛奶	150	42.70
7	M7	牛奶	14	23.10
8	S00	豆漿	0	0.00
9	S01	豆漿	2	0.74
10	S02	豆漿	>30,000,000	>110,000
11	S03	豆漿	2,600	2,400.00
12	S04	豆漿	1,000	933.00
13	S05	豆漿	160	240.00
14	S06	豆漿	37	4.27
15	S07	豆漿	5	2.31
16	TOO	水	1,150	4,270.00
17	TO5	水	17	14.90
18	TO1	水	4	9.33
19	K10	水	1,160	9,330.00
20	K01	水	115	427.00
21	E10	水	180,000	110,000.00
22	KN	水	68,000	46,200.00
23	KO	水	0	0.00
24	P10	水	0	0.00
25	ME1	豬絞肉	4,400	24,000.00
26	ME2	豬絞肉	290	427.00
27	ME3	豬絞肉	30	42.70
28	ME4	豬絞肉	20	42.70
29	F4	水餃	1,800	2,310.00
30	F5	水餃	1,200	933.00
31	E1	水餃	570	93.30
32	E2	水餃	500	93.30
33	E3	水餃	750,000	>110,000
34	E4	水餃	410,000	>110,000
35	E5	水餃	25,000	14,900.00
36	E6	水餃	75,000	>110,000

續表 4 以 CNS 法及 Chromocult 法檢測食品中大腸桿菌群結果

編號	樣品名稱	樣品分類	Chromocult	CNS
			Coliforms(CFU/mL)	Coliforms(MPN/mL)
37	A1	火鍋料	180	14.7
38	A2	火鍋料	390,000	>110,000
39	A3	火鍋料	900	2310
40	A4	火鍋料	120	240.00
41	A5	火鍋料	10	42.7
42	A6	火鍋料	60	38.50

附錄A：相關分析

表 5：chromocult 法和 CNS 法檢測結果取對數值

樣品名稱	樣品分類	Log ₁₀ X (chromocult法) CFU/mL(g)	Log ₁₀ Y (CNS法) MPN/mL(g)
M3	牛奶	4.6128	4.6646
M4	牛奶	3.6435	3.6304
M5	牛奶	2.8388	2.9699
M6	牛奶	2.1761	1.6304
M7	牛奶	1.1461	1.3636
S00	豆漿	1.0000	1.0000
S03	豆漿	3.4150	3.3802
S04	豆漿	3.0000	2.9699
S05	豆漿	2.2041	2.3802
S06	豆漿	1.5682	0.6304
S07	豆漿	0.6990	0.3636
TOO	水	3.0607	3.6304
TO5	水	1.2304	1.1732
TO1	水	0.6021	0.9699
K10	水	3.0645	3.9699
K01	水	2.0607	2.6304
E10	水	5.2553	5.0414
KN	水	4.8325	4.6646
KO	水*	1.0000	1.0000
P10	水*	1.0000	1.0000
ME1	豬絞肉	3.6435	4.3802
ME2	豬絞肉	2.4624	2.6304
ME3	豬絞肉	1.4771	1.6304
ME4	豬絞肉	1.3010	1.6304
F4	水餃	3.2553	3.3636
F5	水餃	3.0792	2.9699
E1	水餃	2.7559	1.9699
E2	水餃	2.6990	1.9699
E5	水餃	4.3979	4.1732
A1	火鍋料	2.2553	1.1673
A3	火鍋料	2.9542	3.3636
A4	火鍋料	2.0792	2.3802
A5	火鍋料	1.0000	1.6304
A6	火鍋料	1.7782	1.5855

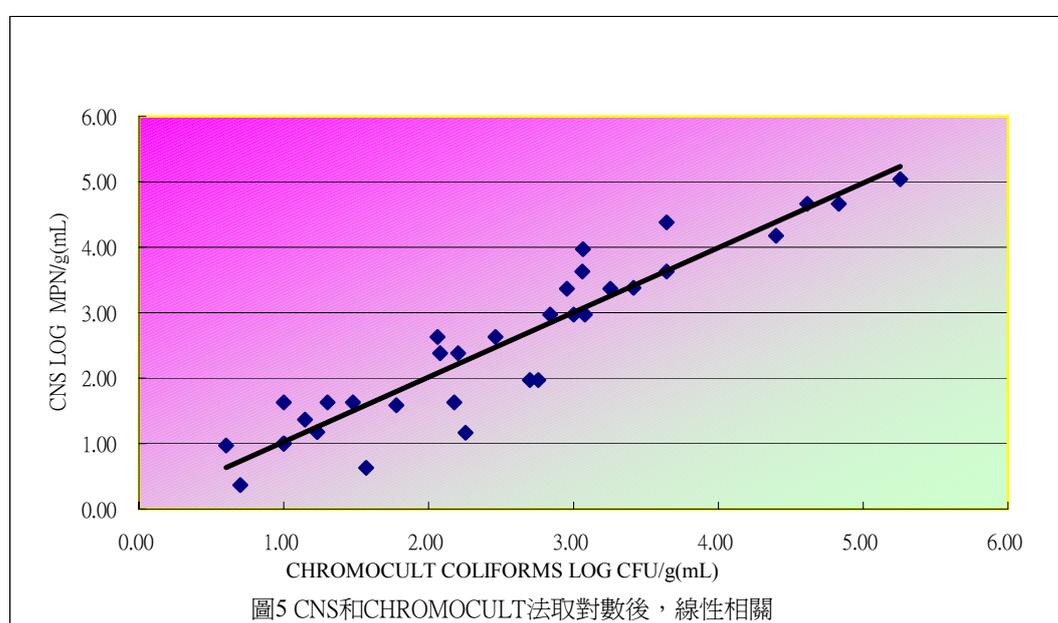
註：*表檢測結果為 0 CFU/mL(g)或 0 MPN/ mL(g)，令其對數值為 1，以便於統計分析

(1) 利用 Excel 計算其共變數結果如下

	X	Y
X	1.485028	
Y	1.468519	1.654092

由上分析結果可知 X 與 Y 的共變數為： $S(X, Y)=1.654092$ ，X 與 Y 之間為正相關

(2) XY 散佈圖



由 XY 散佈圖可見 chromocult 法檢測結果和 CNS 法檢測結果存在直線相關

(3) 利用 Excel 計算其相關係數結果如下

	X	Y
X	1	
Y	0.936985	1

由上分析結果可知其 chromocult 法檢測結果和 CNS 法檢測結果其相關係數(皮爾森相關係數)0.936985，二方法間存在線性相關

(4) 相關係數的假設檢定

$H_0: \rho = 0$ (X與Y無線性相關) ($\alpha = 0.05$, 雙尾, 樣本數 $n=34$)

$H_1: \rho \neq 0$ (X與Y有線性相關)

檢定結果如下：

利用 F-test 來檢定

$$F = \frac{r^2 / 1}{(1-r^2) / (n-2)} = \frac{0.8779}{0.0038} = 231.0263 \quad (df_1=1, df_2=n-2)$$

$$F = 231.0263 > F_{0.01(1,32)} = 7.49923 \quad p < 0.01$$

差異顯著，故拒絕 H_0 ，表示相關係數 $\rho \neq 0$ ，即 X 與 Y 可能有線性相關。

附錄B：配對t-檢定(paired t-test)

表 6：chromocult 法檢測結果之對數值(chromocult Log CFU/mL(g))和 CNS 法檢測結果之對數值(CNS Log MPN/mL(g))及二方法檢測結果對數差

樣品名稱	樣品分類	Log ₁₀ X (chromocult法) CFU/mL(g)	Log ₁₀ Y (CNS法) MPN/mL(g)	$ X - Y = d$
M3	牛奶	4.6128	4.6646	0.0519
M4	牛奶	3.6435	3.6304	0.0130
M5	牛奶	2.8388	2.9699	0.1310
M6	牛奶	2.1761	1.6304	0.5457
M7	牛奶	1.1461	1.3636	0.2175
S00	豆漿	1.0000	1.0000	0.0000
S01	豆漿	0.3010	-0.1331	0.4342
S03	豆漿	3.4150	3.3802	0.0348
S04	豆漿	3.0000	2.9699	0.0301
S05	豆漿	2.2041	2.3802	0.1761
S06	豆漿	1.5682	0.6304	0.9378
S07	豆漿	0.6990	0.3636	0.3354
TOO	水	3.0607	3.6304	0.5697
TO5	水	1.2304	1.1732	0.0573
TO1	水	0.6021	0.9699	0.3678
K10	水	3.0645	3.9699	0.9054
K01	水	2.0607	2.6304	0.5697
E10	水	5.2553	5.0414	0.2139
KN	水	4.8325	4.6646	0.1679
KO	水*	1.0000	1.0000	0.0000
P10	水*	1.0000	1.0000	0.0000
ME1	豬絞肉	3.6435	4.3802	0.7368
ME2	豬絞肉	2.4624	2.6304	0.1680
ME3	豬絞肉	1.4771	1.6304	0.1533
ME4	豬絞肉	1.3010	1.6304	0.3294
F4	水餃	3.2553	3.3636	0.1083
F5	水餃	3.0792	2.9699	0.1093
E1	水餃	2.7559	1.9699	0.7860
E2	水餃	2.6990	1.9699	0.7291
E5	水餃	4.3979	4.1732	0.2248
A1	火鍋料	2.2553	1.1673	1.0880
A3	火鍋料	2.9542	3.3636	0.4094
A4	火鍋料	2.0792	2.3802	0.3010
A5	火鍋料	1.0000	1.6304	0.6304
A6	火鍋料	1.7782	1.5855	0.1927

註：*表檢測結果為 0 CFU/mL(g)或 0 MPN/ mL(g)，令其對數值為 1，以便於統計分析

(1)提出無效假設(H_0)及對立假設(H_1)

假設chromocult法檢測結果之對數值(chromocult Log CFU/mL(g))

和CNS法檢測結果之對數值(CNS MPN/mL(g))之檢測結果差d的分配為

常態分佈，且二者無差異（即為 $\mu_d=0$ ）， $\alpha=0.05$

即 $H_0: \mu_d=0$ (假設二方法無差異)

$H_1: \mu_d \neq 0$

(2)利用 Excel 軟體計算分析結果如下

表 7 t 檢定：成對母體平均數差異檢定結果

	4.612783857	4.664642
平均數	2.330472005	2.326776
變異數	1.513558833	1.742474
觀察值個數	34	34
皮耳森相關係數	0.936612838	
假設的均數差	0	
自由度	33	
t 統計	0.046596016	
P(T<=t) 單尾	0.481558028	
臨界值：單尾	1.692360456	
P(T<=t) 雙尾	0.963116057	
臨界值：雙尾	2.03451691	

(3)依據分析結果，作統計推斷

I 機率值= $P(|t| > 2.03451691) = 0.963116057 > \alpha = 0.05$

差異不顯著，故接受 H_0 ，表示二方法無顯著差異

II $t = 0.046596016 < \text{臨界值} = 2.03451691$

差異不顯著，故接受 H_0 ，表示二方法無顯著差異

III Chromocult 法及 CNS(MPN)法其檢測結果之對數值，其皮耳森相

關係數 (pearson's correlation coefficient, r) 為
0.936612838，二者相關性非常高。