

# 生乳樣品使用不同抑菌保存劑及保存條件對於自動生菌數分析儀檢驗能力試驗樣品穩定度之影響<sup>(1)</sup>

陳珮彤<sup>(2)</sup> 楊明桂<sup>(2)</sup> 葉亦馨<sup>(2)</sup> 陳怡璇<sup>(2)</sup> 涂柏安<sup>(2)(3)</sup>

收件日期：114 年 5 月 5 日；接受日期：114 年 8 月 1 日

## 摘 要

臺灣生乳的等級以體細胞數及總生菌數進行評級。若酪農單月生乳中的總生菌數 > 30 萬 /mL 達 3 次，且全年累計達兩個月時，乳品廠得取消收乳契約。總生菌數的高低會影響乳品廠與酪農的收益，發展可靠的總生菌數檢驗能力比對有助於維持生乳計價公平性及廠農間的互信。因此，本研究評估疊氮化二醇 (Azidiol, AZ) 及溴硝丙二醇 (Bronopol, BR) 於不同保存溫度 (4、25 及 37°C) 及保存天數 (0 – 7 天) 對生乳樣品總生菌數之影響，確保總生菌數分析之穩定度。本研究僅針對分析用樣品之保存進行探討，非食品添加應用。實驗中使用 FOSS BactoScan FC 自動生菌數分析儀 (FC) 收集不同保存時間之個別菌落數對數值 (logarithm of individual bacterial count,  $\log_{10}IBC$ )。結果顯示，未添加抑菌保存劑組於 4°C 下可穩定  $\log_{10}IBC$  7 天，其數值與對照組無顯著差異；在 4°C，AZ 與 BR 均可在 7 天內穩定生乳  $\log_{10}IBC$ ，其數值與對照組無顯著差異；在 25°C，AZ 僅可以穩定  $\log_{10}IBC$  1 天，而 BR 可於 2 日內維持  $\log_{10}IBC$ ；在 37°C，AZ 僅於保存當天有效，而 BR 則可穩定  $\log_{10}IBC$  2 天，而後隨著保存天數增加，兩者之總生菌數顯著增加。綜上所述，冷藏狀態下，AZ 與 BR 皆為保存生乳樣品之良好選擇；若預期配送過程可能失溫，建議使用 BR 進行樣品保存，且仍建議應於能力試驗辦理單位之指定檢驗日盡速檢測完畢，以維持  $\log_{10}IBC$  檢測之數據穩定度。

關鍵詞：疊氮化二醇、溴硝丙二醇、自動生菌數分析儀。

## 緒 言

### I. 辦理總生菌數能力試驗比對緣由

自 1999 年 6 月起，我國開始以總生菌數作為生乳品質的評級項目。當總生菌數超過 30 萬 /mL 時，會給予酪農警告或是扣款，促使其盡速改善生乳衛生；而當總生菌數超過 30 萬 /mL 的次數於一個月內達 3 次以上時，乳品廠則可能會與酪農取消收乳契約 (農業部, 1999)。然而，夏季生乳收購價及市場價格皆較冬季高，若生乳總生菌數過高的話不僅會影響乳品廠的利潤，也會直接影響酪農的收益。Verdier-Metz *et al.* (2009) 指出，乳腺健康、擠乳前後處理、擠乳機設備及空氣都有可能影響生乳中的總生菌數含量。此外，因著我國近年來逐漸引進自動化擠乳設備，截至 111 年底止臺灣約有 10 戶牧場使用自動擠乳設備 (葉等, 2024)，在設備引進的初期可能有生乳中的總生菌數上升的現象 (Castro *et al.*, 2017)，造成生乳中的總生菌數再次成為討論議題。因此，為了維護乳品廠與酪農間的信任，應定期舉辦品管實驗室間及第三方公正單位的總生菌數檢驗能力試驗活動，同時評估可以有效維持能力試驗，生乳總生菌數穩定至試驗指定檢測日 (配送日約 2 日) 之抑菌保存劑配方，避免能力試驗樣品於寄送時，因保存條件不佳造成的檢測差異。

### II. 總生菌數檢驗介紹

牛乳是一種營養成分相當高的乳製品，正因其富含營養，因此也常作為細菌生長的培養基，如乳球菌 (*Lactococcus*)、乳鏈球菌 (*Streptococcus*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、大腸桿菌 (*Escherichia*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas*) 及芽孢桿菌 (*Bacillus*) 等，皆為牛乳中常見的菌種 (Wang *et al.*, 2023)。目前常見用於檢驗食品中總

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2835 號。

(2) 農業部畜產試驗所北區分所。

(3) 通訊作者，E-mail: tpa@mail.tlri.gov.tw。

生菌數的方法是使用標準菌落計數 (total plate count, TPC)，可知食品樣本中的活菌數目，總生菌數以每毫升菌落形成單位 (colony-forming unit, CFU) 表示。然而，標準菌落計數因培養時間需要至少 2 天，無法快速確認生菌的數量之外，此法亦無法得知菌種的種類，甚至有部分菌種不會在培養基上生長，如厭氧菌等 (Brackett, 1993)。因此，目前乳品加工廠大規模進行生乳總生菌數的每日例行快速檢測主要依賴 FOSS BactoScan FC (Foss Analytical, Hillerød, Denmark) (下稱 FC) 自動化儀器。FC 檢測總生菌數是透過流式細胞分析原理 (flow cytometry)，將生乳樣本以溴化乙錠染色，經雷射光束照射使細菌產生螢光訊號進行定量。染色的細菌會發出紅光，藉此定量並計算個別菌落數 (individual bacterial count, IBC)，其結果以 IBC 表示 (Cassoli *et al.*, 2010a; Loss *et al.*, 2012; FOSS, 2013)。根據 Gunasekera *et al.* (2000) 指出，牛乳中的初始總生菌數的含量、蛋白質球、細菌染劑的選擇都可能影響 FC 檢驗結果。因此，透過細菌的螢光與散射程度，FC 可以量化細菌顆粒大小與特性 (Marutescu *et al.*, 2023)。

### III. AZ 與 BR 的介紹

添加抑菌保存劑指可抑制或延緩微生物生長，用於樣本保存期間維持檢體穩定性之化學物質，是現今常用於延長食品保存期限的其中一種方法。市面上可用於實驗室樣品的抑菌保存劑種類繁多，包含無水醋酸鈉、胺基乙酸、乳酸鈉及葡萄糖酸內酯等。然而，過去已有文獻指出使用疊氮化二醇 (Azidiol, AZ) 及溴硝丙二醇 (Bronopol, BR) 可有效進行生乳樣品的保存 (Sierra *et al.*, 2009)。AZ 是疊氮化鈉 (Sodium azide,  $\text{NaN}_3$ ) 與氯黴素 (Chloramphenicol) 的混合物，是一種無色、無味且水溶性的物質，可用於預防細菌的污染 (Chang and Lamm, 2003; Russo *et al.*, 2007)。AZ 成分中的氯黴素會透過與細菌中的核糖體結合，阻斷蛋白質合成，進而抑制細菌，主要是革蘭氏陽性菌、革蘭氏陰性菌與厭氧菌的生長 (Oong and Tadi, 2023)。而疊氮化鈉則是透過抑制厭氧菌的硝酸還原酶，進而減緩微生物菌群的活性 (Hendrix *et al.*, 2019)。然而，疊氮化鈉具有毒性，可作為診斷醫藥防腐劑之用，依《毒性及關注化學物質管理法》規定不得作為食品添加物使用，僅能於非食用檢體中添加。此外，疊氮化鈉無法在環境中分解，因此有使用上的疑慮 (Vigolo *et al.*, 2022)。而 BR 則是一種相對無腐蝕性的保存劑，特性是無色無味且易溶於水，為廣效性的抑菌保存劑，尤其針對革蘭氏陰性菌與陽性菌，因此常被添加在化妝品或是藥品中 (Bryce *et al.*, 1978; Shepherd *et al.*, 1988)。BR 透過促進氧化微生物細胞膜上硫醇並產生自由基，造成細胞死亡 (Singh and Gandhi, 2015)。

本研究期望於分析總生菌數用之生乳樣品中添加抑菌保存劑，降低牛乳總生菌數檢驗能力試驗時，因比對樣品運送或保存條件不佳，造成可能的檢測誤差，藉由測試不同抑菌保存劑，AZ 與 BR 和不同保存溫度條件 (4、25 及 37°C) 對生乳樣品的總生菌數保存穩定度的影響，確認穩定的保存方法，以便在乳品廠與牛乳檢驗室之間進行 IBC 檢測能力試驗。因此，本研究所採用之抑菌保存劑僅供實驗室分析樣品保存用途，以避免因檢體配送與保存過程之溫度變異導致總生菌數檢測結果失真，並非作為食品添加物使用。透過使用 FC 檢驗生乳 IBC，收集各保存天數的數據，以評估抑菌保存劑在不同保存條件下對生乳的 IBC 檢測穩定性的影響。

## 材料與方法

### I. 樣本採集及藥品配製

AZ 與 BR 之配方及添加量根據 Sierra 等人 (2009)，AZ 的配製以添加疊氮化鈉 1.8 g、氯黴素 0.075 g、乙醇 (ethanol) 1 mL、三水檸檬酸鈉 (sodium citrate tribasic hydrate) 4.5 g 及溴酚藍 (bromophenol blue) 0.035 g 並溶於 100 mL 的滅菌水中，並根據 Sierra 等人 (2009) 於每 20 mL 牛乳添加 66  $\mu\text{L}$  的 AZ。其中 AZ 中所添加之疊氮化鈉為強效抑菌劑，常用於微生物樣品保存中。根據 Merck 安全資料表 (Cat No. 6B7591) (Merck, 2016) 指出其具急性毒性 (大鼠致死劑量 = 27 mg/kg)，屬於需妥善處理與廢液收集的化學品。本研究中疊氮化鈉濃度經稀釋後為 59.4 ppm，低於多數實驗文獻中用作防腐劑之濃度 ( $\leq 0.02\%$ )，操作過程依據實驗室化學品處理規範進行。BR 配製則是將 5 g 的 2- 溴 -2- 硝基 -1,3- 丙二醇 (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) 加入 100 mL 的滅菌水中，並加入亞甲基 (Methylene) 0.05 g，並且根據 Sierra 等人 (2009) 每 20 mL 牛乳添加 80  $\mu\text{L}$  的 BR。BR 劑量根據衛生福利部食品藥物管理署之規範，其作為化妝品防腐劑之使用限制量為 0.1% (衛生福利部, 2019)，本試驗所使用 BR 劑量遠低於該規範。本試驗使用無菌採樣瓶收集農業部畜產試驗所北區分所生乳共 12,960 mL，並分成三個處理組各 216 瓶 (每瓶 20 mL)，每個處理組皆有 3 重複：未添加抑菌保存劑 (Non preservative, NP)、添加 0.33% AZ 組和添加 0.4% BR 組。樣本在不同保存溫度條件 (4、25 及 37°C) 及不同天數 (0 至 7 天)，放置於 37°C 水浴槽回溫 10 分鐘後進行檢測。

## II. 數據收集與分析

試驗期間每日上午取出 NP、AZ 及 BR 各一樣本以 FC 進行 IBC 分析。初始 IBC 數值將進行標準對數  $\log_{10}IBC$  換算，建立以下統計模型以探討保存條件對  $\log_{10}IBC$  的影響：

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + D_k + SP_{ij} + SPD_{ijk} + e_{ijkl}$$

其中  $Y_{ijkl}$  為每毫升 IBC  $\log$  轉換值 (logarithm of individual bacterial count,  $\log_{10}IBC$ )； $\mu$  為平均值； $S_i$  為保存溫度； $P_j$  為抑菌保存劑種類； $D_k$  為保存天數； $SP_{ij}$  為保存溫度與抑菌保存劑種類之交互作用； $SPD_{ijk}$  保存溫度、抑菌保存劑保存天數之交互作用； $e_{ijkl}$  為隨機殘差效應。進一步分析樣本保存溫度、抑菌保存劑種類、保存天數等因子對  $\log_{10}IBC$  的影響，以 NP 4 第 0 天作為  $\log_{10}IBC$  的初始值，並透過變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 確認處理組之間統計差異。若 ANOVA 結果達顯著水準 ( $P < 0.05$ )，則進一步執行 Tukey's Honest Significant Difference (HSD) 事後檢定，以比較各處理間之平均數差異。此外，為了確定生乳樣品的檢驗穩定性，本試驗各樣品重複 3 次，並根據 1999 年國際乳業聯盟所發布之 IDF standard 128A (IDF, 1999) 中計算重複性標準偏差 (standard deviations of the repeatability,  $s_r$ )，定義為在相同條件下根據獨立結果，用以評估結果一致性程度的指標 (Slezak *et al.*, 2011)。本試驗中  $s_r$  代表樣本於 3 個重複間的穩定性。計算公式如下：

$$s_r = \left[ \frac{1}{2q} \sum_{i=1}^q W_i^2 \right]^{1/2}$$

$$s_r \% = s_r \times \frac{100}{\bar{X}}$$

其中， $q$  為樣品數； $W_i$  為樣品間 IBC 之差異絕對值； $\bar{X}$  為 IBC 算術平均數。

## 結 果

實驗室間生乳中總生菌數能力試驗比對之目標為確保整體生乳產業可進行準確的 IBC 檢測，4°C NP 第 0 天 (NP4 - 0) 為乳品樣本 IBC 之初始值，將此組別作為對照組，期望能夠透過添加抑菌保存劑於乳品樣本中，找到不同的抑菌添加劑配方對於不同保存溫度及保存天數下的穩定性。表 1 結果顯示，抑菌保存劑的種類、保存溫度、保存天數及三者之交互作用皆會顯著地影響 IBC ( $P < 0.05$ )。因交互作用顯著，故本研究分別分析 4、25 及 37°C 三種保存溫度下不同抑菌保存劑對  $\log_{10}IBC$  之影響。

### I. 以 4°C 保存並添加不同抑菌保存劑對牛乳中 $\log_{10}IBC$ 的影響

表 1 及圖 1A 結果顯示，NP、AZ 及 BR 組的  $\log_{10}IBC/mL$  於 4°C 保存 7 天 (NP4 - 7、AZ4 - 7 與 BR4 - 7) 其  $\log_{10}IBC$  與 NP4 - 0 無顯著差異 (NP4 - 0、AZ4 - 7 與 BR4 - 7 分別為  $4.75 \pm 0.02$ 、 $4.75 \pm 0.01$  與  $4.52 \pm 0.06$   $\log_{10}IBC/mL$ )。表 2 則顯示 NP、AZ 與 BR 組的  $\log_{10}IBC$  在不同天數的  $S_r$ ，結果顯示 NP 組 0 - 7 天的  $S_r$  平均為 0.027、AZ 組  $S_r$  均值為 0.038；而 BR 組  $S_r$  均值則為 0.058。

### II. 以 25°C 保存並添加不同抑菌保存劑對牛乳中 $\log_{10}IBC$ 的影響

表 1 及圖 1B 顯示 NP、AZ 及 BR 三組在 25°C 保存 0 天 (NP25 - 0、AZ25 - 0 與 BR25 - 0)，與 NP4 - 0  $\log_{10}IBC$  無顯著差異 (NP4 - 0 為  $4.75 \pm 0.02$   $\log_{10}IBC/mL$ ；NP25 - 0 為  $5.04 \pm 0.01$   $\log_{10}IBC/mL$ ；AZ25 - 0 為  $4.80 \pm 0.02$   $\log_{10}IBC/mL$ ；BR25 - 0 為  $4.46 \pm 0.03$   $\log_{10}IBC/mL$ )。然而，當以 25°C 使用 AZ 並使用 FC 檢驗之  $\log_{10}IBC$  則顯示，AZ 可在 25°C 下維持  $\log_{10}IBC$  1 天，並於第 2 天開始顯著高於 NP4 - 0 (AZ25 - 1 為  $4.79 \pm 0.0$   $\log_{10}IBC/mL$  3；AZ25 - 2 為  $6.06 \pm 0.59$   $\log_{10}IBC/mL$ )。而在 BR 部分，與 25°C AZ 組之結果相似，BR 可在 25°C 維持  $\log_{10}IBC$  2 日 ( $5.03 \pm 0.07$   $\log_{10}IBC/mL$ )，其數值與對照組無顯著差異。表 2 顯示，25°C NP 組在保存第 0 天及第 1 天其  $\log_{10}IBC$  值之  $S_r$  分別為 0.007 及 0.021，均值為 0.014；在 25°C AZ 組  $S_r$  均值為 0.131；而 25°C BR 組則在保存 0 - 7 天之  $S_r$  均值為 0.042。

### III. 以 37°C 保存並添加不同抑菌保存劑對牛乳中 $\log_{10}IBC$ 的影響

若以 37°C 保存 NP、AZ 及 BR 三組時，FC 結果顯示 (表 1 及圖 1C)，NP37 - 0 已經在第 0 天  $\log_{10}IBC$  會顯著上升，而 AZ 與 BR 尚可以維持第 0 天  $\log_{10}IBC$  (AZ37 - 0 與 BR37 - 0 分別為  $4.79 \pm 0.06$  與  $4.46 \pm 0.03$   $\log_{10}IBC/mL$ )。當保存 1 天後，AZ 組的  $\log_{10}IBC$  (AZ37 - 1) 開始顯著提升 ( $6.79 \pm 0.021$   $\log_{10}IBC/mL$ )；而 BR 組的  $\log_{10}IBC$  在 FC 的部分顯示  $\log_{10}IBC$  在保存 2 天內無顯著差異。重複性標準偏差 (表 2) 顯示，37°C NP 組第 0 天之  $S_r$  為 0.069；37°C AZ 組第 0 - 2 天  $S_r$  均值為 0.046；37°C BR 組 0 - 2 天之  $S_r$  均值為 0.049。

表 1. 生乳樣本在不同保存溫度與抑菌保存劑下保存 0 – 7 天並透過 FOSS BactoScan FC 檢測之個別菌落數對數值

Table 1. Effect of different temperature and preservatives for 0-7 storage days on logarithm of individual bacterial count ( $\log_{10}$ IBC, mean  $\pm$  standard deviation) of raw milk by FOSS BactoScan FC

Day Treatment	Storage Days and $\log_{10}$ IBC							
	0	1	2	3	4	5	6	7
NP4	4.75 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	4.75 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	4.79 $\pm$ 0.02d	4.77 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	4.74 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	4.75 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	4.70 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	4.75 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
AZ4	4.74 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.77 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	4.77 $\pm$ 0.01d	4.74 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	4.58 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	4.74 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	4.77 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	4.75 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
BR4	4.52 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	4.48 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	4.52 $\pm$ 0.02d	4.45 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	4.23 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	4.58 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	4.47 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	4.52 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
NP25	5.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	8.16 $\pm$ 0.03 <sup>a*</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AZ25	4.80 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	4.79 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	6.06 $\pm$ 0.59 <sup>b*</sup>	6.69 $\pm$ 0.17 <sup>a*</sup>	7.25 $\pm$ 0.06 <sup>a*</sup>	7.86 $\pm$ 0.01 <sup>a*</sup>	8.01 $\pm$ 0.13 <sup>a*</sup>	8.06 $\pm$ 0.02 <sup>a*</sup>
BR25	4.48 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	4.44 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	5.03 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	6.06 $\pm$ 0.04 <sup>b*</sup>	6.52 $\pm$ 0.02 <sup>b*</sup>	6.74 $\pm$ 0.03 <sup>b*</sup>	6.88 $\pm$ 0.03 <sup>b*</sup>	7.11 $\pm$ 0.05 <sup>b*</sup>
NP37	5.82 $\pm$ 0.06 <sup>a*</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AZ37	4.79 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	6.79 $\pm$ 0.02 <sup>b*</sup>	8.05 $\pm$ 0.09 <sup>a*</sup>	NA	NA	NA	NA	NA
BR37	4.46 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	4.30 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	4.30 $\pm$ 0.07d	NA	NA	NA	NA	NA

NP4 = Raw milk stored at 4°C without preservative; AZ4 = Raw milk stored at 4°C with 0.33% Azidiol (sodium azide + chloramphenicol); BR4 = Raw milk stored at 4°C with 0.40% Bronopol (2-bromo-2-nitro-1, 3-propanediol); NP25 = Raw milk stored at 25°C without preservative; AZ25 = Raw milk stored at 25°C with 0.33% Azidiol; BR25 = Raw milk stored at 25°C with 0.40% Bronopol; NP37 = Raw milk stored at 37°C without preservative; AZ37 = Raw milk stored at 37°C with 0.33% Azidiol; BR37 = Raw milk stored at 37°C with 0.40% Bronopol.

\* indicates a significant difference compared with NP4-0 ( $P < 0.05$ ).

<sup>a, b, c, d</sup> indicates a significant difference between preservatives and temperature at the same storage day ( $P < 0.05$ ).

NA (Not Available) indicates the sample had deteriorated or cannot be analyzed.

表 2. 生乳樣本在不同保存溫度與抑菌保存劑下保存 0 - 7 天並透過 FOSS BactoScan FC 檢測之個別菌落數對數值之最小平方均值與重複性標準偏差

Table 2. Least square mean and standard deviations of the repeatability ( $S_r$ ) of logarithm of individual bacterial count ( $\log_{10}$ IBC) in raw milk samples stored at different temperatures and preservatives for 0-7 days by FOSS BactoScan FC

Day	NP4°C				NP25°C				NP37°C			
	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %
0	4.75	0.012	0.260	5.04	0.007	0.142	5.82	0.069	1.188			
1	4.75	0.020	0.420	8.16	0.021	0.263						
2	4.79	0.013	0.265									
3	4.77	0.013	0.281									
4	4.73	0.073	1.540									
5	4.75	0.017	0.356									
6	4.70	0.013	0.275									
7	4.75	0.061	1.280									
Average		0.028	0.585		0.014	0.203		0.069	1.188			
Day	AZ4°C				AZ25°C				AZ37°C			
	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %
0	4.74	0.006	0.119	4.81	0.052	1.081	4.79	0.059	1.234			
1	4.77	0.059	1.227	4.79	0.027	0.572	6.79	0.019	0.276			
2	4.77	0.010	0.218	6.07	0.630	10.386	8.05	0.060	0.750			
3	4.74	0.041	0.856	6.69	0.134	1.997						
4	4.58	0.164	3.584	7.25	0.076	1.043						
5	4.74	0.009	0.189	7.86	0.011	0.143						
6	4.77	0.013	0.280	8.01	0.101	1.266						
7	4.75	0.009	0.180	8.06	0.018	0.219						
Average		0.039	0.832		0.131	2.088		0.046	0.753			

表 2. 生乳樣本在不同保存溫度與抑菌保存劑下保存 0 – 7 天並透過 FOSS BactoScan FC 檢測之個別菌落數對數值之最小平方均值與重複性標準偏差 (續)

Table 2. Least square mean and standard deviations of the repeatability ( $S_r$ ) of logarithm of individual bacterial count ( $\log_{10}$ IBC) in raw milk samples stored at different temperatures and preservatives for 0-7 days by FOSS BactoScan FC (continued)

Day	BR4°C			BR25°C			BR37°C		
	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %	LSM	$S_p$ , log units	$S_r$ %
0	4.52	0.023	0.515	4.48	0.091	2.022	4.46	0.031	0.696
1	4.48	0.031	0.689	4.44	0.016	0.349	4.30	0.032	0.740
2	4.52	0.019	0.431	5.03	0.059	1.164	4.30	0.085	1.968
3	4.45	0.033	0.744	6.06	0.042	0.701			
4	4.23	0.140	3.321	6.52	0.014	0.214			
5	4.58	0.127	2.764	6.74	0.038	0.570			
6	4.47	0.016	0.366	6.88	0.031	0.444			
7	4.52	0.077	1.707	7.11	0.046	0.641			
Average		0.058	1.317		0.042	0.763		0.049	1.135

NP4 = Raw milk stored at 4°C without preservative; AZ4 = Raw milk stored at 4°C with 0.33% Azidol (sodium azide + chloramphenicol); BR4 = Raw milk stored at 4°C with 0.40% Bronopol (2-bromo-2-nitro-1, 3-propanediol); NP25 = Raw milk stored at 25°C without preservative; AZ25 = Raw milk stored at 25°C with 0.33% Azidol; BR25 = Raw milk stored at 25°C with 0.40% Bronopol; NP37 = Raw milk stored at 37°C without preservative; AZ37 = Raw milk stored at 37°C with 0.33 % Azidol; BR37 = Raw milk stored at 37°C with 0.40% Bronopol.

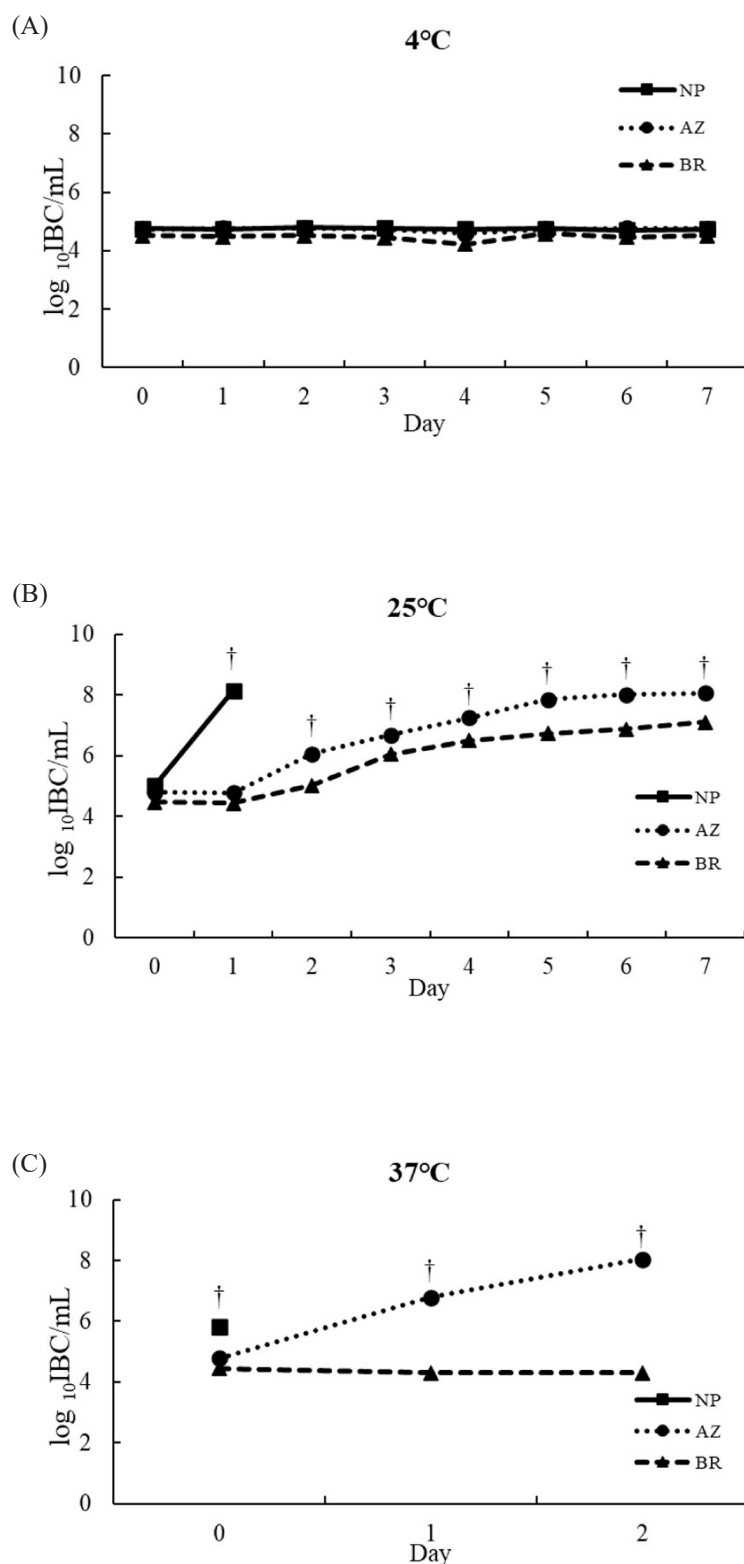


圖 1. 生乳樣本於不同保存溫度及抑菌保存劑保存 0 – 7 天並透過 FOSS BactoScan FC 檢測個別菌落數對數值之變化。生乳樣本保存於 (A) 4°C、(B) 25°C 及 (C) 37°C 下 0 – 7 天的個別菌落數對數值變化。

Fig. 1. Effect of different temperature and preservatives for 0-7 storage days on logarithm of individual bacterial count ( $\log_{10}$  IBC) of raw milk by FOSS BactoScan FC. Logarithm of individual bacterial count ( $\log_{10}$  IBC) changes in raw milk samples stored at 4°C (A), 25°C (B) and 37°C (C) for 0-7 days. †  $p < 0.05$  is determined by two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. NP4 = Raw milk stored at 4°C without preservative; AZ4 = Raw milk stored at 4°C with 0.33% Azidiol (sodium azide + chloramphenicol); BR4 = Raw milk stored at 4°C with 0.40% Bronopol (2 bromo 2 nitro 1,3 propanediol); NP25 = Raw milk stored at 25°C without preservative; AZ25 = Raw milk stored at 25°C with 0.33% Azidiol; BR25 = Raw milk stored at 25°C with 0.40% Bronopol; NP37 = Raw milk stored at 37°C without preservative; AZ37 = Raw milk stored at 37°C with 0.33 % Azidiol; BR37 = Raw milk stored at 37°C with 0.40% Bronopol.

## 討 論

### I. 以 4°C 保存並添加不同抑菌保存劑對牛乳中 $\log_{10}$ IBC 的影響

根據表 1 及圖 1A 結果顯示，AZ 與 BR 處理組於 4°C 保存 7 天 (AZ4 - 7 與 BR4 - 7) 後，其  $\log_{10}$ IBC 與對照組無顯著差異。Barcina *et al.* (1987) 指出，未添加抑菌保存劑之生乳樣本初始約為 40,000 IBC/mL (約 5.60  $\log_{10}$ IBC/mL)，略高於本試驗所得之 4.75  $\log_{10}$ IBC/mL。Folchini *et al.* (2023) 亦發現，初始為 10,000 CFU/mL 的樣本在 4°C 添加 AZ 保存 14 天後，其總生菌數約維持在 4.70  $\log_{10}$ IBC/mL，與本試驗相近。相對地，初始總生菌數較高 (70,800 CFU/mL) 之樣本經相同處理，其總生菌數達 5.68  $\log_{10}$ IBC/mL，因此本試驗樣本如同前人研究觀察可能屬於總生菌數較低的類型。就 NP 處理而言，Folchini *et al.* (2023) 指出，NP 在 4°C 下僅能維持  $\log_{10}$ IBC 至保存 1 天，第 3 天後即顯著上升。然而本試驗中，NP 組於第 7 天之  $\log_{10}$ IBC 與第 0 天無顯著差異，顯示結果與前人文獻觀察趨勢不同。此差異可能與本試驗初始 IBC 較低 (4.75  $\log_{10}$ IBC/mL) 或保存條件之穩定度有關。關於 AZ，相關研究 (Martins *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2009; Folchini *et al.*, 2023) 均指出，不論初始總生菌數高低，AZ 可在 4°C 下穩定保存生乳至少 7 天，與本試驗觀察結果一致。至於 BR，Grozdanovska *et al.* (2015) 使用 FC 檢驗發現，4°C 保存 10 天後 CFU/mL 減少約 45%，Wentz *et al.* (2018) 亦觀察到隨保存時間增加，IBC 出現下降的現象，與本研究觀察結果不符。然而，Martins *et al.* (2009) 指出，BR 在初始總生菌數低 ( $< 10^5$  CFU/mL) 時具穩定總生菌數之效果，但於總生菌數高 ( $> 10^6$  CFU/mL) 時則可能產生抑菌作用，因此推測本試驗中的生乳樣本的初始總生菌數可能確實較低，導致使用 FC 檢驗時未見 BR 組生乳總生菌數顯著下降之現象，BR 的效果可能會受初始總生菌數影響。綜合而言，若以 4°C 保存生乳，添加 AZ 或 BR 均能有效穩定 7 天之  $\log_{10}$ IBC，具備潛力作為能力試驗樣品之抑菌保存劑使用。

### II. 以 25°C 保存並添加不同抑菌保存劑對牛乳中 $\log_{10}$ IBC 的影響

FC 結果顯示 (表 1 及圖 1B)，NP、AZ 及 BR 三組在 25°C 保存 0 天 (NP25 - 0、AZ25 - 0 與 BR25 - 0)，與對照組  $\log_{10}$ IBC 無顯著差異。然而，當以 25°C 保存至第 2 天時，AZ 組的  $\log_{10}$ IBC 會顯著高於對照組；而添加 BR 的組別則於保存第 3 天其  $\log_{10}$ IBC 開始顯著高於 NP4 - 0。Martins *et al.* (2009) 結果顯示，使用 FC 檢驗添加 AZ 並於 25°C 下保存 2 日之樣本其 IBC 顯著增加，與本試驗時間點相似。另外，Souza *et al.* (2012) 指出，在 20°C 下以 BR 保存生乳 1 - 3 天並未影響 FC 檢驗 IBC 的含量；而在 Grozdanovska *et al.* (2015) 結果指出，在 20°C 下以 BR 保存 3 日其總生菌數會顯著高於初始值。然而，在 Cassoli *et al.* (2010a) 研究指出，在 24°C 使用 BR 保存生乳樣本 3 天開始便會顯著降低 IBC 的含量。同樣的結果在 Martins *et al.* (2009) 若初始總生菌數含量較低 ( $< 10^5$  CFU/mL) 的樣本使用 BR 進行保存時，總生菌數會在第 4 天開始顯著增加；而若使用 BR 保存初始總生菌數含量較高 ( $> 10^6$  CFU/mL) 的樣本時，會在保存第 2 天顯著增加，並有逐漸下降的趨勢。BR 在 25°C 的具有的殺菌效果與本試驗觀察結果不相同，推測可能是本試驗所使用的樣本之初始 IBC 較接近於 Martins *et al.* (2009) 中所使用之初始總生菌數含量較低 ( $< 10^5$  CFU/mL) 的樣本。

### III. 以 37°C 保存並添加不同抑菌保存劑對牛乳中 $\log_{10}$ IBC 的影響

若以 37°C 保存 NP、AZ 及 BR 三組時，FC 檢測結果顯示，NP  $\log_{10}$ IBC 於第 0 天就會顯著增加，而 AZ 可以於第 0 天維持  $\log_{10}$ IBC 的穩定。當保存 1 天後，AZ 組的  $\log_{10}$ IBC (AZ37 - 1) 開始顯著提升；而 BR 組於 FC 檢驗的結果顯示  $\log_{10}$ IBC 在保存 2 天內無明顯變化。在 Matczuk *et al.* (2012) 的研究指出，在 40°C 保存 BR 會降解，加速分解產物，如甲醇與甲酸的生成，致 BR 效力約為原本的 80%，因此 BR 可能會因為較高溫保存而造成保存能力的下降。因此，綜合本試驗結果，雖 37°C 使用 BR 保存 2 天未見  $\log_{10}$ IBC 增加，但是於保存 3 天開始生乳樣本便出現外觀上的異常，如結塊與分層等，故推論隨著保存天數增加，較高溫可能會影響 BR 的效力。因此，根據上述結果顯示，若以較高溫保存生乳比對的樣本或運送失溫達 37°C 時，AZ 建議於第 0 天完成 IBC 檢驗，而 BR 則建議於第 2 天內完成 IBC 檢驗。

### IV. 不同保存溫度保存下生乳 $\log_{10}$ IBC 的 $S_r$ 值

$S_r$  是重複性標準偏差，其定義為在相同條件下根據獨立結果，用以評估結果一致性程度的指標 (Slezak *et al.*, 2011)。因此， $S_r$  在本試驗中可作為表示 FC 進行生乳樣本之重複檢驗間個別菌落數穩定度。表 2 顯示不同保存溫度與抑菌保存劑保存 0 - 7 天之  $\log_{10}$ IBC  $S_r$ ，結果顯示 4°C 下 NP、AZ 與 BR 之  $S_r$  分別為 0.027、0.039 及 0.058；25°C 下 NP、AZ 與 BR 之  $S_r$  分別為 0.014、0.131 及 0.042；37°C 下 NP、AZ 與 BR 之  $S_r$  分別為 0.069、0.046 及 0.049。根據 Sierra *et al.* (2009) 的結果顯示，4°C 下 NP、AZ 與 BR 之  $S_r$  為 0.015、0.021 及 0.014。而樣本菌落數介於  $10^4 - 10^5$  CFU/mL 並使用 FC 檢驗，其  $S_r$  為 0.031 (Ninane *et al.*, 2000)。若  $S_r > 0.031$  則推測可能與樣本本

身變異較大有關 (Slezak *et al.*, 2011)。因此，本研究之  $S_r$  值部分高於 Sierra *et al.* (2009) 與 Ninane *et al.* (2000) 研究結果，推測可能與樣品初始總生菌數含量、樣本保存天數或環境條件影響。根據本試驗結果，AZ 之  $S_r$  值於 25°C 較 37°C 高，推測可能是因為 AZ 生乳樣本保存於此條件下總生菌數會隨著保存天數增加，均質性則從 0 至 7 日逐漸下降所致。而使用 37°C 保存時，AZ 僅能保存並測定 0 至 2 日之樣本，並於第 3 日後因腐壞結塊停止測定；而 BR 的  $S_r$  則是在 25 及 37°C 下有相似之數值，表示 BR 的保存穩定性可能較不會受到保存溫度的影響。Sierra *et al.* (2009) 之研究使用 AZ 及 BR 試驗之保存溫度僅 4 – 10°C，其  $S_r$  皆 < 0.031，故推測 AZ 在較高溫保存下，生乳中的 IBC 可能由於檢體逐漸出現腐壞造成不均勻，造成後續以 FC 進行檢測 IBC 時出現較不穩定之結果。

#### V. AZ 與 BR 在抑菌機制及其效果的差異

AZ 主要透過干擾細菌的代謝過程來實現其抑菌作用。AZ 能夠抑制細菌的呼吸鏈，特別是細胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase) 的活性，進而減少細菌的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 合成 (Roy and Rhim, 2020)。這導致了細菌能量的產生受到干擾，並直接抑制細菌的生長。與 AZ 不同，BR 的抑菌作用主要透過改變細菌細胞膜的完整性。研究表明，BR 能夠穿透細菌細胞膜並引發氧化反應，導致細胞內的生理環境失衡，進而抑制細菌的代謝活動 (Shepherd *et al.*, 1988; Sarwono *et al.*, 2019)。BR 被證實具有較高的抗菌能力，尤其能夠有效對抗多種革蘭氏陽性和陰性菌，其作用機制使得 BR 在乳品保存中具有優越的效果 (Zhang *et al.*, 2006)。AZ 的有效性受到保存條件的影響，研究指出，AZ 在室溫下的保存樣本會逐漸出現過度黏稠性，可能進一步影響牛乳的均質性和保存效果 (Wentz *et al.*, 2018)。在 37°C 的條件下，Narenkumar *et al.* (2018) 以循環冷卻水為模型，發現僅 5 – 25 ppm 的 BR 即可於 21 天內徹底抑制多菌種生物膜，雖保存目標不同，但其趨勢相似，表示 BR 可能在溫暖且營養充足介質中具有持久的抑菌能力。對於生乳樣品保存，Cassoli *et al.* (2010b) 比較 24、7 與 0°C 三種保存條件下生乳樣品，同樣指出添加 BR 的生乳樣品在 7 天內，其 IBC 始終低於 NP 或 AZ 處理；而 AZ 處理樣品若不進行冷藏保存時，IBC 反而逐日上升。

## 結 論

本試驗比較未添加抑菌保存劑 NP 及使用 AZ 與 BR 兩種抑菌保存劑，於 4、25 及 37°C 下保存 0 – 7 天並透過 FC 進行 IBC 檢驗，評估對總生菌數檢測值之影響。試驗結果顯示，於 4°C 保存 NP 可維持  $\log_{10}$ IBC 7 天，而使用 AZ 與 BR 於 4°C 保存生乳樣本  $\log_{10}$ IBC 在 7 天內皆無顯著變化；於 25°C 保存 NP 僅可維持  $\log_{10}$ IBC 0 天，而以 25°C AZ 保存 1 天與 BR 保存 2 天其  $\log_{10}$ IBC 與對照組無顯著差異；於 37°C 保存 NP 無法穩定  $\log_{10}$ IBC，37°C 下使用 AZ 保存 0 天或 BR 保存 2 天其  $\log_{10}$ IBC 與對照組無顯著差異。綜上所述，生乳樣品在配送過程中冷藏溫度穩定，在 4°C 下透過 AZ 與 BR 保存並以 FC 檢驗可穩定  $\log_{10}$ IBC 7 天；若需預防能力試驗樣品於配送過程中有失溫的現象時，建議使用 BR 進行保存可以維持其  $\log_{10}$ IBC 約 2 天，且仍應盡速檢測完畢以維持總生菌數檢測之穩定度。

## 誌 謝

本研究承農業部之研究經費【113 農科 – 2.1.2 – 畜 – 01(3)】，由北區分所牛乳檢驗室羅瑩、羅伊婷與宋春蓮小姐提供試驗方面之協助，使試驗得以順利完成，特此誌謝。

## 參考文獻

- 葉亦馨、楊明桂、蕭振文、涂柏安。2024。酪農觀點：導入自動擠乳系統後對擠乳人工、生乳品質及水電用量之影響。畜產研究 57：46-56。
- 農業部。1999。乳品廠收購酪農原料生乳驗收及計價要點。 <https://www.angrin.tlri.gov.tw/cow/dhi36/dhi36p9.htm>。
- 衛生福利部。2019。化妝品防腐劑成分名稱及使用限制表。 <https://www.fda.gov.tw/TC/siteListContent.aspx?sid=10992&id=30804>。
- Barcina, Y., M. A. Zorraquino, J. Pedauye, G. Ros, and F. Rincón. 1987. Azidiol como conservante de muestras de leche. An. Vet. 3: 65-70.

- Brackett, R. E. 1993. Microbial quality. In: R. L. Shewfelt and S. E. Prussia (Eds.). *Postharvest Handling: a Systems Approach*. Academic Press, pp. 125-148.
- Bryce, D. M., B. Croshaw, J. E. Hall, V. R. Holland, and B. Lessel. 1978. The activity and safety of the antimicrobial agent Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol). *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29: 3-24.
- Cassoli, L. D., P. F. Machado, and A. Coldebella. 2010a. Milk sample conservation methods to determine the total bacteria count by flow cytometry. *Rev. Bras. Zootecn.* 39: 434-439.
- Cassoli, L. D., G. I. F. Ischetti, P. F. Machado, and G. B. Mourao. 2010b. The relationship of flow cytometry results with classical measures of bacterial counts in raw refrigerated milk. *Int. J. Dairy Technol.* 63: 297-300.
- Castro, A., J. M. Pereira, C. Amiama, and M. Barrasa. 2017. Long-term variability of bulk milk somatic cell and bacterial counts associated with dairy farms moving from conventional to automatic milking systems. *Ital. J. Anim. Sci.* 17: 218-225.
- Chang, S. and S. H. Lamm. 2003. Human Health Effects of Sodium Azide Exposure: A Literature Review and Analysis. *Int. J. Toxicol.* 22: 175-186.
- FOSS. 2013. BactoScan™ FC+: The approved rapid method for determination of total bacteria in raw milk.
- Folchini, J. A., D. C. Silveira, G. F. Posser, R. Rebesquini, J. Bressiani, G. B. Barreto, A. Pasqualotti, and C. Bondan. 2023. Efficiency of chemical preservatives used in raw milk samples for bacterial counts by flow cytometry. *R. Bras. Zootec.* 52: e20220058.
- Grozdanovska, A., M. Arapcheska, and L. Kochoski. 2015. The effect of different preservation chemicals and storage temperatures on chemical composition and microbiological safety of milk. In: *Scientific Research of the Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv, Series B: Natural Sciences and Humanities. Proceedings of the International Conference of Young Scientists, Plovdiv, Bulgaria.* 17: 112-115.
- Gunasekera, T. S., P. V. Attfield, and D. A. Veal. 2000. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1228-1232.
- Hendrix, K., N. Bleyen, T. Mennecart, C. Bruggeman, and E. Valcke. 2019. Sodium azide used as microbial inhibitor caused unwanted by-products in anaerobic geochemical studies. *Appl. Geochem.* 107: 120-130.
- International Dairy Federation. 1999. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. FIL-IDF Standard no. 128A. IDF, Brussels, Belgium.
- Loss, G., S. Apprich, W. Kneifel, E. Mutius, J. Genuneit, and C. Braun-Fahrländer, on behalf of the Gabriel study group. 2012. Short communication: Appropriate and alternative methods to determine viable bacterial counts in cow milk samples. *J. Dairy Sci.* 95: 2916-2918.
- Martins, M. E. P., E. S. Nicolau, A. J. Mesquita, R. B. S. Neves, and J. P. Oliveira. 2009. Conservantes bronopol e azidiol: Influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru. *Ciênc. Anim. Bras.* 10: 627-633.
- Marutescu, L. G. 2023. Current and future flow cytometry applications contributing to antimicrobial resistance control. *Microorganisms.* 11: 1-17.
- Matczuk, M., N. Obarski, and M. Mojski. 2012. The impact of the various chemical and physical factors on the degradation rate of bronopol. *Int. J. Cosmet. Sci.* 34: 451-457.
- Merck KGaA. 2016. Safety Data Sheet for Catalogue No. 6B7591: Anti-Olig2, clone 211F1.1, Alexa Fluor® 488 Conjugate. Darmstadt, Germany.
- Narenkumar, J., N. Ramesh, and A. Rajasekar. 2018. Control of corrosive bacterial community by bronopol in industrial water system. *3 Biotech.* 8: 1-13.
- Ninane, V., K. De Reu, R. Oger, W. Reybroeck, and A. Guyot. 2000. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. *Lait.* 80: 527-538.
- Oong, G. C. and P. Tadi. 2023. Chloramphenicol. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan. PMID: 32310426.
- Roy, S. and J. W. Rhim. 2020. Preparation of gelatin/carrageenan-based color-indicator film integrated with shikonin and propolis for smart food packaging applications. *ACS Appl. Bio. Mater.* 4: 770-779.
- Russo, I., P. D. Mese, M. Viretto, G. Doronzo, L. Mattiello, M. Trovati, and G. Anfossi. 2007. Sodium azide, a bacteriostatic preservative contained in commercially available laboratory reagents, influences the responses of human platelets via

- the cGMP/PKG/VASP pathway. *Clin. Biochem.* 41: 343-349.
- Sarwono, A. E. Y., Mitsuhashi, S., M. H. B. Kabir, K. Shigetomi, T. Okada, F. Ohsaka, and M. Ubukata. 2019. Repurposing existing drugs: identification of irreversible IMPDH inhibitors by high-throughput screening. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 34: 171-178.
- Shepherd, J. A., R. D. Waigh, and P. Gilbert. 1988. Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol. *Antimicrob. agents chemother.* 32: 1693-1698.
- Sierra, D., A. Sánchez, A. Contreras, C. Luengo, J. C. Corrales, C. de la Fe, I. Guirao, and C. T. Morales, and C. Gonzalo. 2009. Short communication: Effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.* 92: 4841-4484.
- Singh, P., and N. Gandhi. 2015. Milk preservatives and adulterants: processing, regulatory and safety issues. *Food Rev. Int.* 31: 236-261.
- Slezak, P., and I. Waczulikova. 2011. Reproducibility and repeatability. *Physiol. Res.* 60: 203-205.
- Souza, G., M. L. Lopes, S. M. Roberto, G. U. Campos, and B. A. Freguglia. 2012. Effects of storage temperature and milk sample age on the somatic cell count of goat milk. *J. Candido. Tostes. Dai.* 67: 38-41.
- Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbes, and M. C. Montel. 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 26: 305-310.
- Vigolo, V., G. Niero, M. Penasa, and M. De Marchi. 2022. Effects of preservative, storage time, and temperature of analysis on detailed milk protein composition determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.* 105: 7917-7925.
- Wang, M., Z. Bai, S. Liu, Y. Liu, Z. Wang, G. Zhou, X. Gong, Y. Jiang, and Z. Sui. 2023. Accurate quantification of total bacteria in raw milk by flow cytometry using membrane potential as a key viability parameter. *Lwt-food Sci. Technol.* 173: 114315.
- Wentz, A. G., Bermudes, R. F., Martins, C. M. de M., Osmari, M. P., Rodrigues, B. M., Pozza, and M. S. dos S. 2018. Different methods and times of milk conservation: Physical-chemical composition and microbiological quality. *Acta. Vet. Bras.* 12: 84-93.
- Zhang, W., P. K. Chu, J. Ji, Y. Zhang, R. K. Fu, and Q. Yan. 2006. Antibacterial properties of plasma-modified and triclosan or bronopol coated polyethylene. *Polymer.* 47: 931-936.

# Effects of different preservatives and storage conditions on the stability of individual colony counts tested by automatic bacteria analyzer in raw milk samples <sup>(1)</sup>

Yueh-Tung Chen <sup>(2)</sup> Ming-Kuew Yang <sup>(2)</sup> Yi-Hsin Yeh <sup>(2)</sup> Yi-Hsuan Chen <sup>(2)</sup> and Po-An Tu <sup>(2)(3)</sup>

Received: May 5, 2025; Accepted: Aug. 1, 2025

## Abstract

In Taiwan, raw milk is classified into four categories based on somatic cell counts and total bacterial counts (TBC). If milk TBC of a dairy farmer exceeds 300,000 CFU/mL three times within a month and consecutively over two months annually, the dairy plant could terminate the milk supply agreement with the dairy farmer. Since TBC directly affects the financial benefits of the dairy plants and farmers, establishing a reliable proficiency testing for raw milk samples is crucial for fair pricing and maintaining mutual trust between dairy farmers and processors. This study evaluated the effects of two preservatives, azidiol (AZ) and bronopol (BR), at three storage temperatures (4, 25 and 37°C) over seven (0-7) days to determine the optimal preservation conditions, thereby assuring the stability of the TBC analysis. The study merely analyzed the preservation of samples and did not apply to food additives. Raw milk samples were analyzed by the FOSS BactoScan FC (FC) to obtain individual bacterial counts (IBC), which were logarithmically transformed ( $\log_{10}IBC$ ), at different preservation periods. Results showed that samples without preservatives stored at 4°C maintained stable  $\log_{10}IBC$  for seven days, which values did not show significant difference when compared to the control group. Both AZ and BR effectively stabilized  $\log_{10}IBC$  under refrigeration at 4°C for seven days, which values did not show significant difference when compared to the control group. At 25°C, AZ merely maintained the stability of  $\log_{10}IBC$  for about one day, while BR preserved stability for two days. At 37°C, AZ was only effective on the first day, whereas BR maintained stability for two days. The TBC of both AZ BR significantly increased. In conclusion, under consistent refrigeration at 4°C, both AZ and BR are suitable for preserving raw milk samples analyzed by FC. If there is a risk of temperature change during sample transportation, BR is recommended for maintaining sample stability. However, it is recommended to test the samples soon possible before the scheduled proficiency testing date indicated by the proficiency testing provider, thereby to ensure accurate and reliable  $\log_{10}IBC$  results.

Key words: Azidiol, Bronopol, Automatic bacteria analyzer.

---

(1) Contribution No. 2835 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Northern Region Branch, MOA-TLRI, Miaoli 36843, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: tpa@mail.tlri.gov.tw.